

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

NADA HUMANO ME ES AJENO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

Estandarización de las condiciones de detección de MCP-1 mediante aptámeros de ADN

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

JUAN CARLOS MARTINEZ BRISEÑO

DIRECTORA

Dr. Lilia López Cánovas

Ciudad de México, Diciembre, 2024

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dr. Jose de Jesús Olivares Trejo, UACM-PCG.
Secretario: Dr. Máximo Berto Martínez Benítez, UACM-PCG.
Vocal: Dra. Lilia López Cánovas Vocal, UACM-PCG.

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM
DIRECTORA

Dra. Lilia López Cánovas
UACM

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, mi más profundo agradecimiento por abrirme las puertas al conocimiento y darme la oportunidad de formarme profesionalmente. Gracias a su confianza y apoyo, un sueño pudo convertirse en realidad, marcando una etapa fundamental en mi vida.

A la Dra. Lilia López Cánovas, mi mentora y guía en el fascinante mundo de la investigación, le expreso mi más sincero agradecimiento. Su generosidad al recibirme en su laboratorio y compartir conmigo su sabiduría, experiencia y paciencia fueron motores que me impulsaron a crecer y superar cada desafío. Su apoyo, tanto académico como humano, fue esencial en este camino. A ella le debo una parte fundamental de este logro.

A los doctores del posgrado en Ciencias Genómicas, les agradezco profundamente los conocimientos y aprendizajes brindados en cada clase. Su entrega ha dejado una huella imborrable en mi formación.

A mi madre, María Trinidad, a quien dedico este logro con todo mi corazón, por su amor incondicional y su inquebrantable fortaleza. Gracias por ser mi pilar en cada paso y por creer en mí aun cuando yo dudaba. Este sueño también es tuyo, porque tus sacrificios y dedicación han sido siempre la fuerza que me ha impulsado a seguir adelante.

A mi tía Cecilia y a mi tío Crispín, quienes estuvieron a mi lado en cada momento, ofreciéndome su apoyo incondicional y una fe inquebrantable en mis capacidades. Gracias por estar presentes en cada dificultad y en cada alegría, por darme su comprensión y cariño como si fuera su hijo. Cada palabra de aliento y cada gesto de apoyo me enseñaron a ser fuerte y me motivaron a dar lo mejor de mí.

A todos ustedes, quienes han sido mis guías, mis ejemplos, y mis mayores fuentes de inspiración y fortaleza, les dedico con gratitud y amor el fruto de este esfuerzo. Gracias por ser la luz en mi camino. Este logro es de todos ustedes tanto como lo es mío.

Índice General

Dedicatoria.....	2
Índice de Tablas.....	5
Índice de Figuras	6
Abreviaturas.....	7
Resumen.....	9
1. Introducción	10
1.1 Las aplicaciones prácticas de los métodos de detección y cuantificación de proteínas... 10	10
1.2 La tecnología de aptámeros para la detección y cuantificación de proteínas	15
1.2.1 Diseño de una biblioteca de aptámeros.....	17
1.2.2 La síntesis y selección de aptámeros <i>in vitro</i>	19
1.2.3 La síntesis y selección de aptámeros <i>in silico</i>	21
1.2.4 Los aptámeros de ADN y ARN	23
1.2.5 Las aplicaciones de los aptámeros.....	24
1.3 Antecedentes particulares	26
1.3.1 La proteína MCP-1 y su cuantificación	27
1.3.2 Los métodos convencionales de cuantificación de MCP-1 <i>in vitro</i>	28
1.3.3 El desarrollo de aptámeros comerciales contra MCP-1.....	29
2. Justificación.....	32
2.1 Hipótesis	33
2.2 Objetivo general.....	33
2.3 Objetivos específicos	33
2.4 Estrategia experimental	34
2.5 Materiales y Métodos.....	35
2.5.1 Secuencia de los aptámeros candidatos M146, M57 y M8 evaluados.....	35
2.5.2 Caracterización de las interacciones de M146, M57, M8y los aptámeros derivados de ellos con las formas monomérica y dimérica de MCP-1 humana.....	35
2.5.3 Verificación <i>in silico</i> de la interacción de los aptámeros M146, M57 y M8 y los aptámeros derivados de ellos (optimizados) con MCP-1 y HSA	36
2.5.4 Optimización <i>in silico</i> de las secuencias de los aptámeros M146, M57 y M8	36
2.5.5 Síntesis y verificación de los aptámeros optimizados.....	36
2.5.6 Obtención de moléculas de doble cadena de los aptámeros seleccionados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
2.5.7 Obtención mediante PCR asimétrico de moléculas de cadena sencilla de los aptámeros seleccionados	37
2.5.8 Electroforesis en gel de agarosa para el análisis de los productos de la amplificación por PCR	38
2.5.9 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	38
2.5.10 Tinción y visualización de los aptámeros en geles de agarosa y poliacrilamida después de la electroforesis	38
2.5.11 Inmovilización de la proteína MCP-1 y HSA en un soporte sólido.....	38
2.5.12 Predicción de la afinidad de Unión y la constante de disociación de los complejos MCP-1-aptámeros optimizados	39

2.5.13 Cálculo de la Kd de los aptámeros optimizados mediante ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real	39
2.5.14 Ensayo de interacción de aptámeros con MCP-1 y HSA en un soporte sólido	40
2.5.15 Análisis estadístico	41
3. Resultados	41
3.1 Evaluación <i>in silico</i> de las interacciones de los aptámeros M146, M57 y M8 con la proteína MCP-1 humana.....	41
3.2 Evaluación de la interacción global potencial de los aptámeros M146, M57 y M8 por MCP-1 y albúmina humana (HSA)	46
3.3 Generación y selección de aptámeros optimizados mediante la realización de mutaciones <i>in silico</i> en M146 y M57	47
3.4 Análisis <i>in silico</i> de las interacciones con MCP-1 y HSA de los aptámeros optimizados..	52
3.5 Verificación del tamaño molecular de los aptámeros M146_47 y M57_32 mediante PCR	55
3.6 Estandarización de la obtención de ADN de cadena sencilla de los aptámeros M146_47 y M57_32 mediante PCR asimétrica.	56
3.7 Estimación de la constante de afinidad de los aptámeros M146_47 y M57_32 en de <i>in silico</i>	58
3.8 Cálculo de la constante de afinidad de los aptámeros M146_47 y M57_32 mediante PCR cuantitativo en tiempo real	59
3.9 Evaluación de la detección de MCP-1 con los aptámeros M146_47 y M5_32 mediante ELASA directo.....	61
4. Discusión	63
5. Conclusiones	67
6. Perspectivas	68
7. Referencias	69

Indice de Tablas

Tabla 1. Los métodos de detección y cuantificación de proteínas.....	14
Tabla 2. Cuadro comparativo de las características distintivas de los aptámeros y los anticuerpos.....	16
Tabla 3. Características de los aptámeros de ADN y ARN: Ventajas, Desventajas y Aplicaciones Específica	24
Tabla 4. Kits para la detección de MCP-1 que se comercializan en la actualidad.....	29
Tabla 5. Aptámeros comerciales contra MCP-1.....	30
Tabla 6. Análisis de las interacciones entre los aptámeros M146 y M57 y la proteína MCP-1 mediante acoplamiento molecular.....	45
Tabla 7. Puntuaciones de predicción de la interacción proteína-aptámero utilizando los clasificadores de aprendizaje automático del servidor web PPAI.....	46
Tabla 8. Características estructurales, termodinámicas e interacción global de las mutantes de M146 con MCP-1 y HSA.....	50
Tabla 9. Características estructurales, termodinámicas e interacción global de las mutantes de M57 con MCP-1 y HSA.....	51
Tabla 10. Análisis de las interacciones entre los aptámeros M146_47 y M57_32 y la proteína MCP-1 mediante acoplamiento molecular.....	54
Tabla 11. Condiciones de ciclos y temperaturas para la obtención de aptámeros de cadena sencilla mediante PCR asimétrico.....	58

Índice de Figuras

Figura 1. Procedimiento SELEX para generar y seleccionar aptámeros específicos.....	20
Figura 2. Proceso de diseño <i>in silico</i> de aptámeros y comprobación experimental.....	22
Figura 3. Modelos moleculares de las interacciones entre la forma monomérica de MCP-1 y los aptámeros M8, M57 y M147.	43
Figura 4. Modelos moleculares de las interacciones entre la forma dimérica de MCP-1 y los aptámeros M8, M57 y M147.....	44
Figura 5. Tipos de estructuras secundarias que pueden formar las moléculas de ácidos nucleicos de cadena sencilla.....	48
Figura 6. Representación esquemática de las estructuras secundarias de dos aptámeros..	52
Figura 7. Modelos moleculares de las interacciones entre MCP-1 y los aptámeros M147_47 y M57_32.....	53
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa y de poliacrilamida de los productos de la amplificación mediante PCR de los aptámeros M146_47 y M57_32.....	55
Figura 9. Estandarización de las condiciones de obtención de ADN de cadena sencilla de los aptámeros M146_47 y M57_32.....	57
Figura 10. Diagrama ilustrativo del procedimiento utilizado para calcular la Kd de los aptámeros M146_47 y M57_32 mediante PCR cuantitativo en tiempo real.....	60
Figura 11. Relación entre la fracción de aptámero unida a MCP-1 vs concentración de aptámero.....	60
Figura 12. Diagrama esquemático de la técnica ELASA (Enzyme Linked Aptamer Sorbent Assay) directo utilizando aptámeros marcados.....	62
Figura 13. Determinación de la cantidad mínima (límite de detección) de MCP-1 mediante los aptámeros M146_47 y M57_32.....	62

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNcs: Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla

AGEs: Productos de glicación avanzados

APT: Aptámero

ARN: Ácido ribonucleico

CCL2: Ligando 2 de quimiocina

CCR2: Receptor de quimiocinas CC tipo 2

ΔG : Cambio de energía libre

EAC: Enfermedad arterial coronaria

ELASA: Enzyme-Linked Aptamer Sorbent Assay

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

HSA: Albumina Humana Sérica

Kd: Constante de disociación

KIM-1: Molécula de daño renal-1

LPS: Lipopolisacáridos

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1

M: Molaridad

min: Minutos

mM: Milimolar

ng: Nanogramos

NK: Célula Natural Killer

°C: Grados centígrados

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pg: Picogramos

rpm: Revoluciones por minuto

RT PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

SELEX: Enriquecimiento Exponencial en Presencia del Ligando

µg: Microgramos

µL: Microlitros

mL: Mililitros

Resumen

En este trabajo se describe la selección y caracterización *in silico* e *in vitro* de dos nuevos aptámeros a partir del análisis de la secuencia de los aptámeros de ADN M146, M57 y M8 previamente desarrollados en el grupo de trabajo de la Dra. Lilia López Canovas en el laboratorio del posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México contra la proteína quimioatrayente de leucocitos1 (MCP-1). Aunque las interacciones de M146 y M57 con MCP-1 monomérica y dimérica alcanzaron un puntaje adecuado (>0.48) según las predicciones del servidor web PPAI 1.0, también fueron capaces de interactuar con albúmina humana (HSA), la cual es una proteína que está en el plasma humano simultáneamente con MCP-1. El aptámero M8 interactuó con HSA y las interacciones con MCP-1 fueron débiles de acuerdo con las predicciones realizadas. Por esa razón, se optimizaron *in silico* la secuencia de los aptámeros M146 y M57. La estrategia de optimización se basó en mutar aleatoriamente *in silico* las secuencias de los mismos, predecir la estructura secundaria de las mutantes y de acuerdo con ella y la afinidad predicha por MCP-1 y HSA mediante PPAI 1.0, se propusieron dos nuevos aptámeros candidatos (M146_47 y M57_32). Las interacciones de los aptámeros candidatos con MCP-1 alcanzaron un puntaje >0.48 , mientras que no se predijo interacción de los mismos con HSA. Los experimentos de acoplamiento molecular de M146_47 y M57_32 con MCP-1 reveló que eran capaces de interactuar con las formas monomérica y dimérica de la proteína formando puentes de hidrógeno y pocos pseudoenlaces y/o interacciones desfavorables. Se estandarizó la técnica de PCR asimétrico para sintetizar los aptámeros de ADN de cadena sencilla marcado y sin marcar con biotina obteniéndose eficientemente cadena sencilla de M146_47 y M57_32 eficientemente aplicando un gradiente de temperatura de 90-65 °C durante 40 ciclos de amplificación, y utilizando una relación de concentraciones de cebadores directo:reverso de 20:1. La determinación experimental de ambos aptámeros se realizó en placas de ELISA y la cantidad de aptámero unido se estimó mediante PCR cuantitativo. El aptámero M146_47 tiene una Kd aparente de 226.6 pM, mientras que M57_32 de 103 pM. El límite de detección de M146_47 mediante un ensayo ELASA colorimétrico en soporte sólido, fue de 25 pg de MCP-1 y no se detectó reacción cruzada con HSA. M57_32 no tiene reacción cruzada con HSA pero en las condiciones ensayadas la señal obtenida fue independiente de la concentración de MCP-1. Estos resultados sugirieron que el aptámero M146_47 es un buen candidato para la detección de MCP-1 *in vitro* mediante ensayos ELASA indirecto y que M57_32 requiere de caracterizaciones adicionales.

1. Introducción

Las metodologías para la detección, análisis y cuantificación de macromoléculas, en particular proteínas, son cruciales en la investigación científica, así como en el diagnóstico clínico y la industria (Song *et al.*, 2023). Teniendo en cuenta que las proteínas son indispensables para el funcionamiento de todos los seres vivos y desempeñan funciones importantes en diversos procesos biológicos, es de vital importancia contar con metodologías para detectar y analizar estas moléculas. Esas metodologías nos permiten comprender las funciones, conexiones y controles que desempeñan las proteínas en los sistemas biológicos. En el ámbito médico los investigadores utilizan estas técnicas para analizar las funciones de las proteínas a nivel celular, estudiar las redes de señalización en las que participan estas moléculas y desentrañar los mecanismos por los que ocurren los cambios fisiopatológicos que originan las diferentes enfermedades en humanos y animales (Bull y Doig, 2015). De ahí que las metodologías para la detección y análisis de proteínas se apliquen en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades, el monitoreo ambiental, el control de la calidad en la industria de producción de alimentos y bebidas, el desarrollo de nuevos medicamentos, el estudio de la farmacodinámica y farmacocinética de los mismos, en la agricultura, la salud animal, etc

1.1 Las aplicaciones prácticas de los métodos de detección y cuantificación de proteínas

Por otra parte, algunas proteínas implicadas en enfermedades en humanos y en animales pueden identificarse y cuantificarse para ayudar en el desarrollo de nuevos medicamentos, y así proponer fármacos candidatos, investigar sus interacciones con sus dianas y evaluar qué tan bien pueden modular la actividad de esas moléculas (Bull y Doig, 2015).

La detección de proteínas puede ayudar al área de la medicina personalizada al identificar la presencia de moléculas específicas, lo cual facilita dar atención personalizada a los pacientes en función de sus perfiles proteicos particulares (Bull y Doig, 2015). De igual forma, esas técnicas son de utilidad en el campo de las imágenes biomédicas ya que permiten monitorear la distribución de ciertas proteínas en el organismo cuando se realizan técnicas imagenológicas (Bull y Doig, 2015).

Farmacodinámica y farmacocinética: En farmacología, la detección de proteínas se utiliza para comprender cómo interactúan los medicamentos con sus proteínas diana en el organismo, lo que ayuda a optimizar la dosis de los medicamentos y los planes de tratamiento. De igual forma es necesario conocer en que órgano se metabolizan los diferentes

medicamentos, que metabolitos se generan, en que tiempo etc, por lo que es indispensable la utilización de métodos para la detección de estas moléculas (Kovačević *et al.* 2018). De esta manera se puede garantizar la calidad, seguridad y eficacia de los medicamento.

Investigación científica en el campo de la genómica, proteómica y biotecnología: Las técnicas de detección de macromoléculas y en especial de proteínas son esenciales en el campo de la investigación proteómica y genómica (Al-Amrani *et al.*, 2021). Los investigadores pueden adquirir conocimientos sobre diferentes procesos biológicos complejos identificando y cuantificando simultáneamente cientos de proteínas mediante diferentes técnicas como la espectrometría de masas, electroforesis en gel y ensayos basados en anticuerpos.

Monitoreo ambiental: En la investigación ambiental, las técnicas de detección de proteínas se utilizan para monitorear poblaciones microbianas, identificar biomarcadores de factores estresantes ambientales y evaluar los efectos de la contaminación (Al-Amrani *et al.*, 2021). Por ejemplo, la presencia de microorganismos patógenos se puede realizar identificando, en las muestras de agua, algunas de las proteínas presentes en esos organismos.

Ciencias forenses: Las técnicas de detección de proteínas se pueden utilizar en las ciencias forenses para localizar y clasificar materiales biológicos descubiertos en la escena del crimen (Martin *et al.*, 2019). Por ejemplo, se puede detectar la presencia de hemoglobina u otros componentes proteicos de diferentes fluidos biológicos.

Diagnóstico y seguimiento de enfermedades: Un complemento clave en el diagnóstico clínico de las enfermedades es la detección de niveles anormales de una proteína en particular o la presencia de determinados biomarcadores en fluidos biológicos como sangre, orina o saliva (Condrat *et al.*, 2020). Por ejemplo, el diagnóstico preciso de enfermedades como el VIH o la COVID-19 depende de la identificación de determinadas proteínas, como anticuerpos o antígenos virales en los fluidos corporales.

Sector de Alimentos y Bebidas: Para mantener la calidad y seguridad de sus productos, el sector alimentario utiliza técnicas de detección de proteínas. Estas técnicas se emplean para identificar proteínas alergénicas, confirmar la legitimidad de los alimentos y realizar un seguimiento de la composición proteica a medida que se procesan dichos alimentos (Mondal *et al.*, 2023).

En el campo de la biotecnología, es necesario monitorear la construcción de proteínas recombinantes y la generación de anticuerpos monoclonales, por lo que las técnicas de detección de estas moléculas son cruciales. De igual forma en el control de calidad de los

procesos de bioprocesamiento, es esencial vigilar los niveles de expresión y la pureza de las proteínas (Condrat *et al.*, 2020).

Por otra parte, en diferentes ámbitos de investigación como la investigación de enfermedades crónicas como diabetes, enfermedades autoinmunes, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, e enfermedades infecciosas, es importante la identificación y cuantificación de proteínas que pudieran estar vinculadas al proceso fisiopatológico con el fin de obtener conocimientos acerca del proceso y desarrollar tratamientos e identificar biomarcadores específicos para el diagnóstico, evaluar el pronóstico o desarrollar nuevas estrategias terapéuticas(Condrat *et al.*, 2020).

En conclusión, las tecnologías para la detección de proteínas son herramientas esenciales en una variedad de aplicaciones científicas, medicinales e industriales. Las mismas nos ayudan a comprender los procesos biológicos, identificar trastornos, crear tratamientos novedosos y garantizar la seguridad de los productos en una variedad de industrias. Como consecuencia, el avance en estos campos está impulsado por mejoras en la tecnología de detección de proteínas, lo cual nos facilitaría su estudio y la comprensión de los mecanismos en los que participan.

Existen diferentes métodos bioquímicos y fisicoquímicos para detectar y cuantificar proteínas (Tabla 1). La mayoría se basan en detectar alguna característica física o química de la molécula como la absorción de luz (espectrofotometría), o composición atómica (espectrometría de masa), o las características magnéticas de su núcleos atómicos (resonancia magnética nuclear), o tamaño, o forma o carga (cromatografía de exclusión molecular, electroforesis), o la reacción química de alguno de su grupos funcionales (Bull y Doig., 2015b) (Tabla 1). Los métodos anteriores se utilizan fundamentalmente en la investigación científica cuando se requiere caracterizar alguna proteína o aislarla y purificarla. Existen otros métodos que permiten detectar específicamente una proteína y que se basan en la capacidad de las mismas en comportarse como antígenos y provocar la generación de anticuerpos contra ellas (Tymoczko y Stryer, 2013). De esta manera se desarrollan anticuerpos policlonales o monoclonales contra la proteína en cuestión que son capaces de reconocer dicha proteína específicamente (Tymoczko y Stryer, 2013). (Tabla 1). Muchos de estos métodos dan como resultado una señal colorimétrica, fluorométrica, quimioluminiscente o radioactiva, en dependencia del marcador que haya sido utilizado en la reacción, que es proporcional a la concentración de proteínas (Tymoczko y Stryer, 2013) (Tabla 1). Los métodos

que utilizan marcadores colorimétricos son los menos sensibles, mientras que los quimioluminiscentes y los radiactivos son los más sensibles (Tymoczko y Stryer, 2013). Sin embargo, aquellos métodos que utilizan marcadores radiactivos tienen las desventajas asociadas al uso de radiactividad como son la emisión de radiaciones dañinas para la salud, vida media elevada de los isótopos radiactivos y por tanto es necesario condiciones especiales para la eliminación de los desechos y en el caso de los marcadores fluorescentes son muy sensibles, a menudo más que los métodos colorimétricos, lo que permite detectar concentraciones muy bajas de la molécula de interés, Los cambios fluorescentes suelen ser inmediatos, permitiendo una detección rápida de eventos moleculares. Los fluoróforos pueden ser diseñados para detectar diferentes tipos de eventos biológicos (interacciones, cambios de conformación, etc. Entre sus desventajas tenemos que fluoróforos pueden sufrir fotoblanqueo (degradación por exposición prolongada a la luz), lo que reduce la señal fluorescente con el tiempo y el uso de equipo especializado, como espectrofotómetros o microscopios de fluorescencia, que puede ser costoso, También la señal fluorescente puede ser inhibida por ciertos factores del entorno como el pH o la proximidad de otras moléculas, lo que afecta la precisión de la detección (Quenching). (Tymoczko y Stryer, 2013).

Entre los métodos que utilizan anticuerpos contra la proteína de interés se encuentra el ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) en todas sus variantes: directo, indirecto sándwich o de competencia (Tymoczko y Stryer, 2013). (Tabla 1). Este ensayo es el más utilizado para detectar proteínas en el suero o plasma a nivel clínico dada su simplicidad y facilidad de implementación. Sin embargo, tiene desventajas ya que requiere de anticuerpos específicos los cuales toman tiempo para generarlos y son costosos (Tymoczko y Stryer, 2013).

Tabla1.

Los métodos de detección y cuantificación de proteínas

Método	Principio de Funcionamiento	Tipo de Señal	Aplicaciones
Espectrofotometría (UV-Vis)	Mide la absorción de luz por las proteínas a longitudes de onda específicas utilizando la ley de Beer-Lambert	Absorción de luz	Detección y cuantificación de proteínas mediante la medición de la absorbancia
Pruebas Colorimétricas	Utiliza reacciones químicas que desarrollan colores cuya intensidad está relacionada con la cantidad de proteína presente.	Color desarrollado en ensayos (p. ej., Bradford, BCA)	Ensayos rápidos y sensibles para la cuantificación de proteínas
Pruebas Fluorométricas	Emplea marcadores fluorescentes cuya intensidad está relacionada linealmente con la concentración de proteínas	Intensidad de la señal fluorescente	Mayor sensibilidad que las pruebas colorimétricas para detectar proteínas
ELISA	Usa anticuerpos y enzimas para detectar y cuantificar proteínas específicas. La reacción enzimática produce una señal cuantificable proporcional a la concentración de proteínas	Colorimétrica, Fluorométrica, Quimioluminiscente	Detección y cuantificación específica de proteínas
Detección en soportes sólidos	Utiliza anticuerpos acoplados a enzimas para detectar proteínas unidas a soportes sólidos (membranas, microarrays) y cuantifica la señal generada	Colorimétrica, Fluorométrica, Quimioluminiscente	Identificación y cuantificación de proteínas en soportes sólidos
Cromatografía Líquida (HPLC/UHPLC)	Separa y cuantifica proteínas en función de sus propiedades físicas y químicas mediante cromatografía líquida de alta resolución o ultra alta resolución	Perfil cromatográfico, densitometría	Separación y cuantificación de proteínas según sus características
Espectrometría de Masas (MS)	Analiza la relación carga-masa de los iones desprendidos al ionizar la muestra de proteínas, permitiendo la identificación y cuantificación de las mismas	Relación carga-masa de iones desprendidos	Identificación y cuantificación de proteínas a nivel molecular
Espectroscopia de RMN (resonancia magnética nuclear)	Utiliza las características magnéticas de núcleos atómicos como ¹³ C y protones para revelar información estructural, química y física de las moléculas analizadas.	Información de RMN	Análisis detallado de moléculas, incluyendo proteínas, para obtener información estructural y química

Tomado y modificado de (Tymoczko y Stryer,2013).

1.2 La tecnología de aptámeros para la detección y cuantificación de proteínas

Los aptámeros son moléculas cortas de ADN o ARN monocatenarias que tiene una alta afinidad y especificidad por sus dianas (Mondal *et al.*, 2019; Jae Min Lee *et al.*, 2023). Entre las dianas de los aptámeros se encuentran proteínas, carbohidratos, lípidos, iones e incluso células intactas, por lo que con frecuencia se les denomina "anticuerpos químicos". Los aptámeros adquieren una conformación tridimensional única que les permite reconocer de forma específica a sus moléculas dianas (Mondal *et al.*, 2019; Jae Min Lee *et al.*, 2023).

La detección de proteínas mediante aptámeros aventaja a los métodos inmunológicos, basados en las reacciones antígenos/anticuerpos, en la simplicidad de generación de los aptámeros y bajo costo, aunque su sensibilidad y especificidad es semejante a la que se poseen los anticuerpos por sus moléculas dianas (Tabla 2).

Los aptámeros ofrecen varias ventajas en comparación con los anticuerpos convencionales. Por lo general, son más pequeños que los anticuerpos, lo que les permite penetrar mejor en los tejidos y acceder a dianas que pueden ser inaccesibles para ellos. Además, los aptámeros tienen una baja inmunogenicidad porque no provienen de fuentes biológicas, lo que reduce la probabilidad de respuestas inmunitarias adversas. Además, los aptámeros tienen una larga vida útil y se pueden producir fácilmente en grandes cantidades, lo que los convierte en candidatos atractivos para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas (Zhou y Rossi., 2016). (Tabla 2).

Tabla 2.

Cuadro comparativo de las características distintivas de los aptámeros y los anticuerpos.

Característica	Aptámeros	Anticuerpos
Naturaleza	Ácidos nucleicos de una sola cadena (ADN/ARN) o péptidos	Proteínas (inmunoglobulinas)
Producción	Selección <i>in vitro in silico</i>	<i>In vivo</i> (inmunización animal) e <i>in vitro</i> (tecnología recombinante)
Especificidad	Altamente específico, puede reconocer diferentes tipos de moléculas	Altamente específico, usualmente reconoce proteínas y péptidos
Afinidad	Se pueden diseñar para que posean una alta afinidad	Pueden tener alta afinidad, especialmente los anticuerpos monoclonales
Tamaño y estructura	Son pequeñas moléculas lineales con estructuras tridimensionales simples	Son proteínas grandes con estructuras complejas.
Estabilidad	Se pueden diseñar para que sean estables y resistente a diferentes factores ambientales (temperatura, pH, nucleasas)	Son sensibles a los cambios de temperatura, pH y otros factores como proteasas.
Flexibilidad	Altamente personalizable para una amplia gama de objetivos	Limitado al reconocimiento de antígenos
Ética	Ventaja ética debido a la producción <i>in vitro</i>	Puede involucrar la inmunización animal, aumentando las preocupaciones éticas
Aplicaciones	Diagnóstico, desarrollo de drogas, terapia dirigida, investigación	Diagnóstico, inmunoterapia, investigación
Uso terapéutico	Emergente en aplicaciones terapéuticas	Ampliamente utilizado en aplicaciones terapéuticas, especialmente los anticuerpos monoclonales
Historia	Desarrollo relativamente reciente	Larga historia de uso con una amplia validación
Costo	La producción puede ser rentable	La producción puede ser cara
Reactividad cruzada	Baja reactividad cruzada debido a la selección <i>in vitro</i>	Puede exhibir reactividad cruzada con antígenos similares
Almacenamiento	Se puede diseñar para que sean estables a largo plazo	Puede requerir condiciones de almacenamiento más controladas

(Akay, 2006). Modificado de Aptamers vs. Antibodies. (2020, 19 enero). Base Pair Biotechnologies. <https://basepairbio.com/aptamers-vs-antibodies/>

Los aptámeros son útiles para una variedad de propósitos debido a su capacidad de unión y especificidad. Se pueden utilizar como agentes de diagnóstico para identificar biomarcadores específicos en muestras clínicas, o cuantificar macromoléculas, como agentes terapéuticos para inhibir o modular la actividad de las moléculas diana o como sondas moleculares para aplicaciones de detección e imagen. Los aptámeros también se conjugan fácilmente químicamente con otras moléculas, lo que los hace más versátiles y útiles (Zhou y Rossi, 2016).

1.2.1 Diseño de una biblioteca de aptámeros

Para garantizar la generación de aptámeros específicos y de alta afinidad, el diseño de una biblioteca de aptámeros (colección de cientos de miles de aptámeros) es un paso crucial en el proceso de SELEX (del inglés "Systematic Evolution of Ligands and Exponential Enrichment"). El proceso de SELEX es el método utilizado para la selección de las secuencias de los aptámeros, que están contenidas en la biblioteca, a partir de ciclos de enriquecimiento y amplificación de las secuencias específicas para una determinada diana. La biblioteca debe ser lo suficientemente diversa para cubrir una amplia gama de posibles secuencias de unión y mantener un tamaño manejable para poder realizar la selección de los aptámeros de interés de forma eficiente. (Vorobyeva *et al.*, 2018).

En el proceso de diseño de la biblioteca de aptámeros hay que tener en cuenta una serie de factores que se relacionan a continuación:

1. Características de las secuencias que componen la biblioteca: Una biblioteca de aptámeros está compuesta por cientos de miles de secuencias que se diferencian en el orden de los nucleótidos en su región central. Para ello se generan secuencias con una región central en la que el orden de nucleótidos es aleatorio, de ahí que una biblioteca contiene 4^n secuencias diferentes, donde n es la longitud de la secuencia aleatoria (Penner, 2024). La longitud de dicha secuencia aleatoria puede variar según el propósito de la biblioteca y la complejidad deseada. Para garantizar una diversidad suficiente de secuencias, generalmente se utiliza una región aleatoria de 20 a 50 nucleótidos (Fittery James, 2005). Por otra parte, algunos nucleótidos en ciertas posiciones de la región aleatoria pueden ser parcialmente degenerados dependiendo del nivel de diversidad deseado. Esto hace posible la incorporación de combinaciones particulares de nucleótidos o bases modificadas en esas posiciones, lo que amplía el espacio químico que la biblioteca cubre (BharatGawande *et al.*, 2017). La incorporación de secuencias de control en la biblioteca es ventajosa para el seguimiento del proceso de selección de los aptámeros y poder evaluar la rigurosidad de la selección.

Usualmente estas secuencias de control se colocan en los extremos 5' y 3' de los aptámeros. Las secuencias de control pueden estar unidas o no a dianas no relacionadas (United States Patent and Trademark Office, 2017).

2. Longitud de las secuencias de la biblioteca: La longitud de la secuencia del aptámero depende de la molécula diana y la afinidad de unión deseada. Mientras que los aptámeros más cortos podrían ser más adecuados para moléculas pequeñas, los aptámeros más largos son más adecuados para dianas más grandes. Los aptámeros, generalmente tienen una longitud entre 20 a 100 nucleótidos, y son eficientes para detectar la mayoría de sus blancos moleculares (Cruz-Hernández *et al.*, 2022). Mientras más largas sean secuencia, mayor probabilidad de formación de motivos estructurales únicos y mayor cantidad de interacciones con la molécula diana, lo que resulta en una mayor sensibilidad, especificidad y afinidad con el blanco, porque aumenta la cantidad de sitios de unión (Brown *et al.*, 2024).

Debe señalarse también que los aptámeros más largos forman estructuras secundarias y enlaces de hidrógeno más extensos, lo que les confiere mayor estabilidad, ya que pueden ser más resistentes a ser degradados por nucleasas y otros agentes ambientales.

3. Tamaño de la biblioteca: La cantidad de secuencias en una biblioteca, es decir su tamaño, determina la complejidad del muestreo que sería necesario realizar para seleccionar adecuadamente los aptámeros específicos para un blanco dado. En general, es más probable encontrar aptámeros de alta afinidad en bibliotecas más grandes en comparación con las más pequeñas. Sin embargo, se debe lograr un equilibrio para garantizar la practicidad de la selección y la detección de secuencias específicas y altamente afines. Los experimentos de SELEX utilizan con frecuencia bibliotecas con 10^{14} – 10^{15} secuencias aleatorias (Kingham *et al.*, 2017).

4. Sitios de unión de cebadores: Para facilitar la amplificación y la secuenciación de los aptámeros durante el proceso SELEX la biblioteca de aptámeros debe incluir sitios de unión de cebadores que son las llamadas regiones constantes de la biblioteca. (Kohlberger y Gadermaier, 2021). Estas secuencias de cebadores flanquean la región aleatoria y deben ser compatibles con el método de amplificación elegido, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De ahí que el diseño de las regiones constantes debe seguir los mismos principios del diseño de primers de PCR como es la longitud (18-25 nt), la composición de bases (40-60% de GC y con varias C o G en los extremos 3' y 5'), una temperatura de fusión entre 50-60°C y semejante entre los dos cebadores (Kohlberger y Gadermaier, 2021) para evitar la formación de dímeros, asas y horquillas (Pan y Clawson, 2009).

5. Composición de nucleótidos: Las propiedades de unión de los aptámeros generados pueden verse afectadas por la composición de nucleótidos de la biblioteca. Al momento de elegir la composición de nucleótidos, es fundamental tener en cuenta las características de la molécula diana. Por ejemplo, cuando el objetivo es una proteína, con frecuencia se utiliza una biblioteca con una representación equilibrada de nucleótidos (A, T, G, C) en la región aleatoria. Sin embargo, para mejorar la afinidad de unión, si el objetivo es una molécula pequeña, se pueden agregar nucleótidos modificados o combinaciones de bases específicas (Ni *et al.*, 2011).

6. Consideraciones de estructura secundaria: Los aptámeros se pliegan en estructuras secundarias y terciarias específicas que son esenciales para su capacidad de unión. El diseño de la biblioteca debe considerar evitar la formación de estructuras de horquilla estables dentro de la región aleatoria que puedan impedir el plegado adecuado que promueva la formación de estructuras funcionales. El uso de herramientas bioinformáticas puede guiar el proceso de diseño de la biblioteca y ayudar a predecir posibles estructuras secundarias en las secuencias que la componen (Lee *et al.*, 2023).

1.2.2 La síntesis y selección de aptámeros *in vitro*

Para generar y seleccionar aptámeros que se unan a un blanco particular, se utiliza el procedimiento conocido como SELEX (Song *et al.*, 2012). Para aislar aptámeros con alta afinidad para el objetivo deseado, en el proceso de SELEX se utilizan múltiples rondas de selección, en las que la biblioteca de aptámeros conteniendo secuencias aleatorias se somete a ciclos iterativos de unión al blanco, recuperación de los aptámeros unidos y amplificación, usualmente por PCR, para incrementar la cantidad de copias que se unen al blanco específico (Fig.1). Este método permite la generación de aptámeros con estructuras tridimensionales distintivas que pueden unirse específicamente a sus moléculas diana. (Lee *et al.*, 2023).

Cada ronda del proceso SELEX normalmente implica la amplificación de la biblioteca para enriquecer los aptámeros con la mayor afinidad de unión por la molécula diana. (Kohlberger y Gadermaier, 2021). Luego, se aíslan los aptámeros más específicos y de mayor afinidad de la biblioteca amplificada y se eliminan los aptámeros menos afines (Cho *et al.*, 2010).(Fig. 1).

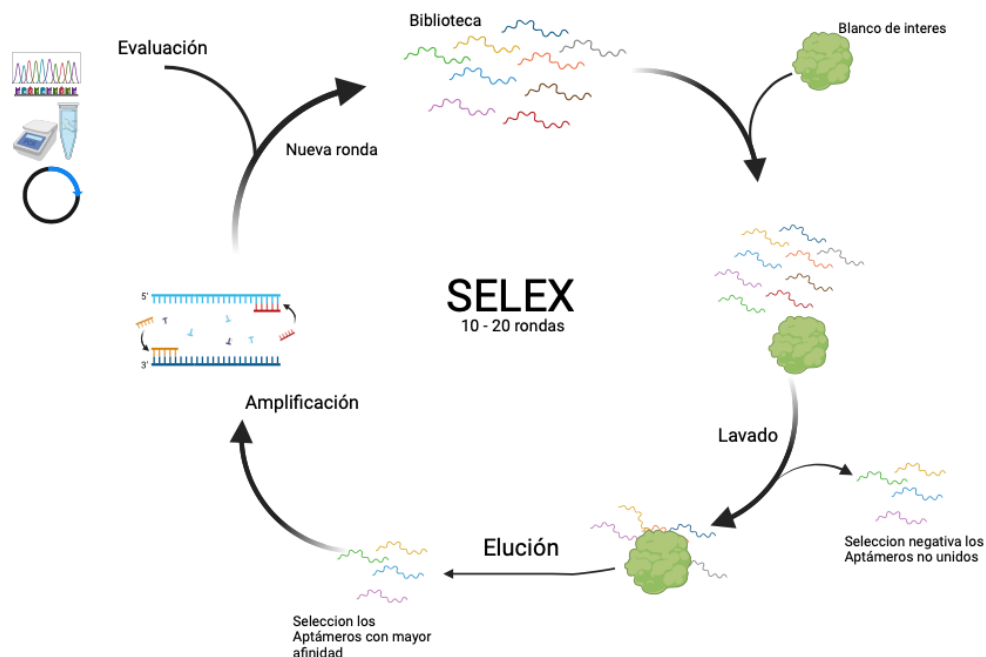


Figura 1.

Procedimiento SELEX para generar y seleccionar aptámeros específicos. Se inicia con una biblioteca de oligonucleótidos aleatorios que se expone a una molécula de interés. Los aptámeros que se unen a la diana se seleccionan y amplifican, repitiendo el ciclo hasta obtener secuencias con alta afinidad y especificidad. <https://www.lubio.ch/blog/aptamers>.

Durante el proceso de SELEX se llevan a cabo múltiples rondas de selección. Este proceso implica la interacción iterativa de la biblioteca de aptámeros, que contiene secuencias aleatorias, con el blanco de interés. Cada ronda incluye las etapas de unión al blanco, recuperación de los aptámeros unidos y amplificación, generalmente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este ciclo se repite para incrementar la abundancia de aptámeros con alta afinidad hacia el blanco específico, optimizando así la selección de los ligandos deseados (Fig. 1).

Los productos de la amplificación mediante PCR de la biblioteca de aptámeros durante el proceso de SELEX se purifican para eliminar enzimas, nucleótidos, cebadores y otros componentes no deseados. Este paso de purificación se puede completar mediante la utilización de cromatografías de afinidad o técnicas de precipitación. En ocasiones, se puede amplificar el producto de PCR purificado para aumentar el rendimiento o se pueden realizar otras modificaciones, como agregar adaptadores a los aptámeros seleccionados para la secuenciación futura de los mismos (Head *et al.*, 2014). Es fundamental tener en cuenta que

en el proceso de amplificación de los aptámeros se deben optimizar las condiciones de PCR para reducir el sesgo provocado por la amplificación preferencial de secuencias específicas y la introducción de mutaciones causadas por la PCR y poder mantener la diversidad de la biblioteca de aptámeros. (Kohlberger y Gadermaier, 2021).

En el proceso de selección también se realiza la llamada contra-selección de los aptámeros o selección negativa, en la que se re-seleccionan aquellos aptámeros que no sean capaces de unirse a otras moléculas que pudieran tener semejanza estructural con el blanco deseado. Para ello se realiza un proceso semejante al SELEX pero se utilizan los blancos no deseados para realizar la selección y se recuperan los aptámeros que no sean capaces de unirse a ellos (Fig.1).

1.2.3 La síntesis y selección de aptámeros *in silico*

El diseño, generación y selección de secuencias de aptámeros utilizando técnicas informáticas se conoce como síntesis "*in silico*" y no implica pruebas *in vitro* o *in vivo* durante el proceso de diseño y selección (Chen *et al.*, 2023). Este método puede ahorrar tiempo y recursos al permitir eliminar algunos de los posibles candidatos antes de realizar la confirmación experimental en el laboratorio. Los pasos para realizar los procedimientos "*in silico*" son los siguientes:

-Selección de la molécula objetivo: Al igual que para realizar la selección *in vitro* se elige la molécula objetivo a la que se desea que se una el aptámero (Chen *et al.*, 2023). La misma puede ser una proteína, un ácido nucleico, un ión, o cualquier otra macromolécula o incluso la conformación de una biomolécula particular (Fig. 2A).

-Búsqueda

Para identificar secuencias de aptámeros con blancos o características de unión semejantes, es recomendable realizar búsquedas en bases de datos especializadas de secuencias y estructuras de aptámeros conocidas. Algunas de las bases de datos más útiles incluyen:

Aptamer Database: <https://www.aptagen.com/apta-index/>

ADN Aptamer Database: <http://aptamer.icmb.utexas.edu/> (ver Fig. 3B).

Además, es posible generar nuevas secuencias de aptámeros, tanto de ADN como de ARN, utilizando diversas herramientas de software, tales como:

AptaSuite: <http://aptasuite.bioinformatics.cvr.ac.uk/>

NUPACK: <http://www.nupack.org/>

ADN/RNA Oligonucleotide Modeling Platform: <https://enme.umd.edu/bioengineering/>

AptaTools: <http://aptatools.sustc.edu.cn/>

iDoRNA: <https://www.mdpi.com/1099-4300/18/3/83>

Invenire Aptamers: <https://www.invenire.bio/>

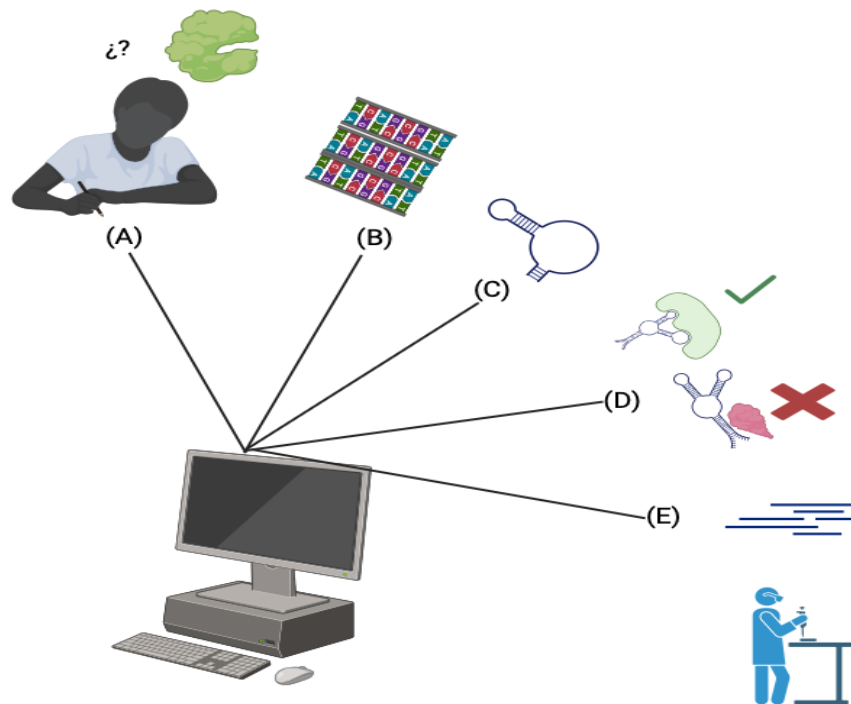


Figura 2.

Proceso de diseño *in silico* de aptámeros y comprobación experimental. Proceso de diseño y validación de aptámeros dirigido a MCP-1. **(A)** Selección del blanco molecular. **(B)** Identificación de aptámeros potenciales mediante búsquedas en bases de datos especializadas. **(C)** Predicción y análisis de la estructura secundaria del aptámero seleccionado. **(D)** Evaluación de las interacciones moleculares a través de simulaciones de acoplamiento molecular. **(E)** Validación experimental *in vitro* para confirmar la afinidad y funcionalidad del aptámero diseñado <https://doi.org/10.3390/ijms22073605>

(A) Selección de la molécula de interés: Elección del blanco al que se dirigirá el aptámero; **(B)** Búsqueda en bases de datos: Exploración de secuencias de aptámeros en bases de datos, como **AptamerDatabase**, para identificar posibles interacciones con la molécula de interés; **(C)** Modelación de la estructura secundaria: Predicción de la estructura secundaria a partir de la secuencia seleccionada, evaluando su estabilidad y motivos de unión; **(D)** Verificación de las interacciones moleculares: Simulación y visualización de interacciones mediante ensayos de acoplamiento molecular para comprender la naturaleza de la unión; **(E)** Realización de ensayos experimentales: Validación *in vitro* del diseño *in silico* mediante experimentos para comprobar la efectividad de la interacción entre el aptámero diseñado y la molécula de interés.

-Predicción de la estructura secundaria: Después del diseño *in silico* inicial de los aptámeros candidatos es necesario predecir su estructura secundaria y tridimensional, así como realizar el análisis de los mismos para identificar posibles motivos de unión al blanco de interés (Fig. 2B). A partir del conocimiento de la estructura secundaria de los aptámeros y su

estabilidad termodinámica es posible modificar la secuencia de nucleótidos y recomenzar el análisis nuevamente (Vorobyeva *et al.*, 2018). El tipo de estructura secundaria es importante ya que se conoce que algunas de ellas facilitan más que otras las interacciones con el blanco de interés (Lee *et al.*, 2023). Por ejemplo, se ha reportado que las estructuras de tallo y burbuja o con asas internas permiten mejores interacciones de los aptámeros con sus blancos, comparadas con las que forman solamente una doble cadena o ramificaciones de doble cadena, las cuales las desfavorecen (Odeh *et al.* (2019). Estos análisis se realizan con diferentes herramientas de software como **Mfold** (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>), **RNAfold** (Lee *et al.*, 2023), **UnAFold** (<http://unafold.rna.albany.edu/>) y **Rosetta** (<https://www.rosettacommons.org/>) entre otros.

Verificación de las interacciones moleculares: Para evaluar las afinidades de unión de los aptámeros diseñados *in silico*, se emplean técnicas de simulación virtual (Buglak *et al.*, 2020). Entre ellas, se pueden incluir simulaciones de dinámica molecular, análisis de acoplamiento molecular (docking) y otras herramientas computacionales (Fig. 2C). En este estudio, la herramienta computacional más utilizada fue HADDOCK <https://rascar.science/haddock2.4/>

-Validación experimental: Para realizar la validación experimental se analizan las afinidades y especificidades de unión de los candidatos a aptámeros por las moléculas blanco sintetizándolos en el laboratorio (Ospina, 2020). Para validar las predicciones informáticas, en esta etapa se utilizan pruebas *in vitro* o *in vivo* (Fig. 2D). En esta fase igual que cuando se generan aptámeros por el método convencional de SELEX experimental se puede optimizar la selección de los aptámeros utilizando herramientas informáticas como **Apta-TRACE** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Przytycka/index.cgi#aptatool>) que combina datos de SELEX con datos de secuenciación masiva con el fin de seleccionar los aptámeros más afines al blanco de interés. De igual forma existen bases de datos como **SELEXdb** (<http://www.rnabiology.com/selexdb/>) que almacena información sobre experimentos de SELEX y las secuencias seleccionadas facilitando la selección de nuevos aptámeros.

Por último, sobre la base de los resultados de la validación experimental, se ajusta el diseño *in silico* y el procedimiento de selección según corresponda. Para mejorar el rendimiento del aptámero, podrían ser necesarias iteraciones del ciclo descrito anteriormente.

1.2.4 Los aptámeros de ADN y ARN

Las unidades monoméricas de los aptámeros pueden ser desoxirribonucleótidos los cuales forman aptámeros de ADN, o ribonucleótidos que forman aptámeros de ARN (Odeh *et al.*,

2019). Los aptámeros, tanto de ADN como de ARN, tienen ventajas y desventajas, así como aplicaciones específicas (Tabla 3). Los aptámeros de ARN pueden formar estructuras más complejas, y por tanto tener mayor afinidad y especificidad por sus blancos, que los de ADN, pero son más lábiles (Nimjee *et al.*, 2017).

Tabla 3.

Características de los aptámeros de ADN y ARN: Ventajas, Desventajas y Aplicaciones Específicas.

Característica	Aptámeros compuestos por	
	ADN	ARN
Composición	Secuencia constituida por desoxirribonucleótidos	Secuencia constituida por ribonucleótidos
Longitud	Típicamente de 20 a 100 nucleótidos	Típicamente de 30 a 100 nucleótidos
Estabilidad	Más estable debido a la desoxirribosa	Menos estable debido al grupo de 2'-hidroxilo de la ribosa
Complejidad estructural	Forma estructuras secundarias simples	Puede formar estructuras secundarias y terciarias complejas
Aplicaciones	Diagnóstico molecular, fármacos, terapia dirigida	Diagnóstico molecular, fármacos, terapia dirigida

(Nimjee *et al.*, 2017).

1.2.5 Las aplicaciones de los aptámeros

Debido a sus características distintivas y su capacidad para unirse a moléculas diana específicas, los aptámeros se utilizan en una amplia gama de aplicaciones incluidos el diagnóstico, la terapia y la investigación (Keane y Sadda, 2012). Algunas de estas aplicaciones son las siguientes:

Diagnóstico: Los aptámeros se pueden utilizar como instrumentos de diagnóstico para detectar biomarcadores o blancos particulares. Los aptámeros son útiles en el diagnóstico clínico, monitoreo ambiental y pruebas de seguridad alimentaria debido a su alta sensibilidad, selectividad y capacidad para reconocer una gran variedad de objetivos. (Ramos *et al.*, 2007).

Terapia: Debido a la capacidad de los aptámeros para unirse específicamente a moléculas como proteínas, receptores de superficie celular o patógena, los aptámeros tienen un gran potencial como agentes terapéuticos. Es posible diseñarlos para inhibir o controlar la actividad de sus moléculas blanco, lo que les permite actuar como inhibidores, agonistas o antagonistas

de las mismas (Nimjee *et al.*, 2017). Los aptámeros, como tienen baja inmunogenicidad, son fáciles de sintetizar y modificar químicamente para mejorar su estabilidad y farmacocinética, y se pueden utilizar como alternativas a los anticuerpos tradicionales (Ma *et al.*, 2023).

Entrega dirigida de medicamentos: Los aptámeros se pueden unir a nanopartículas, agentes terapéuticos o transportadores de fármacos para facilitar la administración dirigida de medicamentos a células o tejidos específicos (Liu *et al.*, 2022). Los aptámeros pueden mejorar la selectividad y la especificidad de los sistemas de administración de fármacos al unirse a los receptores o marcadores de la superficie celular. Este método reduce los efectos secundarios, la toxicidad sistémica e incrementa la eficacia terapéutica de los fármacos (OziAdiSaputra *et al.*, 2023).

Imágenes y detección: Los aptámeros se pueden utilizar como sondas moleculares en diferentes técnicas de generación de imágenes médicas de las estructuras y procesos dentro del organismo mediante métodos no invasivos (Ospina (2020b)). Estas moléculas se pueden marcar con compuestos fluorescentes, radioisótopos o agentes de contraste para identificar moléculas o estructuras relacionadas con enfermedades como el cáncer, los trastornos cardiovasculares y las enfermedades infecciosas (Dougherty *et al.*, 2015). (AbhishekFutane *et al.*, 2023).

Bioseparación y purificación: Los aptámeros se pueden utilizar para capturar y aislar moléculas específicas de mezclas complejas en procesos de bioseparación y purificación (Walter *et al.*, 2012). Los mismos se pueden inmovilizar en soportes sólidos o matrices de cromatografía para unir y separar específicamente sus moléculas blanco. Esto permite una purificación eficiente en aplicaciones como la purificación de proteínas, el desarrollo de fármacos y la preparación de muestras para técnicas analíticas (Beloborodov *et al.*, 2018).

Biosensores y aplicaciones analíticas: Se han desarrollado biosensores basados en aptámeros, o ensayos de flujo lateral o de inmovilización ligados a aptámeros (ALIA) para detectar y medir las moléculas blanco (Prabir Kumar Kulabhusan *et al.*, 2020). Las plataformas de biosensores pueden incorporar aptámeros para detectar moléculas blanco en tiempo real. Los biosensores basados en aptámeros permiten la detección rápida y sensible de analitos al combinar aptámeros con transductores, como dispositivos electroquímicos, ópticos o sensibles a los cambios de masa (Aslan *et al.*, 2023. Van Tang Nguyen *et al.*, 2017).

Herramientas de investigación: Los aptámeros son útiles para el estudio de la función y la interacción de las biomoléculas (Yoon y Rossi, 2018). Se pueden utilizar para estudiar las relaciones entre la estructura y la función de las proteínas, buscar blancos en proteínas de interés, modular las vías de señalización celular y estudiar los procesos celulares. Los aptámeros también se pueden utilizar para validar objetivos farmacológicos. (Team, 2007).

Administración de fármacos: Los aptámeros se pueden acoplar a transportadores de fármacos o nanopartículas para dirigirse específicamente a células o tejidos que sobreexpresan proteínas de interés. Este tipo de administración focalizada de medicamentos puede mejorar la efectividad del tratamiento y al mismo tiempo reducir los efectos negativos.

Estos son solo algunos ejemplos de las muchas formas en que los aptámeros se pueden usar. Las herramientas basadas en aptámeros son atractivas para una amplia gama de aplicaciones en medicina, biotecnología, diagnóstico e investigación debido a la versatilidad, especificidad y facilidad de síntesis de estas moléculas. Las aplicaciones potenciales de los aptámeros y su impacto en una variedad de campos siguen siendo objeto de investigación y desarrollo en curso (Zhang *et al.*, 2019).

1.3 Antecedentes particulares

En un proyecto previo del grupo de trabajo se seleccionaron aptámeros de ADN que reconocían a la proteína MCP-1. A través del proceso de SELEX se seleccionaron ocho aptámeros, designados como M1-M8, que al determinarle su secuencia nucleotídica se agruparon en tres grupos diferentes denominados M146, M57 y M8 (Alejandra Sánchez Espinosa, 2019). [Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma de la Ciudad de México].

El análisis *in silico* de las interacciones entre cada aptámero y el monómero de la proteína MCP-1, reveló que M146 y M8 presentaban cuatro regiones de contacto con la proteína, además de un valor de energía similar durante su interacción con la proteína. En contraste, el aptámero M57 compartía una región de contacto con el aptámero M146 y demostró una estabilidad del complejo aptámero-proteína y patrones de interacciones desfavorables que se asemejaron a los de este último (Alejandra Sánchez Espinosa, 2019). [Tesis de licenciatura Universidad Autónoma de la Ciudad de México]. En consecuencia, esos hallazgos sugirieron que cualquiera de los tres aptámeros podría ser un buen candidato para su posterior evaluación *in vitro* contra la proteína MCP-1. Por otra parte, MCP-1 es una proteína que en condiciones fisiológicas se encuentra formando un equilibrio entre su forma monomérica y su

forma dimérica (Alejandra Sánchez Espinosa.2019). Tesis de licenciatura Universidad Autónoma de la Ciudad de México]. Sin embargo, no se evaluó si los aptámeros M146, M57 y M8 eran capaces de interactuar con la forma dimérica de MCP-1, lo cual sería importante para poder utilizarlos como reactivo para cuantificar esa proteína *in vitro* o incluso utilizarlos con fines terapéuticos.

1.3.1 La proteína MCP-1y su cuantificación

La proteína MCP-1, también conocida como CCL2 (ligando de quimiocina con motivo CC2), es una quimiocina, miembro de la subfamilia C-C, capaz de producir quimiotaxis de monocitos y células endoteliales, y producir señales que pueden afectar la proliferación celular y promover la angiogénesis (Palomino y Marti, 2015).

Las quimiocinas son polipéptidos de bajo peso molecular (7-15 kDa) estructuralmente relacionadas (Palomino y Marti, 2015). Las cuales fueron originalmente caracterizadas por su capacidad para producir quimiotaxis de leucocitos y células endoteliales. En situaciones fisiológicas o en respuesta a citoquinas o señales inflamatorias (Palomino y Marti, 2015), las células normales como las endoteliales, musculares y macrófagos pueden producir MCP-1/CCL2 (Palomino y Marti, 2015).

De forma general, los niveles de MCP-1 se relacionan con los procesos inflamatorios y las respuestas inmunológicas. De ahí que MCP-1 es considerada un biomarcador importante para una serie de enfermedades, incluido el cáncer, los trastornos autoinmunes y las enfermedades cardiovasculares (Gupta *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la sobreexpresión de MCP-1 contribuye a la patogénesis y progresión de la aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedades renales crónicas, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y enfermedad inflamatoria intestinal (EII), complicaciones vasculares de la diabetes mellitus, entre otras (NatsumiMasai *et al.*, 2010, Wang, 2013, Geng *et al.*, 2022).

MCP-1también es un objetivo de interés en la investigación farmacológica para desarrollar tratamientos potenciales destinados a controlar la inflamación, por lo que se utilizan técnicas de detección y cuantificación de esta proteína para evaluar la efectividad de los medicamentos antiinflamatorios determinando qué tan bien reducen los niveles de MCP-1 (Calder *et al.*, 2013).

Las concentraciones de MCP-1 en muestras biológicas como sangre o tejido se pueden determinar mediante técnicas de detección de proteínas como el ELISA. Por otra parte, la investigación en inmunología utiliza métodos como la citometría de flujo y ELISA para

identificar y medir MCP-1 en muestras de tejido o cultivos celulares (Evanoff *et al.*, 1992). La cuantificación de MCP-1 permite incrementar el conocimiento sobre las respuestas inmunes y la creación de inmunoterapias al discernir la función de MCP-1 en el reclutamiento de células inmunes y la inflamación. Por otra parte, la detección y cuantificación de niveles elevados de MCP-1 pueden servir como marcador de trastornos particulares, facilitando el diagnóstico temprano y el tratamiento del paciente (Deshmane *et al.*, 2009).

MCP-1 también está relacionada con el crecimiento y la propagación de tumores, según las investigaciones sobre el cáncer (Yoshimura *et al.*, 2023). Para caracterizar la función de MCP-1 en el desarrollo del cáncer, se cuantifica la expresión de la proteína en tejidos tumorales. La evaluación de los niveles de MCP-1 puede ser útil para determinar el pronóstico de un paciente y las posibles opciones de tratamiento.

Los individuos con enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide o aterosclerosis con frecuencia también tienen niveles elevados de MCP-1 (Deshmane *et al.*, 2009). El seguimiento del desarrollo de la enfermedad y la evaluación de la eficacia de la terapia antiinflamatoria dependen en gran medida de la cuantificación de MCP-1 utilizando técnicas de detección de proteínas convencionales. De todo lo anterior se deriva la importancia de detectar y cuantificar MCP-1 en células, tejidos y fluidos biológicos.

1.3.2 Los métodos convencionales de cuantificación de MCP-1 *in vitro*

En la actualidad existen diversos ensayos comerciales basados en la técnica de ELISA para medir los niveles de MCP-1 (Tabla 4). Estos ensayos son de tipo sándwich y competitivo y todos tienen un límite de detección en el orden de los picogramos (Tabla 4). Los objetivos particulares del estudio, el equipo disponible y el tipo de material (como suero, lisados de tejido o sobrenadante de cultivo celular) influyen en la técnica elegida. Luminex y ELISA son dos de las técnicas más utilizadas para cuantificar MCP-1 debido a su simplicidad, sensibilidad y especificidad (Tabla 4).

Tabla 4.

Kits para la detección de MCP-1 que se comercializan en la actualidad.

Marca comercial	Fundamento	Nivel de Detección	Casa comercial
R&D systems (bio-techné) MCP-1	ELISA tipo sándwich en fase sólida (muestras provenientes de sobrenadantes de cultivo celular, suero, plasma con anticoagulantes, orina)	10 pg/mL	R&D Systems Kit
BD Biosciences MCP-1	ELISA para MCP-1 de ratón natural o recombinante (muestras provenientes de sobrenadantes de suero, plasma y cultivos celulares)	≥ 10 ng/mL y no se identificó reactividad cruzada (valor ≥ 4 pg/mL)	BD Biosciences Kit
Thermo Fisher Scientific MCP-1	ELISA tipo sándwich	2.3 pg/mL	Thermo Fisher Kit
Abcam MCP-1	ELISA tipo sándwich (cuantitativo)	1.26 pg/ml	Abcam Kit
Bio Legend MCP-1	ELISA tipo sándwich para detectar MCP-1 humana	1.6 pg/mL	Bio Legend Kit
Cayman Chemical MCP-1	ELISA tipo sándwich	≤3.8 pg/ml	Cayman Chemical
Merck (Millipore Sigma) MCP-1	ELISA Colorimétrico	1.17 pg/mL - 300 pg/mL	Merck (MilliporeSigma)

1.3.3 El desarrollo de aptámeros comerciales contra MCP-1

En la actualidad, existen siete aptámeros contra MCP-1, todos compuestos por ARN. La mayoría de ellos están disponibles comercialmente para investigación, pero su uso aún no está aprobado para diagnóstico o tratamiento en medicina humana o animal (López-Botet, *et al.*, 2011).

De estos aptámeros, dos (ADR7 y ADR22) fueron generados contra MCP-1 de ratón (Rhodes *et al.*, 2001). Sin embargo, solo el aptámero ADR7 es comercializado por la empresa Aptagen (MCP-1 (ADR7) - APTAGEN Labs), probablemente debido a su mayor afinidad por el blanco, con un Kd de 180 pM (Tabla 5).

Tabla 5.
Aptámeros comerciales contra MCP-1.

Parámetros	Aptámeros contra MCP-1						
	ADR7	ADR22	CTApt-M-1055	CTMM-0124-JS8	CTApt-798	CTMM-0124-LH7	NOX-E36
Composición	2'-F-RNA	RNA	2'-F-RNA	RNA	ADN/RNA	RNA	L-RNA, pegilado
Objetivo	MCP-1 de ratón	MCP-1 de ratón	MCP-1 humana y sus receptores	MCP-1 humana y de ratón	MCP-1 humana y sus receptores	MCP-1 humana y de ratón, y sus receptores	MCP-1 humana
Afinidad (Kd)	180 pM	370 pM	<200 pM	50-200 nM	1 nm-1µM	50-200 pM	1.32 Nm
Longitud	70 nt	ND	60-80 nt	50-200 nt	20-80 nt	50-100 nT	40 nt
Peso Molecular	22580.5 g/mol	ND	22580.g/mol	21089.62 g/mol	ND	16404.7 g/mol	ND
Contenido de GC	62.86%	ND	62.86%	59.15%	ND	59.62%	ND

<https://www.creative-biolabs.com/complement-therapeutics/googlesearch?key=MCP-1&ty=google>

La compañía Creative Biolabs comercializa cuatro aptámeros de RNA dirigidos contra MCP-1 humana, y algunos de ellos también reconocen MCP-1 de ratón y sus receptores celulares (Tabla 5). Los aptámeros son los siguientes:

CTApt-M-1055, CTMM-0124-JS8, CTApt-798, CTMM-0124-LH7

De estos aptámeros, es importante destacar los siguientes:

CTApt-798: Es una mezcla de moléculas de ADN y RNA. Sin embargo, su afinidad es muy baja, con un Kd de 1 nm a 1 µM (Tabla 5), lo que lo hace ineficiente para la mayoría de las aplicaciones. <https://www.creative-biolabs.com/complement-therapeutics/target-ccl2-722.htm>.

CTMM-0124-LH7: Este aptámero no solo reconoce MCP-1 humana y de ratón, y sus receptores, sino que también tiene el menor Kd (50-200 pM) (Tabla 5), por lo que es el mejor candidato para desarrollar ensayos *in vitro* de detección y cuantificación de MCP-1 humana. Más información. <https://www.creative-biolabs.com/complement-therapeutics/target-ccl2-722.htm>.

Otro aptámero relevante contra MCP-1 es **NOX-E36**, un estereoisómero L de RNA conjugado a polietilenglicol, diseñado para evitar su reconocimiento por el sistema inmune. Este aptámero se une y neutraliza MCP-1 humana, así como tres quimiocinas altamente relacionadas, con un Kd de 1.32 nM (Kulabhusan *et al.*, 2020).

NOX-E36 ya ha sido desarrollado ensayos como un producto inyectable y ha completado las fases 1 y 2 de estudios clínicos para su uso como terapéutico en humanos. Se ha establecido que NOX-E36 es capaz de unirse a macrófagos de forma dosis dependiente y se evaluó su seguridad y tolerabilidad en alrededor de 100 individuos. (https://www.tmepharma.com/index.php?option=com_content&view=article&id=20&Itemid=477)

La firma TMEpharma está conduciendo estudios para la aplicación de NOX-E36 en oncología, basándose en datos preclínicos que muestran su actividad en modelos de tumores sólidos de páncreas, hígado. (https://www.tmepharma.com/index.php?option=com_content&view=article&id=20&Itemid=477)

Los aptámeros desarrollados hasta el momento contra MCP-1 tienen la desventaja de que están constituidos por RNA, por lo que son más lábiles y químicamente menos estables que si estuvieran constituidos por ADN (Tabla 5). La síntesis de aptámeros de ADN es más sencilla y económica que la de aptámeros de RNA, al igual que la adición de etiquetas para mejorar su sensibilidad y versatilidad en distintas técnicas de detección, por ejemplo microarreglos (Song *et al.*, 2012). Por otra parte, los aptámeros de ADN tienden a formar menos estructuras secundarias no deseadas en comparación con los aptámeros de RNA, lo cual mejora la sensibilidad y la reproducibilidad en las mediciones al contribuir a una mayor uniformidad en la interacción aptámero-proteína (Song *et al.*, 2012). Los aptámeros de ADN también tienen otras ventajas como que pueden ser amplificados directamente mediante PCR o ser integrados fácilmente a otras plataformas de detección ya existentes, y tienen menor potencial inmunogénico sin que haya que realizarles modificaciones de bases (Tabla 3).

No obstante debe señalarse que los aptámeros de ADN son susceptibles a interactuar de forma no específica con proteínas presentes en la muestra biológica (Song *et al.*, 2012), por lo que es importante optimizar las condiciones experimentales y seleccionar cuidadosamente sus secuencias para minimizar los falsos positivos en el desarrollo y aplicación de aptámeros de ADN.

De forma general las ventajas de los aptámeros de ADN con respecto a los de RNA los convierten en una alternativa más simple y por tanto más atractiva y efectiva para abordar las necesidades de detección de macromoléculas en investigaciones biomédicas y aplicaciones clínicas de los aptámeros.

2. JUSTIFICACION

La inflamación desempeña un papel crítico en numerosas enfermedades, como enfermedades cardiovasculares, metabólicas, autoinmunitarias y neurodegenerativas. MCP-1, es una quimiocina que se ha identificado como un mediador clave en la respuesta inflamatoria al reclutar monocitos y macrófagos al sitio de la inflamación. La capacidad de MCP-1 para modular la inflamación la convierte en un objetivo prometedor para el desarrollo de terapias dirigidas y estrategias de diagnóstico.

Hasta el momento no existen aptámeros de ADN comerciales que sean capaces de unirse con alta sensibilidad y especificidad a MCP-1 y los métodos convencionales, aunque son eficientes para detectar y cuantificar esta quimiocina mediante ELISA poseen las desventajas asociadas a la generación y uso de anticuerpos.

El desarrollo de aptámeros de ADN contra MCP-1 permitirá desarrollar en un futuro reactivos de diagnóstico o de tratamiento a un menor costo y de forma más simple que como se realiza en la actualidad.

2.1 Hipótesis

La selección combinada, *in silico* e *in vitro*, de la secuencia de aptámeros contra MCP-1 genera moléculas con la afinidad requerida para detectar MCP-1 *in vitro* a nivel picomolar.

2.2 Objetivo general

Optimizar y estandarizar la detección de MCP-1 humana *in silico* e *in vitro*, respectivamente, mediante aptámeros de ADN.

2.3 Objetivos específicos

1-Verificar y caracterizar *in silico* las interacciones de los aptámeros M146, M57 y M8 con MCP-1 humana.

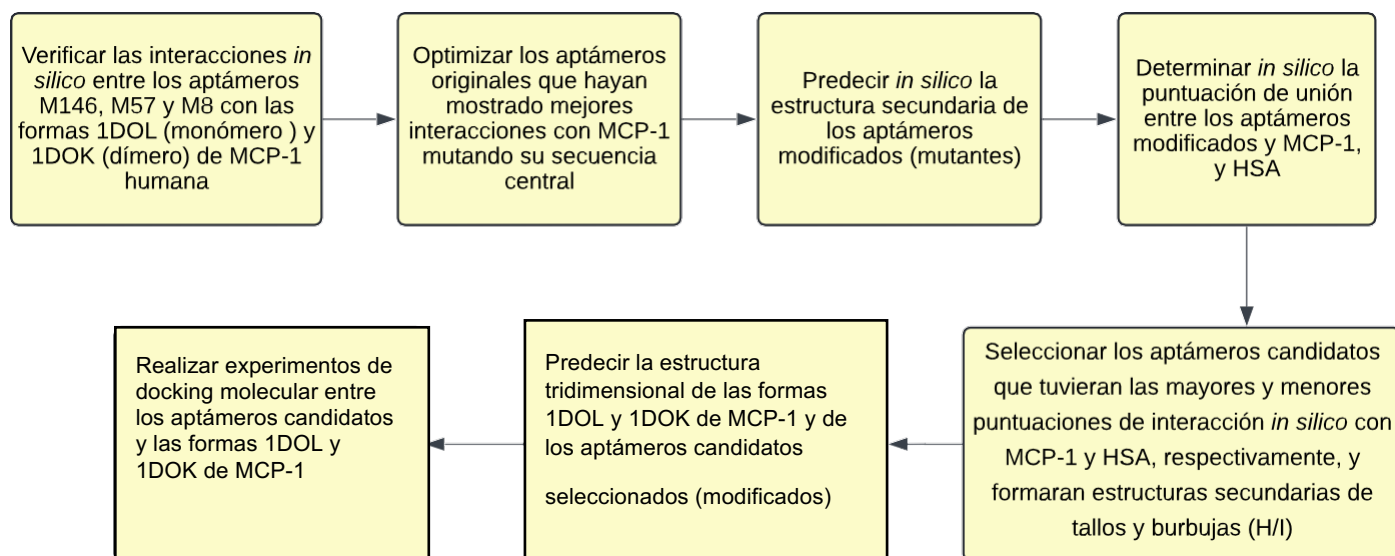
2-Modificar *in silico* la secuencia de los aptámeros M146, M57 y M8 para optimizar las interacciones con MCP-1 humana.

3-Determinar la constante de afinidad de los aptámeros modificados.

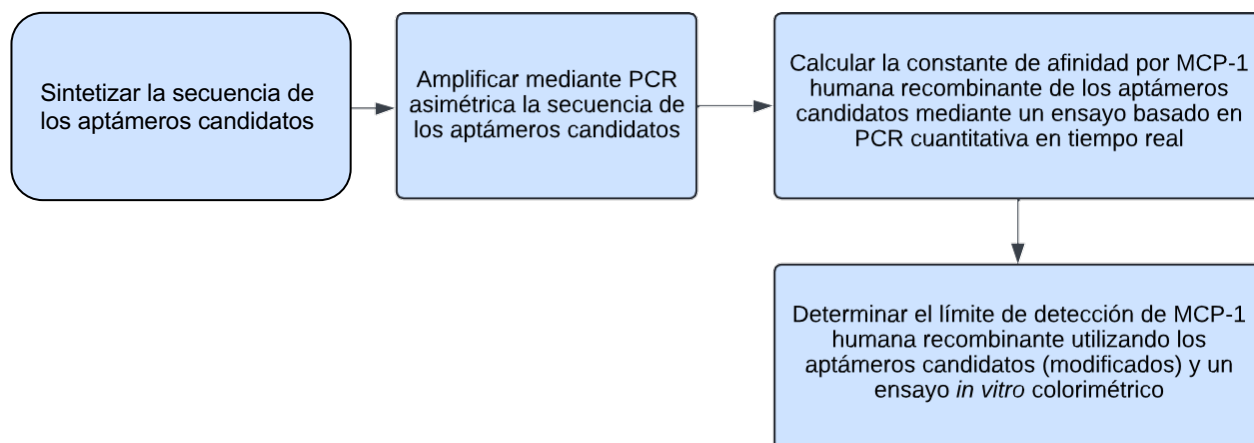
4-Evaluar la detección de MCP-1 humana *in vitro* utilizando los aptámeros modificados.

2.4 Estrategia experimental

Análisis *in silico*



Análisis *in vitro*



2.5 Materiales y Métodos

2.5.1 Secuencia de los aptámeros candidatos M146, M57 y M8 evaluados

Las secuencias de los aptámeros candidatos M146, M57 y M8 seleccionados por su afinidad por MCP-1 y por no reconocer a HSA (Alejandra Sánchez Espinosa, 2019). [Tesis de licenciatura Universidad Autónoma de la Ciudad de México] se utilizaron para simular sus interacciones con el monómero y el dímero de MCP-1 y obtener *in silico* nuevos aptámeros optimizados. Los tres aptámeros cuentan con 20 nucleótidos en cada extremo para amplificarlos mediante PCR y 33 (M146) ó 40 (M57 y M8) nucleótidos centrales (N) diferentes (5'-GTATGTCTGATACTCTGTGA-N-AGTCACTGGATCTAACATTA-3'). La secuencia central (N) de cada uno de los aptámeros evaluados es la siguiente:

M146: 5'- ATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAG-3'

M57: 5'-CCGGCAGTCACTGGATCTAACATTAATCTTTCTAGAAGAT-3'

M8: 5'-CCGGCAGTCACTGGATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATA-3'

2.5.2 Caracterización de las interacciones de M146, M57, M8y los aptámeros derivados de ellos con las formas monomérica y dimérica de MCP-1 humana

Para simular las interacciones entre M146, M57, M8 y los aptámeros derivados de ellos (aptámeros optimizados) con la proteína MCP-1 se obtuvieron las estructuras cristalinas de la forma monomérica (1DOL) y dimérica (1DOK) de MCP-1 en el sitio web de RCSB PDB (<https://www.rcsb.org>).

Las estructuras tridimensionales de todos los aptámeros caracterizados, se obtuvieron empleando el servidor web 3dRNA/ADN (Wang *et al.*, 2019; <http://biophy.hust.edu.cn/3dRNA>). Los modelos 3D de las secuencias de aptámeros se acoplaron a cada estructura de MCP-1 mediante el servidor web HADDOCK (<https://wenmr.science.uu.nl/haddock2.4/submit/1>). La puntuación de energía y los valores de RMSD de cada par de acoplamiento se registraron y analizaron para evaluar las interacciones proteína-aptámero.

2.5.3 Verificación *in silico* de la interacción de los aptámeros M146, M57 y M8 y los aptámeros derivados de ellos (optimizados) con MCP-1 y HSA

La interacción potencial de los aptámeros M146, M57 y M8 y de los aptámeros optimizados, con MCP-1 y HSA se evaluó *in silico* utilizando el servidor web PPAI 1.0 (<http://39.96.85.9/PPAI/>) con los parámetros predeterminado (Li *et al.*, 2020). Se estableció una puntuación umbral de 0.5 para seleccionar las secuencias con mejor afinidad (interacción) por los blancos evaluados.

2.5.4 Optimización *in silico* de las secuencias de los aptámeros M146, M57 y M8

Para incrementar la sensibilidad y especificidad de los aptámeros originales (M146, M57 o M8) por MCP-1 se realizaron cambios de bases aleatorios dentro de la región variable de la secuencia de aquellos aptámeros que tuvieran las mayores y menores puntuaciones de interacción *in silico* con MCP-1 y HSA, respectivamente. Para generar las mutantes *in silico* se utilizó el servidor 'Sequence Manipulation Suite: Mutate ADN' (https://www.bioinformatics mutate_ADN.html.) Se mutó de forma aleatoria hasta el 35% de la secuencia original de cada aptámero seleccionado, y se generaron 50 mutantes de cada uno de ellos. Se modelaron las estructuras secundarias de cada una de las mutantes generadas utilizando el servidor RNAFold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). Se seleccionaron aquellas secuencias que generaran estructuras secundarias del tipo H/I y que tuvieran las mayores y menores puntuaciones de interacción *in silico* con MCP-1 y HSA, respectivamente.

2.5.5 Síntesis y verificación de los aptámeros optimizados

Las secuencias de oligonucleótidos de cadena sencilla de los nuevos aptámeros optimizados se enviaron a sintetizar y purificar por métodos estándar (Uniparts). Para asegurar la integridad y pureza de los aptámeros sintéticos, se verificó el tamaño de los mismos amplificándolos mediante PCR y realizándoles electroforesis en gel de poliacrilamida y en gel de agarosa a los productos de la amplificación. Como marcador de tamaño molecular se utilizaron las escaleras de ADN bicatenario (ladder) de 25, 50 ó 100 pb (Sigma aldrich).

2.5.6 Obtención de moléculas de doble cadena de los aptámeros seleccionados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los aptámeros optimizados se realizó mediante PCR. Específicamente, se preparó un volumen de reacción de 25 μL , utilizando 2.6 μM del molde a amplificar y 0.2 μM de cada cebador directo y reverso de los extremos de los aptámeros en la disolución MasterMix 1X (Roche, Cat. 11636103001). Los cebadores en dirección directa y reversa con las secuencias 5'-GTATGTCTGATACTCTGTGA-3' y 5'-TAATGTTAGATCCAGTGACT-3', respectivamente, se sintetizaron acoplados y no acoplados a biotina (Uniparts).

Las condiciones de la PCR comprendieron la desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguida de 40 ciclos que consistieron en la desnaturalización a 95 °C durante 3 segundos, seguidos por un paso único de alineamiento/extensión 60 °C durante 15 segundos. Posteriormente el producto de la reacción se conservó a 4 °C. El tamaño de los productos de la reacción se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.5.7 Obtención mediante PCR asimétrico de moléculas de cadena sencilla de los aptámeros seleccionados

Para obtener ADN de cadena sencilla de cada uno de los aptámeros seleccionados se utilizó la técnica de PCR asimétrico. Se ensayaron diferentes cantidades de cebadores en la reacción en sentido directo y reverso utilizando las mismas condiciones de ciclos y temperaturas utilizadas para amplificar la biblioteca 2Apt descritas en el acápite anterior. La relación entre cebador directo: reverso fue variada de 50:1 a 20:1. Se ensayaron diferentes concentraciones del molde de aptámero (1.3 – 5.2 μM), y se monitoreó la cantidad de producto de PCR en la reacciona diferentes cantidades de ciclos.

También se ensayaron gradientes de temperatura de 95 a 65°C en pasos de 5-10°C manteniendo el resto de las condiciones de PCR constantes con el fin de eliminar realineamientos incorrectos entre los cebadores y el molde de aptámero

Para marcar los aptámeros con biotina se añadieron a la reacción los cebadores marcados con biotina en las mismas concentraciones que se utilizaron los cebadores sin marcar y en las condiciones estandarizadas para obtener ADN de cadena sencilla. El tamaño de los productos de la reacción se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para realizar los ensayos

experimentales con los aptámeros optimizados se verificó la obtención de cadena sencilla de cada uno de ellos utilizando el procedimiento de PCR asimétrico previamente estandarizado.

2.5.8 Electroforesis en gel de agarosa para el análisis de los productos de la amplificación por PCR

Se realizó electroforesis en gel de agarosa para analizar los productos de amplificación mediante la PCR de los aptámeros obtenidos. Para ello se preparó un gel de agarosa al 4% en tampón SuperBuffer 1X (0.01mM NaOH, 36.4mM ácido bórico). Cada pozo del gel se cargó con 10 µL de la reacción de PCR.

La electroforesis se llevó a cabo en una mini cámara de electroforesis (Mini-Sub® Cell GT de Bio-Rad) utilizando tampón SuperBuffer 1X. La cámara se sometió a una corriente eléctrica constante de 100 voltios durante una 20-30 min para permitir la migración de los fragmentos de ADN a través del gel.

2.5.9 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Para analizar la integridad y tamaño de los aptámeros se analizaron en geles de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 30:1) al 12% en TBE 0.5 X (44.5 mM Tris base, 44.5 mM ácido bórico y 1 mM de EDTA, pH 8.3) aplicando un voltaje de 100 V por 1 hora. Cada pozo del gel se cargó con 10 µL de la reacción de PCR.

2.5.10 Tinción y visualización de los aptámeros en geles de agarosa y poliacrilamida después de la electroforesis

Para la tinción de los ácidos nucleicos, a la muestra se le añadió "GelRed", en una proporción de 1/10 000, antes de cargarla en el gel de agarosa o poliacrilamida. Una vez finalizada la electroforesis, se visualizaron y documentaron los patrones bandas de ADN en el gel utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad, modelo: ChemiDoc).

2.5.11 Inmovilización de la proteína MCP-1 y HSA en un soporte sólido

Se inmovilizó MCP-1 humana recombinante (Kit Human MCP-1/CCL2, BioLegend, cat: 438805) y HSA (Sigma, ≥96%, Lot: SLBV2587) en los pozos de una placa de ELISA de poliestireno de fondo plano de acuerdo a lo descrito previamente (Alejandra Sánchez Espinosa, 2019). [Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma de la Ciudad de México] Cada una de las proteínas se diluyeron a una concentración de 75 pg/ml de buffer carbonato-bicarbonato (0.1 M carbonato de sodio, 0.1 M bicarbonato de sodio, pH 9.6) y se recubrió cada pozo de la placa con 100 µL de esa disolución, y se incubaron durante 16h a 4°C. A

continuación se eliminó el buffer de recubrimiento y cada pozo se lavó cuatro veces con 100 μ L de PBS IX (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) a temperatura ambiente durante 5-10 minutos con agitación gentil. Como control negativo se recubrieron los pozos de la placa con 100 μ L de buffer carbonato-bicarbonato y se sometieron al mismo proceso que los pozos recubiertos con las muestras de proteínas.

Las microplacas se conservaron a 4 °C por menos de 24 h añadiendo en cada pozo 200 μ L de PBS 1X.

2.5.12 Predicción de la afinidad de Unión y la constante de disociación de los complejos MCP-1-aptámeros optimizados

La predicción de la afinidad de unión del complejo MCP-1/Aptámero, obtenido mediante el acoplamiento molecular, se llevó a cabo utilizando el servidor PreDBA (ang W, Deng L. PreDBA: A hetero gene ous ensemble approach for predicting protein- ADN binding affinity. Sci Rep. 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-57778-1) (<http://predba.denglab.org/>), que emplea un método computacional basado en un algoritmo de aprendizaje automático. El valor de ΔG obtenido se utilizó como entrada de datos para calcular la constante de disociación en el servidor web NovoPro (<https://novoprolabs.com/tools/deltag2kd>) a una temperatura 298 K.

2.5.13 Cálculo de la Kd de los aptámeros optimizados mediante ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real

Los pozos de la placa de ELISA recubiertos con MCP-1 se incubaron con 100 μ L de cada uno de los aptámeros optimizados disueltos en PBS 1X a diferentes concentraciones (0, 15.8, 31.6, 63.2, 126.4 y 252.8 nM) durante 3 horas a 4 °C. A continuación, se realizó PCR cuantitativa en tiempo real a la disolución de aptámeros de cada una de las diluciones preparadas y a la muestra recuperada de cada pozo a las correspondientes concentraciones. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando 5 de los aptámeros recuperados o de las correspondientes disoluciones de aptámeros antes de interactuar con MCP-1, 5 μ L de SYBR-Green PCR MasterMix (Agilent Technologies, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.), y 1 μ M de cada cebador apt2, directo y reverso, en un volumen final de 25 μ L.

La reacción de PCR cuantitativa se realizó en un Rotor-GeneQMDx 5plex HRM (CA) aplicando 95 °C durante 3 min y 40 ciclos a 95 ° C durante 3 segundos y 60 ° C durante 15 segundos. Para determinar la cantidad de aptámeros presentes en cada muestra se utilizó el método descrito por Ramakers y cols (Ramakers *et al.*, 2003). El cual estima la cantidad de producto (Nc) después de C ciclos mediante la fórmula:

$$\log(N_c) = \log(N_0) + \log(E) \times C$$

Donde N_0 y E son la cantidad inicial de ADN y la eficiencia de amplificación, respectivamente y se estiman de la curva de regresión de la región lineal de los datos de fluorescencia transformados [$\log(\text{fluorescencia})$ vs ciclos], como: $N_0 = 10^{\text{intercepto}}$ y $E = 10^{\text{pendiente}}$.

La fracción de aptámeros unida a MCP-1 después de la interacción entre estas moléculas se estimó como $(\text{apt}_{\text{stock}} - \text{apt}_{\text{recuperado}}) / \text{apt}_{\text{stock}}$ donde $\text{apt}_{\text{stock}}$ es la cantidad de aptámeros en la disolución original (antes de interactuar con la proteína) y $\text{apt}_{\text{recuperado}}$, la presente en las disoluciones de aptámeros recuperadas (después de interactuar con la proteína) de cada pozo de la placa a las concentraciones correspondientes. Los datos se graficaron como fracción del total unida contra concentraciones de aptámeros ensayadas y la K_d se estimó utilizando un modelo de unión específica con pendiente de Hill.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.5.14 Ensayo de interacción de aptámeros con MCP-1 y HSA en un soporte sólido

La interacción entre los aptámeros y la proteína MCP-1 o HSA se evaluó en una placa de ELISA de poliestireno de 96 pozos con fondo plano (Corning, cat: 3599). Se recubrió la superficie de cada pozo de la placa de ELISA con diferentes concentraciones de MCP-1 o HSA (25-300 pg), utilizando el procedimiento descrito en el acápite **2.5.11**. A continuación se puso a interactuar, por separado, 10 μL de una disolución 257 μM de cada uno de los aptámeros M146_47 y M57_32 marcados con biotina, disueltos en PBS 1X, durante 3h a 4°C. Posteriormente se eliminó la disolución de aptámeros y los pozos se lavaron cuatro veces con 100 μL de TE-100X (10 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0) durante 10 min a temperatura ambiente. Para detectar los complejos aptámero/MCP-1 o aptámero/HSA se incubaron los pozos de la placa durante 1h a 4°C con 50 μL del conjugado estreptavidina–peroxidasa (1 mg/ml, Sigma-Aldrich), disuelto 1:50000 en PBS 1X. Al final de la incubación se eliminó el conjugado y se añadió 100 μL de una disolución 0.1 mg /ml de 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB), disuelta al momento de utilizarse, en tampón fosfato-citrato (26.5 mM ácido cítrico, 52.6 mM Na_2HPO_4 , pH 5.0), más 1:5000 μL de H_2O_2 al 30 %, y se incubó hasta que la reacción desarrolló color en cuyo momento se detuvo con 50 μL de H_2SO_4 2N. Por último, las placas se leyeron en un lector de placa a 450 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

2.5.15 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como media \pm error estándar. Para la estimación de la cantidad inicial de aptámeros en los ensayos de RT-PCR el ajuste de la curva de regresión de la región lineal de los datos de fluorescencia transformados versus el número de ciclos de amplificación se realizó mediante el método de los mínimos cuadrados seleccionándose la recta de menor error residual y mejor ajuste al modelo. El ajuste de la pendiente de Hill se realizó mediante el método de los mínimos cuadrados. Todos los análisis se realizaron por triplicado a un nivel de significación de 0.05. Para la realización de estos análisis se utilizó el software GraphPadPrism 8.0.

3. Resultados

3.1 Evaluación *in silico* de las interacciones de los aptámeros M146, M57 y M8 con la proteína MCP-1 humana

Para evaluar la interacción entre los aptámeros M146, M57 y M8 con la proteína MCP-1 humana se realizaron experimentos de acoplamiento molecular (‘docking molecular’) entre las estructuras tridimensionales de estos aptámeros y la de las formas monomérica y dimérica de MCP-1.

Los resultados del acoplamiento revelaron que los tres aptámeros (M146, M57 y M8) pueden interactuar tanto con la forma monomérica como dimérica de la proteína MCP-1 (Tabla 6, Fig.3-4). Este resultado es importante debido a que MCP-1 es una quimiocina con motivos de unión a ligandos del tipo C-C (CCL2), la cual existe en equilibrio entre las formas monomérica y dimérica (Tan *et al.*, 2012).

El complejo más estable con el monómero fue MCP-1/M8, el cual obtuvo el puntaje de energía más elevado y la estructura era mantenida por 10 puentes de hidrógeno (Tabla 6, Fig. 3). En el complejo formado se establecieron 21 interacciones aminoácidos/nucleótidos, incluidos siete pseudoenlaces con el monómero de MCP-1 (Tabla 6, Fig. 3). Todas las interacciones de la proteína ocurrieron con los nucleótidos 26-51, los cuales están ubicados en la región variable (40N) de M8 (Tabla 6, Fig. 3).

En el caso de M146 y M57 los puntajes de energía del complejo formado con el monómero de MCP-1 fueron similares, pero con M146 solamente se formaron cuatro puentes de hidrógeno y la mayoría de las interacciones ocurrieron en la región constante de este aptámero y que es común a M8 y M57 (Tabla 6, Fig. 3). Por el contrario, la mayoría de las interacciones entre M57 y el monómero de MCP-1 ocurrieron en la región 40N de ese aptámero (Tabla 6, Fig. 3). Los aptámeros M146 y M57 establecieron 20 y 19 contactos con el dímero de MCP-1, respectivamente y tuvieron un puntaje de energía y formaron una cantidad similar de puentes de hidrógeno. Sin embargo, el complejo M146/MCP-1 presentó menor cantidad de pseudoenlaces y mayor número de interacciones no favorables ('clashes') (Tabla 6, Fig.4). El complejo formado entre M8 y el dímero de MCP-1 mostró el mejor puntaje de energía, la mayor cantidad de puentes de hidrógeno estabilizando la estructura, ausencia de interacciones desfavorables y 10 pseudoenlaces entre las dos moléculas. Estos pseudoenlaces se establecieron con la región central (40N) del aptámero (Tabla 6, Fig.4).

La interfase ADN/proteína en los complejos formados por M146, M57 y M8 siempre estuvo compuesta principalmente por aminoácidos polares, cargados negativa o positivamente (Tabla 6, Fig. 3-4). En consecuencia, las interacciones entre los aptámeros evaluados y MCP-1 no deben estar determinadas por la secuencia de bases de los aptámeros sino por la estructura tridimensional que ellos adoptan, tal y como ha sido reportado (Sullivan *et al.*, 2019).

De acuerdo con la naturaleza de los aminoácidos participando en las interacciones moleculares es probable que también se establezcan interacciones débiles del tipo Fuerzas de Van der Waals y enlaces iónicos.

Por otra parte, los resultados obtenidos sugirieron que M146 y M8 comparten más interacciones con la forma monomérica de MCP-1 que M146 y M57 o M57 y M8 (Tabla 6). Los pares de aptámeros que compartieron menos interacciones con la forma dimérica de MCP-1 fueron M146 y M8 o M57 y M8 (Tabla 6). Este hallazgo también sugirió que los mencionados pares de aptámeros interactúan con diferentes zonas de la proteína y pudieran ser usados en ensayos de detección de MCP-1 tipo ELISA sándwich.

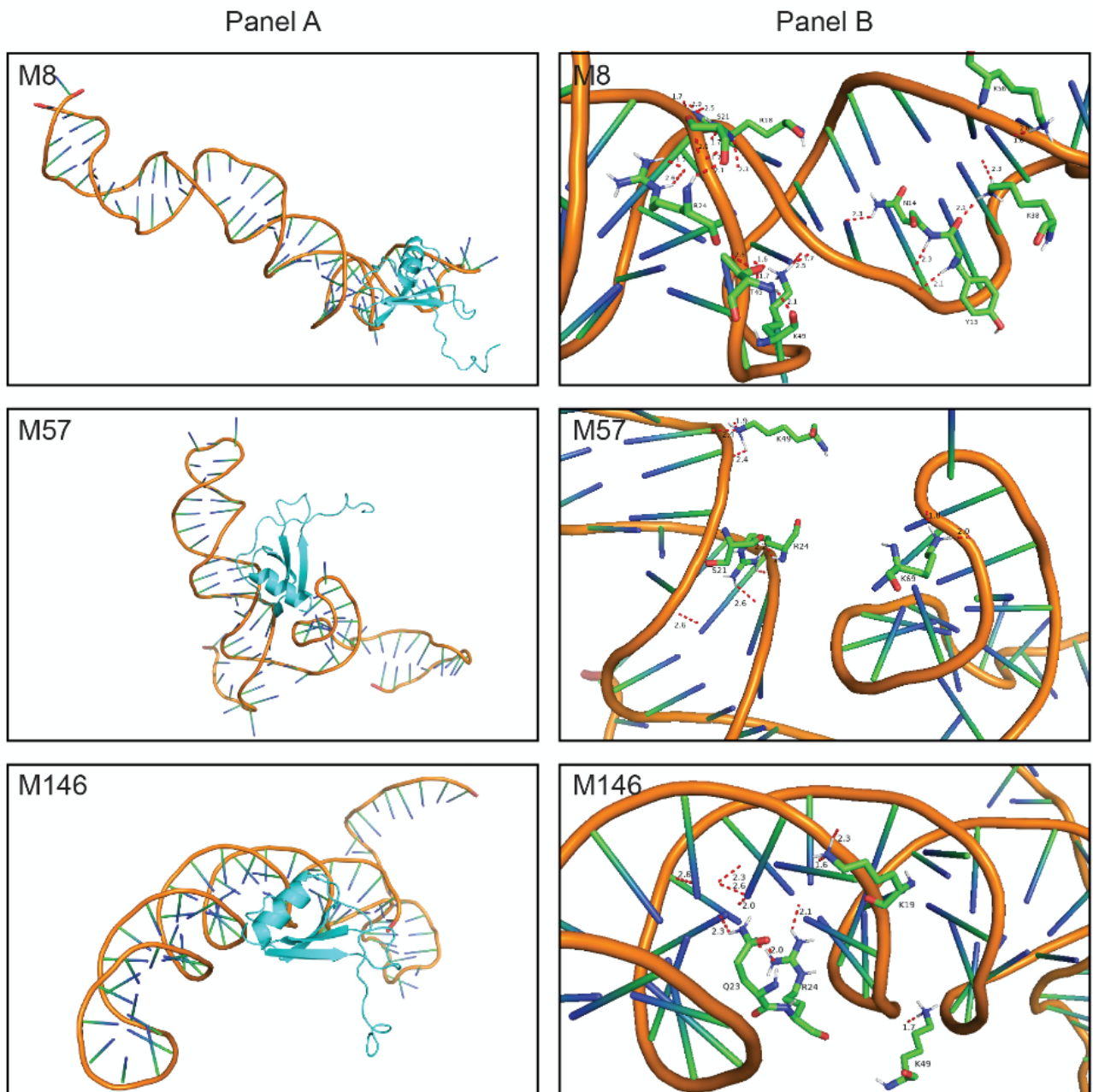


Figura 4.

Modelos moleculares de las interacciones entre la forma dimérica de MCP-1 y los aptámeros M8, M57 y M147. A: Modelo completo; B: Región de interacción. La estructura del ADN de cadena sencilla se representa en amarillo y cada monómero de MCP-1 en azul claro y púrpura. La distancia entre los átomos formando los puentes de hidrógeno se muestran en el panel B.

Tabla 6.

Análisis de las interacciones entre los aptámeros M146 y M57 y la proteína MCP-1 mediante acoplamiento molecular.

Aptamero CCL2.	Haddock score k score ±SD	RMS D± SD (A)	Enlaces de hidrógeno	Enfrentamientos	Pseudoenlaces	Contacto	Aminoácidos	Nucleótidos
M146.	-51.3 ± 6.9	2.5 ± 0.7.	4	4	7	26	K19 Q23,	dA12 dC13,
Monómero							R24,K49	dT14,dG43
M57	-49.4± 9.7.	3.8± 1.4	4	2.	6	13	S21, R24. K49,K69,	dG24, dC25, dT38, dA39, dC41, dA42, dG68, dG69,dA70
Monómero								
M8	-118.9± 24.9	2.2± 1.3	10	2	7	21	Y13, N14, R18. S21 R24, K38, T45, K49,K56	dA26, dG27, dT28, dC29,dT38 dT39 dA48, dT49,T40 dG47, dA48, dC50,dT51
Monómero								
M146	-66.7± 14.6	3.4±. 0.8	7	2	5	20	R24 K44 K49, Q73, R96, S96, S99	dA10, dG17, dG18, dG33,dA34, dG41 dA42 dG43, dT44,dA45
Dímero								
M57	-73.5± 13.2	2.6± 0.3	7	NO	11	19	R101 S21,Q23 K44 R96 S99 K116, K141	dC22, dA39 dA40 dT47 dC48, dG62, dT63, dT71,dC72
Dímero								
M8	±107.3 12.7	1.1±. 0.7.	11	NO	10	23	M0,Q1 T88 N89,K91 S93, R96 S99, K116, T143	dC25, dA26, dT28, dC29,T28, dC37, dT38 dT39, dT40, dT41 dT49 dC50, dA58,dT59

Sin embargo, se debe diseñar un ensayo de acoplamiento molecular entre las tres moléculas (2 aptámeros y una proteína), así como también su posterior validación experimental.

3.2 Evaluación de la interacción global potencial de los aptámeros M146, M57 y M8 por MCP-1 y albúmina humana (HSA)

La sensibilidad y especificidad de los aptámeros M146, M57 y M8 se evaluó analizando la interacción global de esas moléculas con MCP-1 y HSA mediante análisis *in silico* utilizando el servidor web PPAI (<http://39.96.85.9/PPAI>). La albúmina humana es la proteína más abundante en el plasma humano, por lo que cuando se diseña una molécula para detectar cualquier otra proteína plasmática se debe evaluar si posee reacción cruzada contra HSA. El servidor PPAI predijo las interacciones proteína-aptámero basada en información de secuencia de las dos moléculas y una plataforma de aprendizaje automático que utiliza los clasificadores 'Adaboost' y 'Random Forest' (Li *et al.*, 2020).

La predicción de la interacción global de M146 y M57 con MCP-1 alcanzó un puntaje mayor a 0.48 para el monómero y el dímero (Tabla 7). Sin embargo, M57 fue capaz de interactuar con HSA, pero los puntajes de M146 y M8 con HSA fueron menores a 0.48 (Tabla 7). De acuerdo con estas predicciones la interacción de M8 con MCP-1 fue la que obtuvo menor puntaje con el monómero de la proteína (Tabla 7).

Como los resultados sugirieron que M146 y M57 eran los que tenían mayor sensibilidad por MCP-1, se seleccionaron como aptámeros candidatos para continuar el estudio.

Tabla 7.

Puntuaciones de predicción de la interacción proteína-aptámero utilizando los clasificadores de aprendizaje automático del servidor web PPAI.

Aptámeros	MCP-1		HSA
	Monómero	Dímero	
M146	0.50	0.52	0.46
M57	0.55	0.53	0.48
M8	0.47	0.50	0.46

Servidor web PPAI: <http://39.96.85.9/PPAI>; HSA: albúmina sérica humana. Umbral de puntuación de predicción 0,48. Valores iguales o mayores que la puntuación de predicción sugieren la interacción entre las moléculas.

3.3 Generación y selección de aptámeros optimizados mediante la realización de mutaciones *in silico* en M146 y M57

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad y especificidad de los aptámeros M146 y M57 por MCP-1 se realizaron mutaciones aleatorias dentro de la región variable (40N) de la secuencia de dichos aptámeros. A continuación, se modeló la estructura secundaria de cada mutante y se predijeron las interacciones con las proteínas MCP-1 y HSA basándose en la información de secuencia de las dos moléculas utilizando el servidor web PPAI (<http://39.96.85.9/PPAI>). Los criterios utilizados para seleccionar los aptámeros mutados que se analizarían *in vitro* fueron el tipo de estructura secundaria, su estabilidad termodinámica, y los puntajes de la predicción de interacción global proteína/aptámero que le confirieran la mayor y menor afinidad por MCP-1 y HSA, respectivamente.

Se generaron 50 mutantes de cada aptámero, las cuales diferían de los originales en unas pocas bases y hasta en el 90 % de la secuencia variable de los mismos (Tablas 8-9). Los cambios de bases fueron fundamentalmente transiciones por lo que el porcentaje de GC se mantuvo, en promedio, en el 40% (Tablas 8-9). El tipo de estructura secundaria más frecuentemente obtenida fue la H/L para el aptámero M146, mientras que para el M57 fue la I (Fig.5, Tablas 8-9). La estructura H/L está compuesta por un tallo y burbuja lo cual facilita la interacción con sus blancos. Sin embargo, la estructura I (Fig. 5), que es la más frecuente en las mutantes de M57, está formada por un asa que también puede facilitar las interacciones. Algunas secuencias formaban estructura de tipo S, y unas pocas de tipo M, pero estas últimas tenían los valores de energía libre más altos (ΔG), por lo que no fueron seleccionadas. No se encontraron estructuras secundarias de tipo G ni D (Fig. 5).

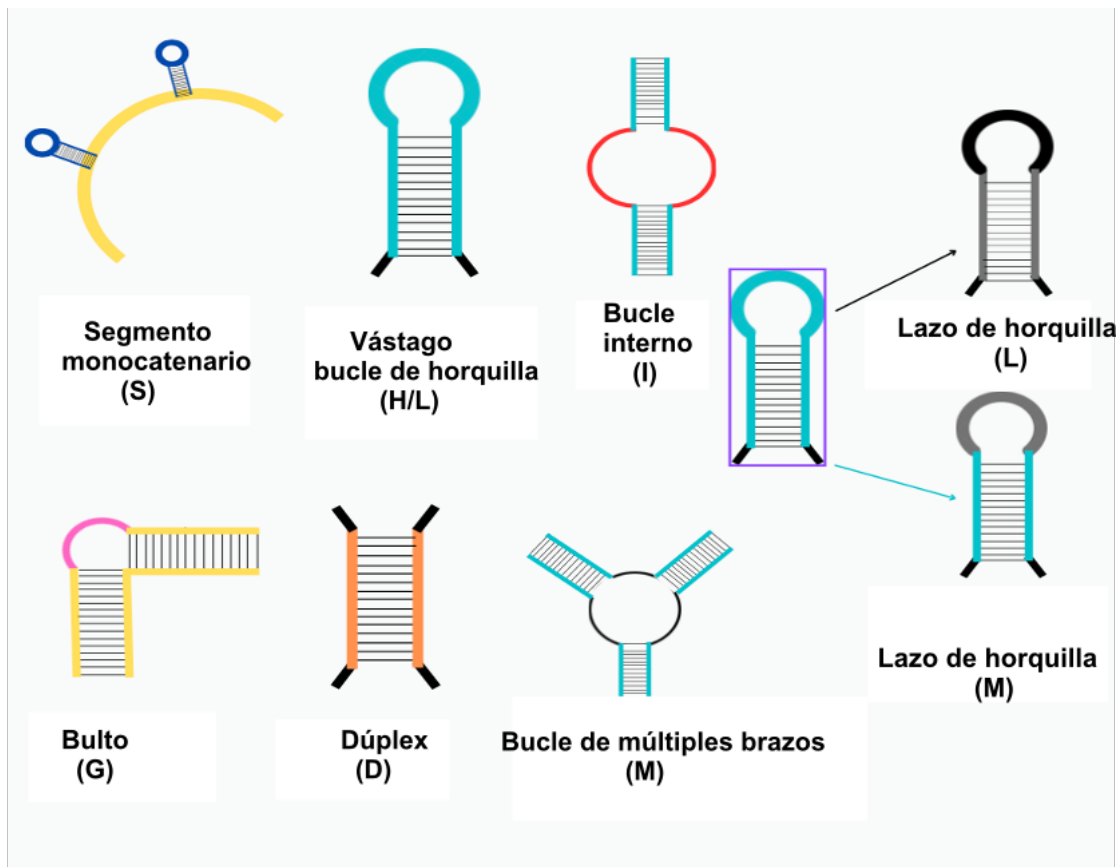


Figura 5.

Tipos de estructuras secundarias que pueden formar las moléculas de ácidos nucleicos de cadena sencilla. Estructuras típicas de los aptámeros: **(S)** tallo o stem, donde dos segmentos de la secuencia forman una doble hélice; **(H/L)** horquilla o hairpin loop, con un lazo en el extremo de una estructura de tallo; **(i)** estructura i-motif, que se estabiliza en secuencias ricas en citosina a pH ácido; **(L)** lazo o loop, representando la formación de bucles en la secuencia; **(G)** G-cuádruplex, una estructura apilada de guaninas; **(D)** dúplex, con una doble hélice de secuencias complementarias; **(M)** multi-brazo, en la cual múltiples tallos emergen de una región central. Estas estructuras proporcionan la conformación tridimensional clave para la función de los aptámeros.

Para mejorar la sensibilidad y especificidad por MCP-1 fue necesario mutar más del 50% de la secuencia de nucleótidos original de los aptámeros M146 y M57 (22 y 32 nucleótidos en M146 y M57, respectivamente, (Tablas 8-9).

La modificación de las secuencias de M146 y M57 generó los nuevos aptámeros M146_47 y M57_32 los cuales mostraron la mejor estabilidad termodinámica y el mejor puntaje de interacción con MCP-1 y el menor con HSA (Tablas 7-9). Por ejemplo, M146_47 tuvo un puntaje de 0.52/0.53 para el monómero/dímero de MCP-1, el cual es mayor que el obtenido por el aptámero M146 original (Tablas 7-8). Lo mismo sucedió con el nuevo aptámero M57_32 que su puntaje de interacción con MCP-1 fue mayor que el del aptámero que le dio origen (0.57/0.55, monómero/dímero, (Tablas 7 y 9), y no se verificaron interacciones con HSA (Tabla

9). En consecuencia, se predijo que los nuevos aptámeros M146_47 y M57_32 tenían mayor sensibilidad por MCP-1, mientras ninguno de los dos interactuaba con HSA.

No obstante, debe señalarse que el desempeño del método utilizado por el servidor web PPAI para predecir interacciones aptámero-proteínas con un umbral de puntuación de 0.48 tiene un área bajo la curva (AUC) de 0.871 (Li *et al.*, 2020). Aunque este AUC está dentro del rango considerado como bueno para cualquier ensayo, debe tenerse en cuenta que el método utilizado por PPAI se basa únicamente en la información de secuencia y no tiene en cuenta la estructura tridimensional del aptámero, por lo que la eficiencia de esta predicción no es del 100%. Debe destacarse que por esas razones consideramos también para seleccionar las mejores mutantes la estructura secundaria que formaban, ya que es conocido cuales de ellas son las más propensas a generar mejores interacciones (Hasegawa *et al.*, 2016b).

Estos resultados sugirieron que la combinación de métodos de SELEX, experimental e *in silico*, puede ser una estrategia más robusta para obtener aptámeros con mayor sensibilidad y especificidad por sus blancos.

Tabla 8.

Características estructurales, termodinámicas e interacción global de las mutantes de M146 con MCP-1 y HSA.

Aptámeros	Secuencia	Tipo de estructura secundaria	Energía libre	Porcentaje de variabilidad	Contenido de C/G	Coefficiente de unión A MCP-1	Coefficiente de unión a HSA
>M146	ATCTTCTAGAAAGATTACAGAGTATCAGACATACCCGGC	H/L	-27.00 kcal/mol		43%	0.49	0.46
>M146-1	ATCTTTATCAGACCTAGAAGATTACAGAGATACCCGGC	M	-13.70 kcal/mol	14 / 35.0%	43%	0.51	0.5
>M146-2	ATCTTATTCACAGAGTATCAGCTAGAAAGACATACCCGGC	H/L	-18.20 kcal/mol	13 / 32.5%	43%	0.49	0.47
>M146-3	ATCACAGAGTATCAATCTTCTGACATACCCGAAAGATGGC	H/L	-16.70 kcal/mol	24 / 60.0%	43%	0.5	0.45
>M146-4	AGAAAGATTACAAATCTTCTGAGTATCAGACATACCCGGC	S	-17.20 kcal/mol	15 / 37.5%	43%	0.49	0.46
>M146-5	GATTCACAGAGTATCAGACATCTTCTAGAAAATACCCGGC	S	-19.20 kcal/mol	21 / 52.5%	43%	0.49	0.46
>M146-6	GATTCACAGAGTATCATCTTCTAGAAAAGACATACCCGGC	M	-15.90 kcal/mol	22 / 55.0%	43%	0.49	0.46
>M146-7	GAAAGATTACAGAAATCTTCTAGACATACCCGGCAGTATC	S	-12.00 kcal/mol	28 / 70.0%	43%	0.49	0.46
>M146-8	ATCTTCTGACATACCCGGCCACAGAAAGATTTCAGAGTA	H/L	-7.60 kcal/mol	28 / 70.0%	43%	0.51	0.47
>M146-9	AAAGATTCTACCATCTTCTAGCGGCACAGATATCAGACA	H/L	-15.80 kcal/mol	28 / 70.0%	43%	0.5	0.45
>M146-10	AAAGATTACAGAGACATATCTTCTAGACCCGGGTATCAC	S	-11.20 kcal/mol	34 / 85.0%	43%	0.51	0.48
>M146-11	CCGGCTTCTAGAAAGATTACATCCAGACATACAGAGTAT	H/L	-7.80 kcal/mol	29 / 72.5%	43%	0.51	0.47
>M146-12	GAAAAGACATACCCGGGATCTTACAGAGTATCTACGATTC	S	-12.40 kcal/mol	35 / 87.5%	43%	0.5	0.47
>M146-13	TTCATCTTCTAGAAAGAACAGAGTATCAGACATACCCGGC	S	-19.10 kcal/mol	10 / 25.0%	43%	0.49	0.46
>M146-14	AAGAGATCTTCTAGAATATCAGACATACGATTCACCCGGC	M	-12.70 kcal/mol	26 / 65.0%	43%	0.5	0.47
>M146-15	TAGAAAGATATCTTCTACAGACATACCCAGAGTATCAGGC	H/L	-11.20 kcal/mol	25 / 62.5%	43%	0.51	0.44
>M146-16	TAGAAAGATATCTTCTACAGAGACATACAGATATCCCGGC	H/L	-11.00 kcal/mol	22 / 55.0%	43%	0.51	0.45
>M146-17	AGAAAATCTTCTGATTCACACAGACATACCCGGGATATGC	H/L	-12.30 kcal/mol	23 / 57.5%	43%	0.5	0.48
>M146-18	AGAAAGATTACATCTTCTACTCAGACGAGTAATACCCGGC	M	-7.10 kcal/mol	31 / 77.5%	43%	0.49	0.46
>M146-19	AGAATCTTCTAAGGAGTATCAGACATACCCGGCATTACA	H/L	-15.10 kcal/mol	28 / 70.0%	43%	0.48	0.47
>M146-20	AAAGATTACAGAGTATCAGACATACCCGGCATCTTCTAG	S	-22.80 kcal/mol	28 / 70.0%	43%	0.49	0.46
>M146-21	AAGATTACAGACACCCGGGATCTTACAGACATATCTTCTAGA	S	-15.90 kcal/mol	30 / 75.0%	43%	0.49	0.46
>M146-22	AATCTTCTGAAAGATTCTGATATCAGACATACAGACCCGGC	H/L	-14.30 kcal/mol	22 / 55.0%	43%	0.5	0.47
>M146-23	GAAAGATTCAATCTTCTACAGAGTATCAGCCCGGCACATA	H/L	-14.00 kcal/mol	21 / 52.5%	43%	0.5	0.46
>M146-24	TCACAGAGTATCAGACATACCCGGCATCTTCTAGAAAGAT	S	-19.80 kcal/mol	36 / 90.0%	43%	0.49	0.45
>M146-25	GATTCACAGAGTATCAGACATCTTCTAGAAAATACCCGGC	S	-18.50 kcal/mol	20 / 50.0%	43%	0.49	0.46
>M146-26	ATCTTCTAGAAAGATTACAGAGTAAACATACCCGGCTCAG	S	-18.70 kcal/mol	10 / 25.0%	43%	0.5	0.45
>M146-27	AAGATTACAGAGTATCAGACATACCCATCTTCTAGAGGC	S	-23.10 kcal/mol	24 / 60.0%	43%	0.49	0.45
>M146-28	AAAGATTACAGAGTATCGGCCAGACAATCTTCTAGTACC	S	-18.10 kcal/mol	33 / 82.5%	43%	0.48	0.45
>M146-29	AATTCACAGAGTATCATCTTCTAGAAAGACATACCCGGC	M	-29.10 kcal/mol	22 / 55.0%	43%	0.48	0.47
>M146-30	AATTCACAGAGTATCAGACATATCTTCTAGAAAGCCCGGC	S	-19.80 kcal/mol	22 / 55.0%	43%	0.48	0.46
>M146-31	AAGATTACAGAGTATCAGACATACCCGGCTCTTCTAGAA	H/L	-22.30 kcal/mol	24 / 60.0%	43%	0.5	0.46
>M146-32	ATCTTCTAGAAAGATTACACATACCCGGCGAGTATCAGA	H/L	-15.90 kcal/mol	14 / 35.0%	43%	0.49	0.46
>M146-33	ATAGACATACCCGGCCTTCTAGAAAGATTACAGAGTATC	H/L	-15.00 kcal/mol	33 / 82.5%	43%	0.49	0.48
>M146-34	ATCTTCCAGAGTATCAGACATAGAAAGATTTCATACCCGGC	I	-16.00 kcal/mol	14 / 35.0%	43%	0.48	0.48
>M146-35	ATGATTACAGAGTATCACTTCTAGAAAGACATACCCGGC	M	-17.10 kcal/mol	16 / 40.0%	43%	0.5	0.47
>M146-36	ATCTTACAGAGTATTTCTAGAAAGACAGACATACCCGGC	M	-17.70 kcal/mol	13 / 32.5%	43%	0.51	0.47
>M146-37	ATAGATTACAGAGTATCAGACATACCCGGCTTCTAGAAC	I	-23.20 kcal/mol	28 / 70.0%	43%	0.5	0.47
>M146-38	AGAATCAGACATACCTTCTTACAGAGTTCTAGAAACGGC	M	-11.70 kcal/mol	27 / 67.5%	43%	0.54	0.47
>M146-39	ATATCAGACATACCTCGATTACAGAGTCTAGAAACGGC	M	-10.80 kcal/mol	25 / 62.5%	43%	0.51	0.47
>M146-40	ATCTAGAAACGGCGATTACAGAGTATCAGACATACCTCT	H/L	-23.50 kcal/mol	32 / 80.0%	43%	0.5	0.45
>M146-41	AGATTACACCTCTTCTAGAAACGGCGAGTATCAGACATA	M	-14.60 kcal/mol	28 / 70.0%	43%	0.49	0.45
>M146-42	AGATTACATACCTCTTCTAGAAACGGCCACAGAGTATCAG	H/L	-12.70 kcal/mol	30 / 75.0%	43%	0.5	0.47
>M146-43	AAGAAACGGCGATTACAGAGTATCAGACATACCTCTTCT	H/L	-21.30 kcal/mol	28 / 70.0%	43%	0.49	0.45
>M146-44	AGCTAGAAACGGGATTACAGAGTATCAGACATACCTCTTC	H/L	-21.80 kcal/mol	32 / 80.0%	43%	0.52	0.47
>M146-45	AGATTCACTTCTAGAAACGGCAGAGTATCAGACATACCTC	H/L	-18.30 kcal/mol	28 / 70.0%	43%	0.52	0.47
>M146-46	AGATTTACAGACATACCTCTTCTAGAAACACAGAGTAGGC	H/L	-9.40 kcal/mol	24 / 60.0%	43%	0.51	0.46
>M146-47	ATCAGACATACCTAGATTACAGAGTCTTCTAGAAACGGC	S	-12.00 kcal/mol	22 / 55.0%	43%	0.52	0.46
>M146-48	AGAGTATCAGACATAAGATTCACTAGAAACGGCCCTCTTC	M	-15.10 kcal/mol	28 / 70.0%	43%	0.49	0.46
>M146-49	ATCTTCCAGAGTATCAGACATGGATTGATTACATACCCGGC	M	-23.20 kcal/mol	15 / 37.5%	45%	0.21	0.46
>M146-50	ATCTTCAAGAGTATCAGATTTATAGAAACCCATTACACCG	M	-22.30 kcal/mol	23 / 57.5%	34%	0.12	0.49

Tabla 9.

Características estructurales, termodinámicas e interacción global de las mutantes de M57 con MCP-1 y HSA.

Aptámeros	Secuencia	Tipo de estructura secundaria	Energía libre	Porcentaje de variabilidad	Contenido de C/G	Coefficiente de unión a MCP-1	Coefficiente de unión a HSA
>M57	CGGGCAGTCACTGGATCTAACATTAATCTTTCTAGAAGAT	S	-7.50 kcal/mol		40%	0.55	0.48
>M57-1	CGTCACTGGATCTCGGCAAATCTTTCTAGAAGATCATTAA	I	-5.70 kcal/mol	30 / 75.0%	40%	0.55	0.46
>M57-2	GGATCTAACATTAATCTTTCCCGGCAGTCACTTAGAAGAT	S	-5.80 kcal/mol	25 / 62.5%	40%	0.51	0.46
>M57-3	CGGGCAGTCACTGGATCTTTCTAGAAGATTCTAACATTAAT	M	-4.80 kcal/mol	18 / 45.0%	40%	0.54	0.49
>M57-4	CCTAATCTTTCTAGAAGATGGCAGTCACTGGATCTAACAT	I	-7.20 kcal/mol	26 / 65.0%	40%	0.51	0.46
>M57-5	TCTAACATTAATCTTTCCCGGCAGTCACTGGATCTAGAAGAT	S	-4.50 kcal/mol	26 / 65.0%	40%	0.5	0.47
>M57-6	CGGGCAGAACATTAATCTTTCTCACTGGATCTTAGAAGAT	H/L	-4.40 kcal/mol	22 / 55.0%	40%	0.55	0.46
>M57-7	CTGGATCCGGCAGTCACTAACATTAATCTTTCTAGAAGAT	M	-8.90 kcal/mol	18 / 45.0%	40%	0.55	0.47
>M57-8	CCACTGGATCTAACATTAATCCGGCAGTCTTTCTAGAAGAT	I	-4.50 kcal/mol	11 / 27.5%	40%	0.55	0.48
>M57-9	CGTCACTGGATCTAACATTAATCTTTCTAGAAGATCGGCA	I	-5.30 kcal/mol	18 / 45.0%	40%	0.55	0.46
>M57-10	TCACTGGATCTCCGGCAGAACATTAATCTTTCTAGAAGAT	S	-6.10 kcal/mol	32 / 80.0%	40%	0.54	0.47
>M57-11	CTGGATCTAACATTAATCTTTCCGGCAGTCTTTCTAGAAGAT	I	-5.30 kcal/mol	18 / 45.0%	40%	0.5	0.47
>M57-12	CGGGCAGTCAACATTAATCTTTCTAGAAGATTGGATCTA	I	-9.30 kcal/mol	23 / 57.5%	40%	0.55	0.46
>M57-13	CCACTGGATCTAACATTAACGGCAGTCTTTCTAGAAGAT	I	-6.10 kcal/mol	20 / 50.0%	40%	0.54	0.49
>M57-14	CGGGTCTTAGAAGATCAGTCACTGGATCTAACATTAATCT	I	-6.30 kcal/mol	25 / 62.5%	40%	0.51	0.47
>M57-15	GTCATAATCTGGATCTAACATCGGCACCTTTCTAGAAGAT	I	-2.20 kcal/mol	22 / 55.0%	40%	0.51	0.47
>M57-16	CCCTGGATCTAACATTAATCTTTCTAGAAGATGGCAGTCA	I	-4.80 kcal/mol	32 / 80.0%	40%	0.5	0.46
>M57-17	CGGGCAGTCACTTAGAAGATGGATCTAACATTAATCTTT	I	-6.50 kcal/mol	22 / 55.0%	40%	0.53	0.46
>M57-18	CGGGATCTAACATTAATCTTTCTAGCAGTCACTGGAAGAT	I	-4.20 kcal/mol	22 / 55.0%	40%	0.55	0.48
>M57-19	CTGGATCTAACATTCGGCAGTCAACAATCTTTCTAGAAGAT	M	-9.40 kcal/mol	17 / 42.5%	40%	0.55	0.46
>M57-20	ATCTAACATTAACCTCTAGAGGCAGTCACTGGTCTTAGAT	I	-5.30 kcal/mol	32 / 80.0%	40%	0.51	0.45
>M57-21	GTCAGTGGATCTCCGGCAAACCTAGAAGATCATTAACTTT	S	-5.80 kcal/mol	26 / 65.0%	40%	0.53	0.48
>M57-22	GAAGATCGGCACCTTTCTAGTCACTGGATCTAACATTA	I	-3.30 kcal/mol	33 / 82.5%	40%	0.55	0.46
>M57-23	CTTTCTAGAAGCGGCAGTCACTGGATCTAACATTAATCAT	M	-4.90 kcal/mol	27 / 67.5%	40%	0.52	0.45
>M57-24	GGCAGCCTCACTGGATCTTAGAAGATAACATTAATCTTT	I	-7.80 kcal/mol	24 / 60.0%	40%	0.53	0.45
>M57-25	CTCACTGGATCGGCAGTCAATTTCTAGAAGATCAATTAATC	I	-5.20 kcal/mol	26 / 65.0%	40%	0.54	0.46
>M57-26	GATCTGGATCTAACATTAATCTTTCCGGCAGTCACTAGAA	M	-7.40 kcal/mol	29 / 72.5%	40%	0.53	0.47
>M57-27	CTCACTGGATCTAACATTAATCTTTCCGGCAGTCTAGAAGAT	H/L	-7.50 kcal/mol	19 / 47.5%	40%	0.52	0.46
>M57-28	GTCAGTCCGGCAGTCTAACATCTTTCTAGAAGATACATT	I	-5.50 kcal/mol	26 / 65.0%	40%	0.54	0.46
>M57-29	AGATGCAGTCACTGGATCTCCGTTCTAGAAGATTAATCT	I	-9.50 kcal/mol	32 / 80.0%	40%	0.52	0.46
>M57-30	CGGGCAGTCACTGGCTTTCTAGAAGATATCTAACATTAAT	I	-5.20 kcal/mol	18 / 45.0%	40%	0.52	0.47
>M57-31	GTCAGTGGATCTAACATTAATCTTTCCGGCAGTCTAGAAGAT	S	-4.90 kcal/mol	21 / 52.5%	40%	0.5	0.46
>M57-32	CATCTAACATTAATCTTTCTAGAAGATCGGCAGTCACTGG	I	-5.70 kcal/mol	32 / 80.0%	40%	0.56	0.46
>M57-33	CTTCTTTCTACCGGCAGTCACTTTCTAGAAGATGGATCTAACATTA	I	-6.50 kcal/mol	27 / 67.5%	40%	0.53	0.46
>M57-34	CCACTGGATCTAACATTAATCTTTCTAGAAGATGGCAGTCA	H/L	-8.10 kcal/mol	27 / 67.5%	40%	0.54	0.48
>M57-35	CGGGCAGTCACTAGAAGATCTGGATCTAACATTAATCTTT	M	-7.40 kcal/mol	22 / 55.0%	40%	0.55	0.47
>M57-36	TTAATCTCGGCAGTCACTTTCTAGAAGATCGGATCTAACAA	S	-4.90 kcal/mol	31 / 77.5%	40%	0.53	0.47
>M57-37	CTGGATCTAACATCCGGCAGTCAATCTTTCTAGAAGAT	S	-8.10 kcal/mol	16 / 40.0%	40%	0.51	0.46
>M57-38	ATTAATCTTTCTCTGGATCTAACAGAAGATCGGCAGTCACT	H/L	-6.30 kcal/mol	32 / 80.0%	40%	0.55	0.48
>M57-39	ACTGGATCTAACCGGCAGTCAATTAAGAAGATATCTTTCT	I	-4.00 kcal/mol	28 / 70.0%	40%	0.5	0.48
>M57-40	CACTGGATCTAACCGGCAGTCAAGAAGATTAATCTTTCT	I	-7.10 kcal/mol	28 / 70.0%	40%	0.54	0.47
>M57-41	GGATCTAACATTAATCTTTCCGGCAGTCACTTTCTAGAAGAT	S	-7.00 kcal/mol	24 / 60.0%	40%	0.53	0.46
>M57-42	CATTAATCTTTCTAGAAGATCCGGCAGTCACTGGATCTAAC	I	-9.00 kcal/mol	34 / 85.0%	40%	0.53	0.47
>M57-43	TGGATCTAACATTAATCCGGCAGTCACTTTCTAGAAGAT	M	-3.80 kcal/mol	18 / 45.0%	40%	0.5	0.47
>M57-44	TGGATCTAACATTAATCCGGCAGTCACTTTCTAGAAGAT	M	-3.80 kcal/mol	18 / 45.0%	40%	0.5	0.47
>M57-45	TTAATCTTTCTAGAAGATCCGGCAGTCACTGGATCTAACAT	I	-3.80 kcal/mol	30 / 75.0%	40%	0.55	0.48
>M57-46	AGTCACTGGACCGGCTCTATTCTAGAAGATACATTAATC	M	-3.40 kcal/mol	27 / 67.5%	40%	0.53	0.47
>M57-47	ACATTAATCTTTCTAGAAGATCCGGCAGTCACTGGATCTA	I	-6.50 kcal/mol	28 / 70.0%	40%	0.53	0.45
>M57-48	TGGATCTAACAAAGATCCGGCATTAACTTTCTAGGTCAC	S	-8.40 kcal/mol	21 / 52.5%	40%	0.54	0.48
>M57-49	GTCATAATCCGAGAGAGAACATCCGGCCTTTCTAGAAGAT	M	-9.00 kcal/mol	22 / 55.0%	43%	0.23	0.32
>M57-50	TTAATCTCGATGTAGCGTTACTAGAAGATCGGATCTAACAA	M	-9.00 kcal/mol	32 / 80.0%	38%	0.22	0.21

3.4 Análisis *in silico* de las 75 HSA de los aptámeros optimizados

A pesar de que los nuevos aptámeros M146_47 y M57_32 tenían un tipo de estructura secundaria diferente a la de los aptámeros que le dieron origen (Tablas 8-9, Fig. 6), de acuerdo con las predicciones y teniendo en cuenta la energía libre de estas estructuras secundarias ellos tuvieron una estabilidad semejante (Fig. 6). Estas estructuras secundarias tienen una conformación de tallo y burbuja y en el caso de M57_32 también tiene algunas asas internas y protuberancias de cadena sencilla combinando la estructura I con G (Fig.6).

Por otra parte, las interacciones *in silico* con el monómero y el dímero de MCP-1 de los aptámeros seleccionados tuvieron mayor puntuación y menores valores de RMSD que los aptámeros originales M146 y M57 (Tablas 6 y 10). De igual forma, se establecieron mayor cantidad de interacciones entre los nuevos aptámeros y MCP-1 que las que establecían los aptámeros originales (Tablas 6 y 10, Fig. 7). La mayoría de los aminoácidos involucrados en las interacciones son polares y los residuos N17 y R18 del monómero y el dímero de MCP-1 están participando en las interacciones con M146_47 y M57_32 (Tablas 6 y 10, Fig.7). Sin embargo, debido al extenso número de otros aminoácidos interactuando con los dos aptámeros, es probable que ellos puedan interactuar de manera simultánea con MCP-1 (Tabla 10).

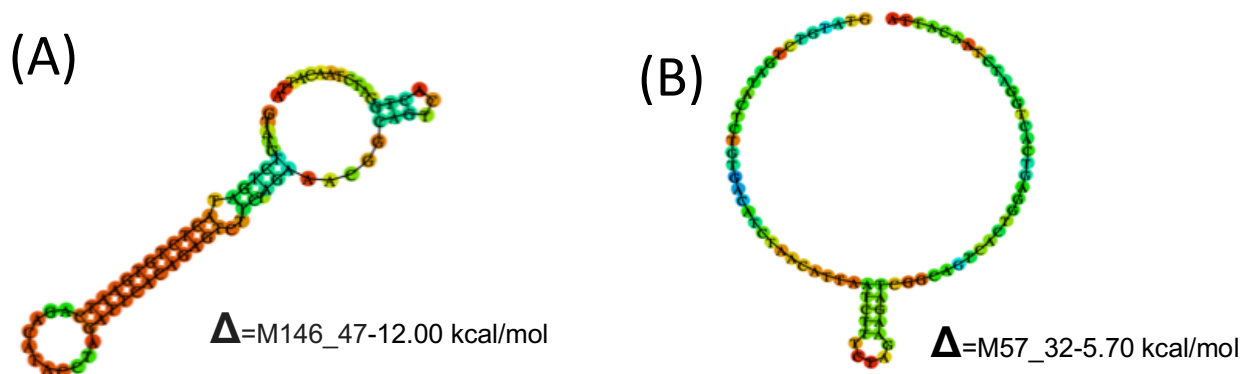


Figura 6.

Representación esquemática de las estructuras secundarias de los aptámeros seleccionados *in silico* (A) Aptámero M146_47; (B) Aptámero M57_32. Las estructuras secundarias se modelaron para ilustrar la disposición espacial de los nucleótidos en estas moléculas y mostrar el tipo de estructura secundaria.

Tabla 10.

Análisis de las interacciones entre los aptámeros M146_47 y M57_32 y la proteína MCP-1 mediante acoplamiento molecular.

Aptamero	CCL2	Haddock k score ±SD.	RMS D± SD (A)	Enlaces de hidrógeno	Enfrenta mientos	pseudoenlaces	Contacto	Aminoácidos	Nucleótidos
M 147_47		-68.9± 0.5	2.6± 0.5	6	2	4	16	N14,F15 N17,R18. R24,K49	dT18, dG19, dA20, dA21, dA22, dA34, dA36, dA42, dA43,
Monómero									
M 57_32		-96.0± 7.3	1.3± 0.9	7	2	2	14	N14,N17, K19,S21, Q23,K49,K58	dT30, dT31, dT32, dT33, dT34, dC35, dG42, dA43, dA44,
M 147_47		-116.6 ±36.5	1.5± 0.4	10	1	6	24	N17,R18 S21,R24, K49,K69,	dC7,dT8 dA20, dA26, dC27, dC31, dC32, dT33, dT55, dT56, dT65, dC66, dT67
Dímero									
M 57_32		-120.2 ±5.3	0.9± 0.6	14	NO	10	29	N17,R18 K19,Q23 R24,K49 M72,R101, R102,T104	dT31, dA32 dA33, dT34, C35, dT40, dG42, dA43, dC51, dA52, dG53, dT54, dC55

Los resultados anteriores sugirieron que los aptámeros M146_47 y M57_32 serían buenos candidatos para continuar el trabajo, por lo que se enviaron a sintetizar.

3.5 Verificación del tamaño molecular de los aptámeros M146_47 y M57_32 mediante PCR

Para verificar el tamaño molecular y la integridad de los aptámeros M146_47 y M57_32 se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores de la biblioteca 2Apt y las condiciones de reacción utilizadas para amplificar los aptámeros que le dieron origen (Materiales y Métodos acápite 2.5.5). En las condiciones ensayadas siempre se obtuvo una única banda que migraba al nivel de las 80 pb (Fig. 8). Este resultado sugirió que los aptámeros sintetizados tenían el tamaño correspondiente y contenían en sus extremos las secuencias constantes que permitieron su amplificación.

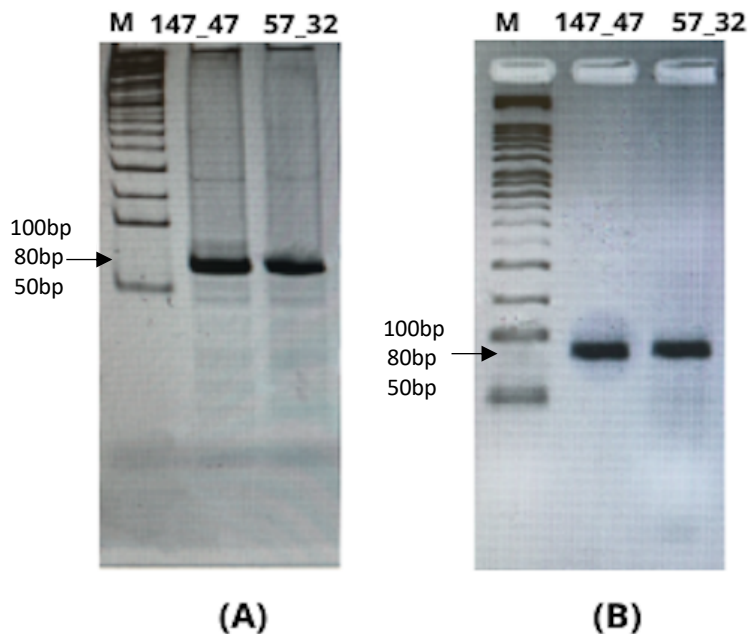


Figura 8. Amplificación de los aptámeros M146_47 y M57_32 .

Electroforesis en gel de agarosa y de poliacrilamida de los productos de la amplificación mediante PCR de los aptámeros M146_47 y M57_32. A: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % de los productos de la amplificación. B: Electroforesis en gel de agarosa al 4% de los productos de la amplificación. M: marcador de tamaño de 50 pb (HyperLadder™); M146_47 y M57_32 son los aptámeros candidatos que se sintetizaron químicamente y se amplificaron mediante PCR.

3.6 Estandarización de la obtención de ADN de cadena sencilla de los aptámeros M146_47 y M57_32 mediante PCR asimétrica.

Para realizar los ensayos experimentales con los aptámeros M146_47 y M57_32 se estandarizó la obtención de cadena sencilla de cada uno de ellos utilizando la técnica de PCR. Se ensayaron diferentes cantidades de cebadores de la reacción en sentido directo y reverso utilizando las mismas condiciones de ciclos y temperaturas utilizadas para amplificar la biblioteca 2Apt, así como también se modificaron las concentraciones del molde de aptámero, las cantidades de ciclos y las de temperatura originales.

La aplicación de 40 ciclos de amplificación en las condiciones de PCR utilizadas para amplificar la biblioteca 2Apt, pero añadiendo 50 veces más cebador directo que reverso generó un amplicón que migró a nivel de las 80 pb lo cual sugirió que correspondía a moléculas de aptámero de doble cadena (Fig. 9A, carril 1). Debe señalarse que al parecer había un exceso de oligonucleótido en la reacción (Fig. 9A, carril 1). Al disminuir la proporción de cebador directo a 25 veces más que el reverso, se obtuvieron dos amplicones, uno que correspondía a la doble cadena y otro que migró más en la electroforesis, sugiriendo que contenía las moléculas de cadena sencilla del aptámero (Fig. 9A, carril 2). La disminución de la proporción de cebador directo: reverso a 20:1 produjo un sólo amplicón, aparentemente de ADN de cadena sencilla, pero con muy baja eficiencia a juzgar por la intensidad de la banda y la cantidad de oligonucleótido remanente en la reacción (Fig. 9A, carril 3). Al disminuir a la mitad la concentración de aptámero molde en la reacción (1.3 μ M) pero manteniendo la proporción 25:1 de cebador directo: reverso desapareció la banda correspondiente a las moléculas de ADN de doble cadena, y se obtuvo una única banda con buena intensidad, que debía corresponder al ADN de cadena sencilla (Fig. 9A, carril 4). La utilización de un único cebador en la reacción no generó ningún producto de amplificación (Fig. 9A, carrils 5-6).

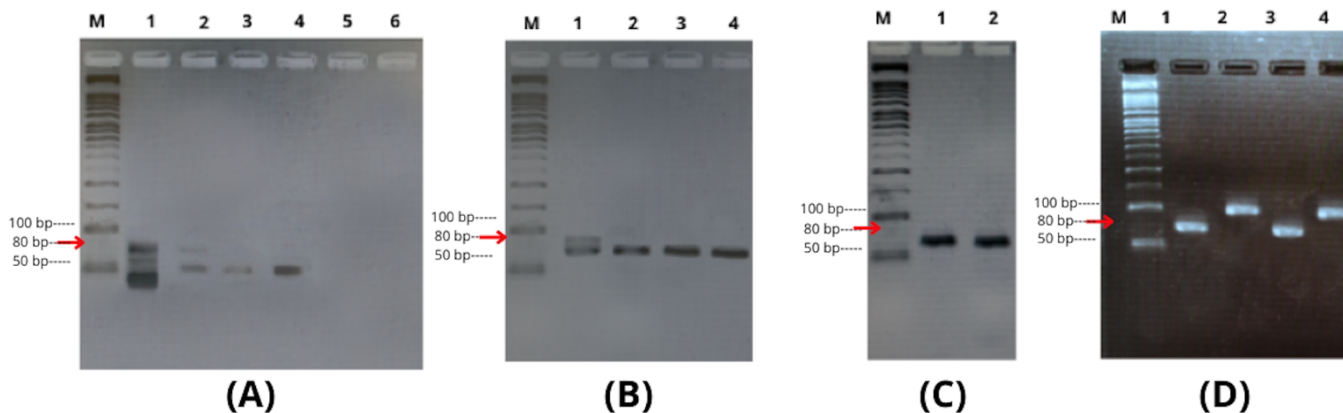


Figura 9.

Estandarización de las condiciones de obtención de ADN de cadena sencilla de los aptámeros M146_47 y M57_32. **A:** Variación de la relación de cebador directo: reverso y concentración de aptámero molde M146_47; carril: **1**, 50:1, 2.6 μ M; **2**, 25:1, 2.6 μ M; **3**, 20:1, 2.6 μ M; **4**, 25:1, 1.3 μ M; **5**, sin cebador directo; **6**, sin cebador reverso. **B:** Cinética de formación de aptámero M146_47 de cadena sencilla; carril: **1**: 8 ciclos; **2**: 12 ciclos; **3**: 20 ciclos; **4**: 30 ciclos **C:** Aplicación de 40 ciclos de PCR y el gradiente de temperatura mostrado en la Tabla 11; **1**, M146_47; **2**, M57_32. M: marcador de tamaño molecular, escalera de 50 pb; **D:** carril: **1**: M146_47 sin biotina; **2**: M146_47 con biotina; **3**: M57_32 sin biotina; **4**: M57_32 con biotina.

A continuación, se decidió incrementar la cantidad de aptámero molde en la reacción al doble de la cantidad inicial (5.2 μ M) de lo utilizado en el experimento anterior, pero empleando la relación de cebadores 20:1 (directo: reverso) y se obtuvo una adecuada cantidad de ADN de cadena sencilla a partir del ciclo 20 de amplificación (Fig. 9B carril 1-3). Sin embargo, estos resultados no fueron reproducibles en el tiempo y con frecuencia se obtenían múltiples bandas después de la amplificación en las condiciones supuestamente estandarizadas que sugerían la formación de multímeros entre los cebadores disminuyendo la eficiencia de formación del amplicón del aptámero de cadena sencilla.

Tabla 11.

Condiciones de ciclos y temperaturas para la obtención de aptámeros de cadena sencilla mediante PCR asimétrico.

	ORIGINAL		MODIFICADA	
DESNATURALIZACIÓN INICIAL	94°C	3 minutos	95°C	20 segundos
DESNATURALIZACIÓN	94°C	3 segundos	90°C	10 segundos
ALINEAMIENTO	60°C	20 segundos	80°C	10 segundos
EXTENSIÓN	0		70°C	15 segundos
			65°C	20 segundos

Se aplicaron 40 ciclos

Por las razones anteriores se modificaron las temperaturas originales con las que se estandarizó la amplificación de la biblioteca 2Apt y la obtención de ADN de cadena sencilla. Se disminuyó el tiempo inicial de desnaturalización a 20 segundos y se disminuyó gradualmente la temperatura de la reacción hasta 65 °C (Tabla 11) para evitar el realineamiento de los oligonucleótidos y la formación de multímeros en la reacción. Como resultado, en las condiciones descritas en la (Tabla 11) se obtuvo de forma reproducible un único amplicón tanto para M146_47 y M57_32 que correspondía a la cadena sencilla (Fig. 9C) que permitió obtener la cantidad necesaria de cada uno de los aptámeros para proceder al resto de los análisis.

En las mismas condiciones ensayadas se obtuvo cadena sencilla de cada uno de los aptámeros sin marcar (Fig. 9D, carril 1 y 3) y marcados con biotina utilizando el cebador directo biotinilado (Fig. 9D, carril 2 y 4).

3.7 Estimación de la constante de afinidad de los aptámeros M146_47 y M57_32 *in silico*

La predicción de la afinidad de unión de los complejos MCP-1/ ADN para los aptámeros M146_47 y M57_32 fue de -5.03 kcal/mol para ambos, lo cual indica la espontaneidad de estas interacciones. Con este valor de ΔG se estimó la constante de disociación (Kd) la cual fue para ambos aptámeros de 204 μ M, y no difirió de la Kd predicha para los aptámeros parentales M146 y M57. Este método de estimación *in silico* fue incapaz de discriminar entre los valores de Kd de los 4 aptámeros analizados, probablemente debido a que utiliza la información de la secuencia de nucleótidos de estos y todas son muy similares (Tablas 8-9).

3.8 Cálculo de la constante de afinidad de los aptámeros M146_47 y M57_32 mediante PCR cuantitativo en tiempo real

Para calcular la constante de afinidad de los aptámeros M146_47 y M57_32 se diseñó un ensayo basado en PCR cuantitativo en tiempo real el cual permitió calcular la fracción de aptámero unida a MCP-1 (Fig. 10). Para ello se unió MCP-1 a los pozos de una placa de ELISA en las condiciones descritas en el acápite 2.5.13 de Materiales y Métodos. A continuación, se incubó por separado diferentes concentraciones (15.8-225 nM) de cada uno de los aptámeros con la proteína MCP-1. Al término de la incubación se recuperó la disolución de aptámeros y se cuantificó mediante PCR cuantitativo en tiempo real la cantidad de aptámero no unida.

La cantidad inicial de aptámero añadida a cada pozo de la placa de ELISA para que interactuara con MCP-1 también se cuantificó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. La fracción de aptámero unida a la proteína se calculó como 1 menos el cociente entre la cantidad de aptámero no unida y la cantidad inicial (Fig.10).

En la figura 11 se muestra la relación entre la fracción unida y la concentración de aptámero interactuando con MCP-1. Se ajustó a los datos anteriores un modelo de unión específica con pendiente de Hill mediante el método de los mínimos cuadrados. Como resultado se obtuvo para M146_47 una Kd aparente de 226.6 pM (IC_{95} : 117.2- ∞ pM, Bmax: 44.89, h:1.54, gl:7, R^2 : 0.9852) y para M57_32 de 103 pM (IC_{95} : 92-117.4 pM, Bmax: 21.74, h:3.84, gl:8, R^2 : 0.9896) (Fig. 11). Estos valores de Kd calculados experimentalmente difieren considerablemente de los estimados *in silico* (204 μ M para ambos aptámeros), lo cual sugiere que se deberían verificar por un método adicional. Sin embargo, están en el rango de los calculados para aptámeros de RNA comerciales contra MCP-1(NOX-E36, s. f.). Por otra parte, debe señalarse que de acuerdo con los resultados obtenidos para ambos aptámeros se obtuvo un valor de pendiente de Hill (h) >1 lo cual indica que se pueden unir a más de un sitio de MCP-1 con cooperatividad positiva. Este hallazgo concuerda con los resultados obtenidos *in silico* en los cuales se observa que la región de interacción de ambos aptámeros con MCP-1 es extensa y con múltiples contactos (Fig. 7, Tabla 10)

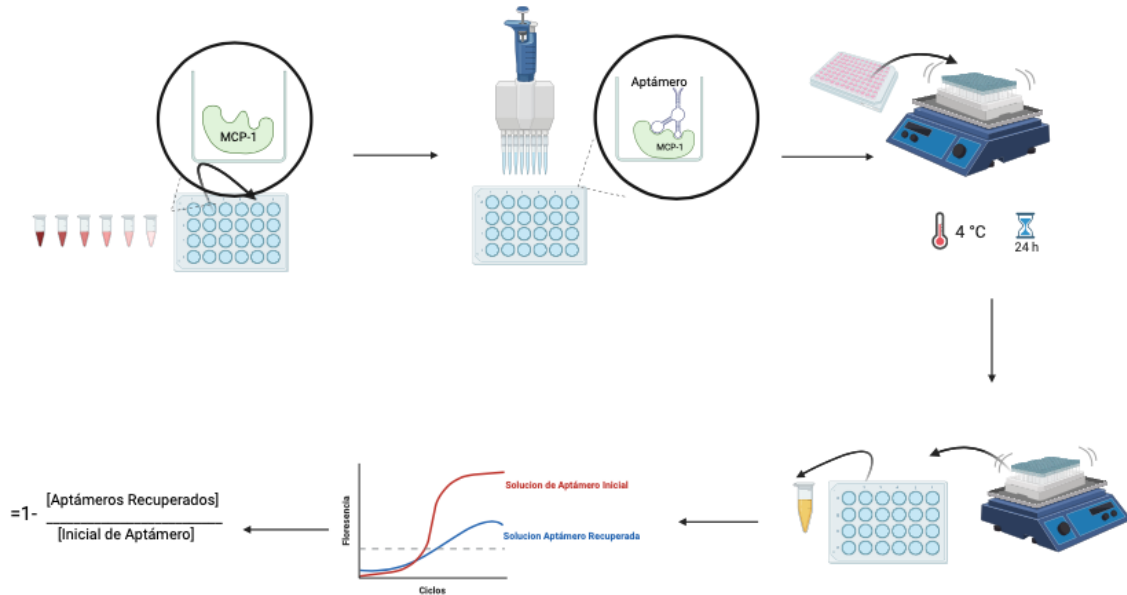


Figura 10.

Diagrama ilustrativo del procedimiento utilizado para calcular la Kd de los aptámeros M146_47 y M57_32 mediante PCR cuantitativo en tiempo real.

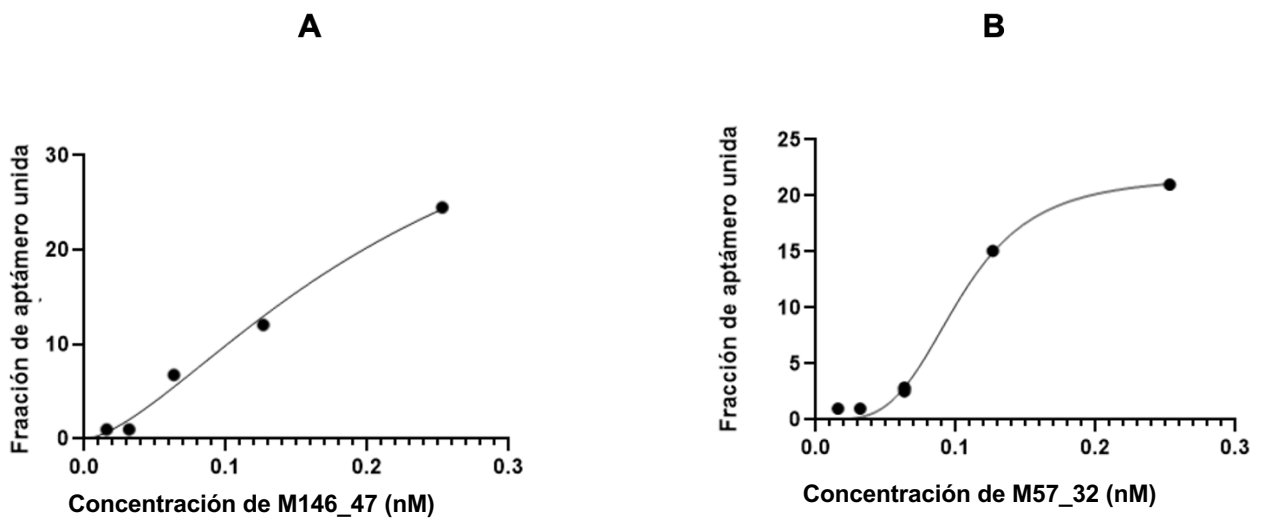


Figura 11. Relación entre la fracción de aptámero unida a MCP-1 y la concentración de aptámero. Se ajustó un modelo de unión específica con pendiente de Hill. Se estimó la Kd aparente para los aptámeros A: M146_47 (226.6 pM) y B: M57_32 (103 pM).

3.9 Evaluación de la detección de MCP-1 con los aptámeros M1 y M5 mediante ELASA *directo*

Para evaluar el nivel de detección de MCP-1 con los aptámeros M146_47 y M57_32 se estandarizó un ensayo tipo ELASA directo colorimétrico (Fig. 12). En dicho ensayo se unieron cantidades diferentes de MCP-1 por triplicado (25-300 pg) a los pozos de una placa de ELISA y se pusieron a interactuar, por separado, con cada uno de los aptámeros M146_47 y M57_32 marcados con biotina. La detección se realizó utilizando un complejo de estreptavidina-peroxidasa y el sustrato colorimétrico TMB como se describió en el acápite 2.5.14 de Materiales y Métodos. Como control negativo se utilizó HSA a las mismas concentraciones que la proteína MCP-1.

En la Figura 13A se muestra que la unión del aptámero M146_47 a MCP-1 tuvo un comportamiento lineal en el rango de 25-200 pg ($R^2=0.96$, $p < 0.05$) y la señal se satura a los 300 pg. Por otra parte, no hay relación entre la concentración de HSA y la señal obtenida en los ensayos ($p=0.05$), lo que indica que M146_47 no interactúa con HSA (Fig. 13B). Un resultado semejante a este último se obtuvo para el aptámero M57_32 tanto con MCP-1 (Fig.13C) como con HSA ($p=0.05$), sugiriendo que en las condiciones ensayadas dicho aptámero no interactuaba con HSA ni con MCP-1. Sin embargo, llama la atención los resultados de las interacciones MCP-1/M57_32 predichas *in silico* (Fig. 7, Tabla 10), así como el valor de K_d (92-117.4 pM, Fig.11B) calculados para M57_32 que sugieren que este aptámero interactúa con MCP-1. Es probable, dado el valor de K_d calculado para M57_32 que la independencia entre la señal obtenida y la concentración de MCP-1 (Fig 13C) sea producto de que se realizaron las determinaciones en la zona de saturación de la señal y sea necesario ensayar concentraciones menores de la proteína, aunque los valores de absorbancia fueron bajos (Fig. 13C).

Sería recomendable también ensayar concentraciones menores de MCP-1 para determinar con precisión el límite de detección del aptámero M146_47.

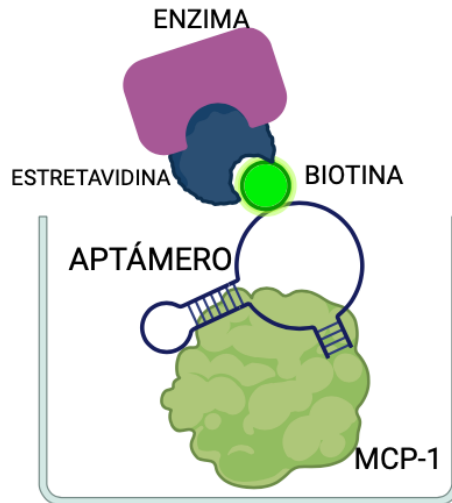


Figura 12. Diagrama esquemático de la técnica ELASA (Enzyme Linked Aptamer Sorbent Assay) directo utilizando aptámeros marcados. Se esquematiza la técnica ELASA (Enzyme Linked Aptamer Sorbent Assay) directo con aptámeros marcados. En esa variante se une la proteína a un soporte sólido, se incuba con el aptámero marcado con biotina y se revela la señal utilizando un conjugado estreptavidina-peroxidasa.

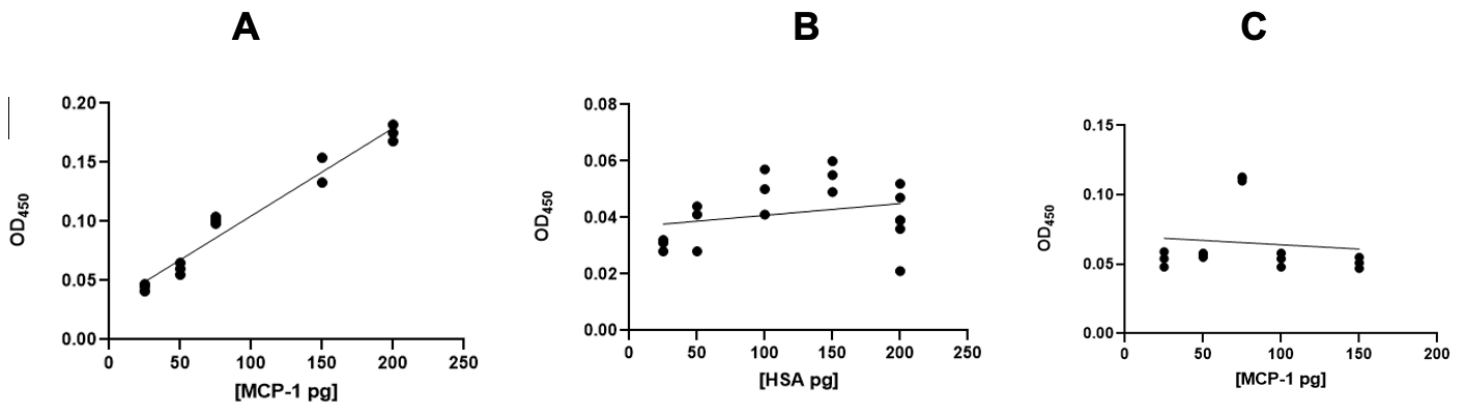


Figura 13. Determinación de la cantidad mínima (límite de detección) de MCP-1 y HSA mediante los aptámeros M146_47 y M57_32.

A: Detección de MCP-1 por M146_47; B: Detección de HSA por M146_47; C: Detección de MCP-1 por M57_32. OD: absorbancia a 450 nm del ensayo de ELASA colorimétrico.

4. Discusión

En este trabajo se desarrolló una estrategia consistente en un ciclo circular cerrado de selección *in vitro*, *in silico* para generar dos aptámeros contra MCP-1 humana compuestos por ADN. Hasta el momento no hay aptámeros de ADN reportados contra MCP-1 (Kulabhusan *et al.*, 2020b). Los aptámeros de ADN tienen ventajas sobre los de RNA fundamentalmente relacionadas con su estabilidad, facilidad de ser sintetizados químicamente y modificados para la realización de ensayos *in vitro*; así como también pueden ser fácilmente detectados y amplificados directamente mediante PCR (Tabla. 3) (Thiel y Giangrande, 2009). Por esa razón, para realizar el trabajo se utilizaron tres aptámeros de ADN, M146, M57 y M8, (Tabla. 7) que habían sido previamente seleccionados por SELEX *in vitro* contra MCP-1 en el grupo de trabajo (Alejandra Sánchez Espinosa, 2019) y se verificó que interactuaran con la forma monomérica y dimérica de MCP-1. Esta verificación era indispensable porque no se conocía si ellos eran capaces de reconocer la forma dimérica de la proteína, la cual se encuentra en equilibrio con la forma monomérica en el plasma humano (Wiesner *et al.*, 2013). En la forma dimérica podrían solaparse las regiones a las que se unían M146, M57 y M8, y disminuir por impedimento estérico la afinidad de los mismos por la proteína. En este análisis se predijo que, aunque los tres aptámeros era capaces de interactuar con las formas monomérica y dimérica de la proteína, también se unían a HSA con un puntaje favorable (Tabla. 6, Fig.3-4). Sobre todo, el aptámero M8 era el que más interactuaba con HSA y sus interacciones con MCP-1 eran más debiles que la de los dos otros aptámeros (Tabla. 6).

Esta verificación *in silico* de las interacciones que establecen los aptámeros seleccionados previamente mediante SELEX *in vitro* es una estrategia que simplifica la selección y ahorra tiempo y recursos porque permite realizar pocos ciclos de SELEX, como es el caso en la selección de M146, M57 y M8 (Alejandra Sánchez Espinosa, 2019), verificar la afinidad *in silico*, y de ser necesario optimizar la secuencia también *in silico* y cerrar el ciclo realizando las caracterizaciones *in vitro* del aptámero generado. Hay que destacar que esta estrategia tiene la desventaja de que las predicciones *in silico* de las interacciones ADN/proteína se basan en información de secuencia y por tanto los resultados pueden estar sesgados dado que la estructura tridimensional de los

aptámeros es un determinante importante de su afinidad por sus blancos (Murakami *et al.*, 2022). Hasta el momento las estrategias reportadas para el diseño y selección de aptámeros no combina ambos abordajes. En general, se realiza SELEX *in vitro* y se continua toda la caracterización *in vitro*, o se hace el diseño y selección *in silico* y después la caracterización final de los aptámeros candidatos *in vitro* (Chushak y Stone, 2009).

Por otra parte, la optimización de los aptámeros M146 y M57 *in silico* realizando mutaciones aleatorias en su secuencia permitió explorar la capacidad de un gran número de secuencias de interactuar con MCP-1 fijando como umbral las puntuaciones de interacción predichas para los aptámeros parentales (Tabla. 8). De igual manera se tuvo en cuenta el tipo de estructura secundaria que formaban cada una de estas nuevas secuencias de aptámeros (Tabla. 8). Aunque existen pocos reportes acerca de la relación entre el tipo de estructura secundaria de los aptámeros y su afinidad por sus blancos, ya es conocido que determinadas tipos de estructuras (Riccardi *et al.*, 2020), tales como las que forman tallos y burbujas realizan mejores interacciones, lo cual es un criterio adicional para guiar la selección *in silico*, y así disminuir la cantidad de candidatos a analizar.

Como resultado de la estrategia anterior se propusieron dos nuevos aptámeros candidatos, M146_47 y M57_32, y se procedió a caracterizarlos *in silico* mediante experimentos de acoplamiento molecular y predicciones de la interacción ADN /proteína (Tabla 10, Fig. 7). Las predicciones arrojaron que los aptámeros eran buenos candidatos para ser evaluados *in vitro*, por lo que se continuó con el próximo paso del ciclo. De acuerdo con las predicciones *in silico* los dos aptámeros desarrollados reconocen a MCP-1 en regiones diferentes de la proteína, por lo que pudiera evaluarse su utilización en ensayos ELASA tipo sándwich que hasta el momento no existe ninguno de ese tipo reportado con aptámeros contra MCP-1. Las caracterizaciones realizadas *in silico* tienen la ventaja de que permite descartar los aptámeros que tengan peor desempeño y que ya están optimizados porque transitaron por dos procesos de selección, *in vitro* e *in silico*.

La utilización de ensayos de PCR asimétrico para obtener ADN de cadena sencilla, y el formato de soporte sólido (placa de ELISA) para realizar las interacciones entre los aptámeros candidatos (M146_47 y M57_32) y MCP-1 y calcular su Kd mediante qPCR, simplificó el proceso de caracterización de los aptámeros M146_47 y M57_32. Estas técnicas han sido reportadas en la literatura para estos fines (Moreno *et al.* (2019), pero de forma aislada. La conjunción del uso de las mismas con la combinación de la selección *in silico*, *in vitro* de aptámeros contribuye con un gran ahorro de tiempo y reactivos durante el proceso.

En este trabajo se calculó la Kd aparente de los aptámeros M146_47 y M57_32 la cual es de 226.6 pM y 103 pM, respectivamente. La Kd de los aptámeros desarrollados está en el mismo orden que la de algunos aptámeros de RNA que se comercializan contra MCP-1 (Kulabhusan *et al.*, 2020b), siendo incluso menor que la del aptámero NOX-E36 el cual ya ha logrado pasar las fases 1 y 2 de ensayos clínicos (Kulabhusan *et al.*, 2020b), lo que los convierte en buenos candidatos para el desarrollo de ensayos de detección y cuantificación *in vitro* de MCP-1. Los resultados obtenidos también apuntan que estos aptámeros se unen de forma cooperativa a su blanco ($h > 1$ en el ajuste del modelo de unión), lo cual ya ha sido una característica reportada previamente para los aptámeros y que tiene como desventaja que disminuye la sensibilidad de los mismos (Zhang *et al.*, 2017).

El ensayo de determinación del límite de detección de MCP-1 reveló que mediante un ensayo tipo ELISA colorimétrico (Fig. 12) el aptámero M146_47 detectaba hasta 25 pg de MCP-1, y no tiene reacción cruzada con HSA (Fig. 13), mientras que el aptámero M57_32 no interactuó ni con MCP-1 ni HSA. Hasta el momento los aptámeros de RNA que se comercializan contra MCP-1 son solo confines de investigación y hay uno solo (NOX-E36) en ensayos clínicos (Kulabhusan *et al.*, 2020b). No hay reportes de ensayos diagnóstico de MCP-1 con esos aptámeros ni el límite de detección de cada uno de ellos. Por otra parte, el límite de detección de M146_47 pudiera ser menor si se usan otros marcadores más sensibles para revelar la interacción, como pueden ser los quimioluminiscentes.

En resumen, esta investigación se diferencia de la literatura existente al adoptar un enfoque holístico que integra el modelaje *in silico* con la validación experimental en las diferentes fases de la selección de los aptámeros. Esta estrategia es más completa y está orientada a obtener resultados más precisos, ofreciendo una alternativa al diseño de aptámeros para la detección de MCP-1 humana, que además tiene el potencial de impulsar el desarrollo de ensayos diagnósticos basados en aptámeros de ADN para aplicaciones biomédicas.

5. Conclusiones

1-Los aptámeros de ADN M146, M57 y M8 interactúan *in silico* con el monómero y el dímero de MCP-1, pero también lo hacen con albúmina humana, por lo que fue necesario optimizar sus secuencias para aumentar su sensibilidad y especificidad.

2-La generación de mutantes *in silico* de la secuencia de los aptámeros M146 y M57 generó dos nuevos aptámeros de ADN candidatos, M146_47 y M57_32, respectivamente, que obtuvieron mayor puntaje de interacción *in silico* con MCP-1 y menor con albumina humana que sus aptámeros parentales.

3-La amplificación de los aptámeros M146_47 y M57_32 mediante PCR asimétrico utilizando una relación de cebadores directo: reverso 20:1 y aplicando un gradiente de temperatura de 90-65°C durante 40 ciclos genera ADN de cadena sencilla de forma eficiente.

4-El aptámero M146_47 tiene una Kd aparente de 226.6 pM, mientras que el M57_32 de 103 pM, lo cual es comparable a la afinidad de los aptámeros de RNA contra MCP-1 comerciales.

5-El límite de detección de M146_47 por medio de un ensayo ELASA colorimétrico en soporte sólido, es de 25 pg para MCP-1, y no tiene reacción cruzada con HSA, mientras que M57_32 no detectó MCP-1 ni HSA en las condiciones ensayadas.

6-El aptámero M146_47 es un buen candidato para la detección de MCP-1 *in vitro* mediante ensayos ELASA indirecto.

6. Perspectivas

1-Se deben realizar experimentos de acoplamiento molecular entre los aptámeros M146_47 y M57_32 simultáneamente con MCP-1.

2-Se debe verificar la K_d de los aptámeros M146_47 y M57_32 por métodos más precisos, como pudiera ser Resonancia del Plasmón.

3-Se debe determinar el límite de detección de los aptámeros M146_47 y M57_32 empleando métodos más sensibles con marcadores quimioluminiscentes y en otro rango de concentraciones.

4-Se deben ensayar ELASA tipo sándwich utilizando los dos aptámeros M146_47 y M57_32 para detectar MCP-1 *in vitro*.

7. Referencias

1. Abhishek Futane, VigneswaranNarayanamurthy, Jadhav, P., y Srinivasan, A. (2023). *Aptamer-based rapid diagnosis for point-of-care application*. 27(2). <https://doi.org/10.1007/s10404-022-02622-3>
2. Akay, M. (2006). Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering. En Wiley eBooks. <https://doi.org/10.1002/9780471740360>
3. Al-Amrani, S., Al-Jabri, Z., AlZaabi, A., Alshekaili, J., y Al-Khabori, M. (2021). Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World Journal Of Biological Chemistry*, 12(5), 57-69. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v12.i5.57>
4. *Antibiotic use tied to Crohn's, ulcerative colitis | health.am*. (2020). Health.am. <http://www.health.am/digestive/more/antibiotic-use-tied-to-crohns-ulcerative-colitis/>
5. Aptamers for Medical Applications. (2021). *SpringerLink*. <https://doi.org/10.1007-978-981-33-4838-7>
6. Aslan, Y., Atabay, M., Hussain Kawsar Chowdhury, IlgimGöktürk, YeşerenSaylan, &FatihInci. (2023). *Aptamer-Based Point-of-Care Devices: Emerging Technologies and Integration of Computational Methods*. 13(5), 569–569. <https://doi.org/10.3390/bios13050569>
7. Barmania, F., y Pepper, M. S. (2013). *C-C chemokine receptor type five (CCR5): An emerging target for the control of HIV infection*. 2, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.atg.2013.05.004>
8. Beloborodov, S. S., Bao, J., Krylova, S. M., Agnesa Shala-Lawrence, Johnson, P. J., &Krylov, S. N. (2018). *Aptamer facilitated purification of functional proteins*. 1073, 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.024>
9. Bharat Gawande, Rohloff, J. C., Carter, J. D., Ira von Carlowitz, Zhang, C., Schneider, D., &NebojsaJanjic. (2017). *Selection of ADN aptamers with two modified bases*. 114(11), 2898–2903. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615475114>
10. Bull, S., y Doig, A. J. (2015). Properties of Protein Drug Target Classes. *PLOS ONE*, 10(3), e0117955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117955>
11. Calder, P. C., Ahluwalia, N., Albers, R., Bosco, N., Bourdet-Sicard, R., Haller, D., Holgate, S. T., Jönsson, L., Latulippe, M. E., Marcos, A., Moreines, J., M'Rini, C., Müller, M., Pawelec, G., Van Neerven, R. J. J., Watzl, B., y Zhao, J. (2013). A Consideration of Biomarkers to be Used for Evaluation of Inflammation in Human Nutritional Studies. *British Journal Of Nutrition*, 109(S1), S1-S34. <https://doi.org/10.1017/s0007114512005119>

12. CCL2 C-C motif chemokine ligand 2 [*Homo sapiens (human)*] - Gene - NCBI. (2023). Nih.gov. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6347>
 13. CédricBlanpain, Lee, B., Vakili, J., Doranz, B. J., CédricGovaerts, Migeotte, I., Sharron, M., Cho, M., Xiao, Y., Nie, J., Stewart, R., Csordas, A. T., Seung Soo Oh, Thomson, J. A., y H. Tom Soh. (2010). *Quantitative selection of ADN aptamers through microfluidic selection and high-throughput sequencing*. 107(35), 15373–15378. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009331107>
 14. Chow, M. T., y Luster, A. D. (2014). *Chemokines in Cancer*. 2(12), 1125–1131. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-14-0160>
 15. Chushak, Y., y Stone, M. O. (2009). In silico selection of RNA aptamers. *Nucleic Acids Research*, 37(12), e87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp408>
 16. Cruz-Hernández, C., Rodríguez-Martínez, G., Sergio Alberto Cortés-Ramírez, M Morales-Pacheco, Cruz-Burgos, M., Losada-Garcia, A., Juan Pablo Reyes-Grajeda, González-Ramírez, I., Gonzalez-Covarrubias, V., Camacho-Arroyo, I., Cerbón, M., &Rodríguez-Dorantes, M. (2022). *Aptamers as Theragnostic Tools in Prostate Cancer*. 12(8), 1056–1056. <https://doi.org/10.3390/biom12081056>
 17. *Cytokines and Chemokines*. (2018, June 23). Biology LibreTexts. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_\(Boundless\)/11%3A_Immunology/11.10%3A_Immunity_and_Molecular_Signals/11.10B%3A_Cytokines_and_Chemokines](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Boundless)/11%3A_Immunology/11.10%3A_Immunity_and_Molecular_Signals/11.10B%3A_Cytokines_and_Chemokines)
 18. DeFea, K. (2013). *Arrestins in Actin Reorganization and Cell Migration*. 205–222. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394440-5.00008-5>
 19. Deshmane, S. L., Kremlev, S. G., Amini, S., &Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal Of Interferon And Cytokine Research*, 29(6), 313-326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
 20. Deshmane, S. L., Kremlev, S. G., Amini, S., &Sawaya, B. E. (2009). *MonocyteChemoattractant Protein-1 (MCP-1): AnOverview*. 29(6), 313–326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
 21. Detección, cuantificación y análisis de proteínas. (s. f.).
- Diana Durán Palomino, y Luciana CavalheiroMarti. (2015). *Chemokines and immunity*. 13(3), 469–473. <https://doi.org/10.1590/s1679-45082015rb3438>

22. Dougherty, C. A., Cai, W., y Hong, H. (2015). *Applications of Aptamers in Targeted Imaging: State of the Art*. 15(12), 1138–1152. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150413153400>
23. Driscoll, K. E., y Guthrie, G. D. (2010). *Crystalline Silica and Silicosis*. 331–350. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-046884-6.00917-9>
24. *Drug discovery and development*. (s. f.). ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/book/9780702042997/drug-discovery-and-development>
25. Dupreiz, V., Vassart, G., Doms, R. W., & Parmentier, M. (1999). *Extracellular Cysteines of CCR5 Are Required for Chemokine Binding, but Dispensable for HIV-1 Coreceptor Activity*. 274(27), 18902–18908. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.27.18902>
26. eCancer. (2020, September 2). *Effective cancer immunotherapy further linked to regulating a cell “suicide” gene*. E Cancer.org; eCancer. <https://ecancer.org/en/news/18578-effective-cancer-immunotherapy-further-linked-to-regulating-a-cell-suicide-gene>
27. *endotoxin/lpstnf-alpha: Topics by WorldWideScience.org*. (2014). Worldwidescience.org. <https://worldwidescience.org/topicpages/e/endotoxin+lps+tnf-alpha.html>
28. *Enhanced Functional Potential of Nucleic Acid Aptamer Libraries Patterned to Increase Secondary Structure*. (2021). ACS Publications. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja103023m>
29. Evanoff, H. L., Burdick, M. D., Moore, S. A., Kunkel, S. L., & Strieter, R. M. (1992). *A Sensitive Elisa for the Detection of Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)*. *Immunological Investigations*, 21(1), 39-45. <https://doi.org/10.3109/08820139209069361>
30. Fitter, S., y James, R. P. (2005). *Deconvolution of a Complex Target Using ADN Aptamers*. 280(40), 34193–34201. <https://doi.org/10.1074/jbc.m504772200>
31. *Functional ADN Molecules Enable Selective and Stimuli-Responsive Nanoparticles for Biomedical Applications*. (2019). *Accounts of Chemical Research*. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.accounts.9b00167>

32. *Functional ADN Molecules Enable Selective and Stimuli-Responsive Nanoparticles for Biomedical Applications*. (2019). *Accounts of Chemical Research*. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.accounts.9b00167>
33. Gazzaniga, S., Bravo, A. I., Mordoh, J., &Wainstok, R. (s. f.). La proteína quimioattractante de monocitos correlaciona con la angiogénesis en melanomas metastásicos. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572006000400004&script=sci_arttext
34. Geng, A., Flint, E., &Bernsmeier, C. (2022). *Plasticity of monocytes and macrophages in cirrhosis of the liver*. 2. <https://doi.org/10.3389/fnetp.2022.937739>
35. Guest. (2015). *Adhesion Molecules (Modern Insights Into Disease from Molecules to Man) - PDF Free Download*. Epdf.mx; EPDF.MX. <https://epdf.mx/adhesion-molecules-modern-insights-into-disease-from-molecules-to-man.html>
36. Gupta, M., Chaturvedi, R., y Jain, A. (2013). Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic periodontal disease. *Cytokine*, 61(3), 892-897. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.12.012>
37. Hart, A., &Kamm, M. A. (2002). *Mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress*. 16(12), 2017–2028. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2002.01359.x>
38. Head, S. R., H. Kiyomi Komori, LaMere, S. A., Whisenant, T., Filip Van Nieuwerburgh, Salomon, D. R., &Ordoukhanian, P. (2014). *Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges*. 56(2), 61–77. <https://doi.org/10.2144/000114133>
39. Hila Geminder, Orit Sagi-Assif, Goldberg, L., TsipiMeshel, Gideon Rechavi, Witz, I. P., &Adit Ben-Baruch. (2001). *A Possible Role for CXCR4 and Its Ligand, the CXC Chemokine Stromal Cell-Derived Factor-1, in the Development of Bone Marrow Metastases in Neuroblastoma*. 167(8), 4747–4757. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4747>
40. <https://es.moleculardevices.com/applications/protein-detection-quantitation-and-analysis>
41. Hughes, C. F., y Robert. (2018). *A guide to chemokines and their receptors*. 285(16), 2944–2971. <https://doi.org/10.1111/febs.14466>

42. Jae Min Lee, So Hee Kim, Tae Hyeok Sim, JooHee Lee, y Kim, Y.-J. (2023). *NXP032 ameliorates cognitive impairment by alleviating of neurovascular aging process in aged mice brain*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2494231/v1>
43. Keane, P. A., &Sadda, S. R. (2012). *Development of Anti-VEGF Therapies for Intraocular Use: A Guide for Clinicians*. 2012, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/483034>
44. Kinghorn, A., Fraser, L. A., Liang, S., Simon, y Tanner, J. A. (2017). *Aptamer Bioinformatics*. 18(12), 2516–2516. <https://doi.org/10.3390/ijms18122516>
45. Kohlberger, M., &Gadermaier, G. (2021). SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. *Biotechnology And Applied Biochemistry*, 69(5), 1771-1792. <https://doi.org/10.1002/bab.2244>
46. Kovačević, K., Gilbert, J. C., y Jilma, B. (2018). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of aptamers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 134, 36-50. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.008>
47. Kulabhusan, P. K., Hussain, B., y Yüce, M. (2020a). Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents. *Pharmaceutics*, 12(7), 646. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070646>
48. PPAI: a web server for predicting protein-aptamer interactions. *BMC Bioinformatics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03574-7>
49. Lars Skjeldal, Peterson, F. C., Doreleijers, J. F., Moe, L. A., Pikus, J. D., Westler, W. M., Markley, J. L., Volkman, B. F., y Fox, B. G. (2004). *Solution structure of T4moC, the Rieske ferredoxin component of the toluene 4-monoxygenase complex*. 9(8), 945–953. <https://doi.org/10.1007/s00775-004-0594-4>
50. Layhadi, J. A. (s/f). *P2X receptor in human macrophages: role in ATP-evoked calcium responses and cytokine production*. Uea.ac.uk. Recuperado el 19 de octubre de 2023, dehttps://ueaeprints.uea.ac.uk/id/eprint/65123/1/PhD_Thesis_Janice_Layhadi_Corrected_2017.pdf
51. Lee, S., Cho, J., Lee, B., Hwang, D., y Park, J. (2023). Design and Prediction of Aptamers Assisted by In Silico Methods. *Biomedicines*, 11(2), 356. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020356>
52. Leyva-Illades, D., Cherla, R. P., Lee, M.-S., &Tesh, V. L. (2012). *Regulation of Cytokine and Chemokine Expression by the Ribotoxic Stress Response Elicited by Shiga Toxin Type 1 in Human Macrophage-Like THP-1 Cells*. 80(6), 2109–2120. <https://doi.org/10.1128/iai.06025-11>

53. Li, H., Wu, M., y Zhao, X. (2022). *Role of chemokine systems in cancer and inflammatory diseases*. 3(2). <https://doi.org/10.1002/mco2.147>
54. Li, H., Wu, M., y Zhao, X. (2022). *Role of chemokine systems in cancer and inflammatory diseases*. 3(2). <https://doi.org/10.1002/mco2.147>
55. Liu, H., Yang, Z., Lu, W., Chen, Z., Chen, L., Han, S.-Y., Wu, X., Cai, T., y Cai, Y. (2020). *Chemokines and chemokine receptors: A new strategy for breast cancer therapy*. 9(11), 3786–3799. <https://doi.org/10.1002/cam4.3014>
56. Liu, M., Wang, L., Lo, Y. S., Simon, Kinghorn, A., y Tanner, J. A. (2022). *Aptamer-Enabled Nanomaterials for Therapeutics, Drug Targeting and Imaging*. 11(1), 159–159. <https://doi.org/10.3390/cells11010159>
57. López-Botet, M. C., Martínez-Arias, J. M., Díaz-Mochón, J. F., García-Córdoba, F. J., y Fernández-Chamorro, M. T. (2011, November 16). Procedimiento para la obtención de un aptámero específico para la proteína MCP-1 y su aplicación en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes (Patente No. ES2397803T3). España: Oficina Española de Patentes y Marcas.
58. Miller, M., y Mayo, K. H. (2017). *Chemokines from a Structural Perspective*. 18(10), Mondal, J., Sharma, S., & RituKulshreshtha. (2019). *MicroRNA therapeutics in glioblastoma: Candidates and targeting strategies*. 261–292. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815669-8.00010-5>
59. Moreno, M., Fernández-Algar, M., Fernández-Chamorro, J., Ramajo, J., Martínez-Salas, E., y Briones, C. (2019). A Combined ELONA-(RT)qPCR Approach for Characterizing ADN and RNA Aptamers Selected against PCBP-2. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 24(7), 1213. <https://doi.org/10.3390/molecules24071213>
60. Murakami, K., Izuo, N., y Bitan, G. (2022). Aptamers targeting amyloidogenic proteins and their emerging role in neurodegenerative diseases. *Journal Of Biological Chemistry/The Journal Of Biological Chemistry*, 298(1), 101478. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101478>
61. Natsumi Masai, Tatebe, J., Yoshino, G., y Morita, T. (2010). *Indoxyl Sulfate Stimulates Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Inducing Oxidative Stress Through Activation of the NADPH Oxidase-Nuclear*

- Factor-KAPPA.B Pathway*. 74(10), 2216–2224. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-10-0117>
62. Ni, X., Castanares, M., Mukherjee, A., & Lupold, S. E. (2011). *Nucleic Acid Aptamers: Clinical Applications and Promising New Horizons*. 18(27), 4206–4214. <https://doi.org/10.2174/092986711797189600>
63. Nimjee, S. M., White, R. R., Becker, R. C., y Sullenger, B. A. (2017). Aptamers as Therapeutics. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 57(1), 61-79. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558>
64. Olivier Morteau. (2006). *CHEMOKINES*. 356–365. <https://doi.org/10.1016/b0-12-370879-6/00461-0>
65. *Omics Technologies and Bio-engineering: Volume 2: Towards Improving Quality of Life [1 ed.]* 0128158700, 9780128158708 - EBIN.PUB. (s. f.). ebin.pub. <https://ebin.pub/omics-technologies-and-bio-enginee>
66. Ospina, J. D. (2020). Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *Biomedica*, 40(Supl. 1), 148-165. <https://doi.org/10.7705/biomedica.47>
67. OziAdiSaputra, WahyuNurSafitriyono, DyahEllyawatiKusumaningtyas Maharani, Febiana, A., & FajarRakhmanWibowo. (2023). *pH-controlled release feature of chitosan assembled silica nanoparticles containing nano-formulated curcumin over in vitro gastric and physiological condition*. 53, 102793–102793. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102793>
68. Palopoli, N. (2019). Assessment of structure quality (RNA and protein). En *Elsevier eBooks* (pp. 586-605). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20147-7>
69. Pan, W., y Clawson, G. A. (2009). *The Shorter the Better: Reducing Fixed Primer Regions of Oligonucleotide Libraries for Aptamer Selection*. 14(4), 1353–1369. <https://doi.org/10.3390/molecules14041353>
70. Piotr Wojdasiewicz, Poniatowski, Ł. A., Andrzej Kotela, Jarosław Deszczyński, Ireneusz Kotela, & Dariusz Szukiewicz. (2014). *The Chemokine CX3CL1 (Fractalkine) and its Receptor CX3CR1: Occurrence and Potential Role in Osteoarthritis*. 62(5), 395–403. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0275-0>
71. Prabir Kumar Kulabhusan, Hussain, B., & Meral Yüce. (2020). *Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents*. 12(7), 646–646. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070646>

72. Ramesh, G., MacLean, A. G., y Philipp, M. T. (2013). *Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain*. 2013, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2013/480739>
73. Ramos, E., Piñeiro, D., Soto, M., Abánades, D. R., Martín, M., Salinas, M., y González, V. M. (2007). A ADN aptamer population specifically detects *Leishmania infantum* H2A antigen. 87(5), 409–416. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700535>
74. Rhodes, A., Smithers, N., Chapman, T., Parsons, S., y Rees, S. (2001). The generation and characterisation of antagonist RNA aptamers to MCP-1. *FEBS Letters*, 506(2), 85–90. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02895-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02895-2)
75. Riccardi, C., Napolitano, E., Musumeci, D., & Montesarchio, D. (2020). Dimeric and Multimeric ADN Aptamers for Highly Effective Protein Recognition. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 25(22), 5227. <https://doi.org/10.3390/molecules25225227>
76. *Role of Macrophage in Metabolic Syndrome*. (2023). Scribd. <https://es.scribd.com/document/93882252/Role-of-Macrophage-in-Metabolic-Syndrome#>
77. Singh, S., D Anshita, y V. Ravichandiran. (2021). *MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease*. 101, 107598–107598. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107598>
78. *Solution Structure of Phenol Hydroxylase Protein Component P2 Determined by NMR Spectroscopy*†. (2018). ACS Publications. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi9619233>
79. Shannon, L. A., McBurney, T. M., Wells, M., Roth, M. E., Calloway, P. A., Bill, C. A., Islam, S., y Vines, C. M. (2012). *CCR7/CCL19 Controls Expression of EDG-1 in T Cells*. 287(15), 11656–11664. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.310045>
80. Singh, S., D Anshita, y V. Ravichandiran. (2021). *MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease*. 101, 107598–107598. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107598>
81. Team, D. (2007, October 6). *The Power of APTAMERS in the Drug Discovery Process*. Drug Discovery World (DDW); Drug Discovery World (DDW). <https://www.ddw-online.com/the-power-of-aptamers-in-the-drug-discovery-process-1175-200710/>

82. Thiel, K. W., & Giangrande, P. H. (2009). Therapeutic Applications of ADN and RNA Aptamers. *Oligonucleotides/Oligonucleotides.*, 19(3), 209-222. <https://doi.org/10.1089/oli.2009.0199>
83. Tymoczko, J. L., y Stryer, L. (2013). Comprar Stryer Bioquímica 7a ed. | John L. Tymoczko | 9788429176025 | Reverté. <https://www.libreriasaulamedica.com/Stryer-Bioquimica-7-Ed.9788429176025.271242>
84. University of East Anglia. School of Biological Sciences. (s. f.). *P2X4 receptor in human macrophages: Role in ATP-evoked calcium responses and cytokine Production - UEA Digital Repository.* <https://ueaeprints.uea.ac.uk/id/eprint/65123/>
85. US9624497B2 - Nucleic acid aptamers - Google Patents. (2015, August 18). Google.com. <https://patents.google.com/patent/US9624497B2/en>
86. Van Tang Nguyen, Young Guen Kwon, y Man Bock Gu. (2017). *Aptamer-based environmental biosensors for small molecule contaminants.* 45, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.020>
87. Vorobyeva, M., Davydova, A., Pavel Vorobjev, DmitriiPyshnyi, & AlyaVenyaminova. (2018). *Key Aspects of Nucleic Acid Library Design for in Vitro Selection.* 19(2), 470–470. <https://doi.org/10.3390/ijms19020470>
88. Walter, J.-G., Stahl, F., y Scheper, T. (2012). *Aptamers as affinity ligands for downstream processing.* 12(5), 496–506. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100197>
89. Wang, H., X. (2013). *Mobile Microbiome: Oral Bacteria in Extra-oral Infections and Inflammation - Y.W. Han, X. Wang, 2013.* Journal of Dental Research. <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0022034513487559?journalCode=jdrb>
90. Wang, X., Zhang, Y., Wang, S., Ni, H., Zhao, P., Chen, G., Xu, B., y Yuan, L. (2022). *The role of CXCR3 and its ligands in cancer.* 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1022688>
91. White, J. M. (1994). *Platelets and atherosclerosis.* 24(S1), 25–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1994.tb02422.x>
92. Wiesner, P., Tafelmeier, M., Chittka, D., Choi, S., Zhang, L., Byun, Y. S., Almazan, F., Yang, X., Iqbal, N., Chowdhury, P., Maisel, A., Witztum, J. L., Handel, T. M., Tsimikas, S., y Miller, Y. I. (2013). MCP-1 binds to oxidized LDL and is carried by lipoprotein(a) in human plasma. *Journal Of Lipid Research*, 54(7), 1877-1883. <https://doi.org/10.1194/jlr.m036343>

93. Wilkins, C. L., y Lay, J. O., Jr (Eds.). (2005). *Identification of microorganisms by mass spectrometry*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/0471748641>
94. Y;Zhou, L. (2023). Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cellular y Molecular Immunology*, 1(2). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16212895/>
95. Yin, K., y Gold, R. (2014). *Vitamin D and inflammatory diseases*. 69–69. <https://doi.org/10.2147/jir.s63898>
96. Yoon, S., y Rossi, J. J. (2018). *Aptamers: Uptake mechanisms and intracellular applications*. 134, 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.003>
97. Yoshimura, T., Li, C., Wang, Y., y Matsukawa, A. (2023). The chemokine monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 is a promoter of breast cancer metastasis. *Cellular y Molecular Immunology*, 20(7), 714-738. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01013-0>
98. Zhang, Y., Lai, B., & Juhas, M. (2019). *Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications*. 24(5), 941–941. <https://doi.org/10.3390/molecules24050941>
99. テンホー, クリストファー. (2008, 25 abril). *JP6106854B2 - Antibodies against FCRN and uses thereof* - Google Patents. <https://patents.google.com/patent/JP6106854B2/en>