

Selección de aptámeros anti-HER2 y su evaluación en líneas celulares de cáncer de mama

Tesina final de grado para la obtención del título
Licenciado en Bioquímica

Santiago Pintos Alvariza

Tutora: Dra. Victoria Calzada Falcón

Co-tutora: Dra. María Moreno Jauge

Laboratorio de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares,
Facultad de Ciencias

Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene,
Facultad de Medicina

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

2024



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Centro de
Investigaciones Nucleares
Facultad de Ciencias

ih
INSTITUTO DE HIGIENE
Prof. Arnoldo Berta
FACULTAD DE MEDICINA

For Women
in Science
FOUNDATION
VIOREAL



Agradecimientos

A Victoria por darme la oportunidad de formar parte del proyecto de investigación en el que se enmarca esta tesina, sin ambos, dicha estrategia no hubiera sido posible.

A María, por las enseñanzas durante el transcurso de la misma, por tenerme paciencia en los primeros ensayos de citometría de flujo y explicarme una y otra vez las cosas que no entendía.

A Mauro, por estar siempre dispuesto a explicarme dudas y a resolver problemas de cultivo celular que ocurrían en el momento mientras estaba aprendiendo.

A mis compañeros de carrera y amigos de facultad Lu, Loli, Lau, Jani, Belu, Vicky y Giuli, por hacerme sentir menos pesada y más divertida la carrera, así como entender mi frustración y estrés.

A mis amigos de toda la vida, Mau, Jenni, Eve y Marta por apoyarme todos estos años en cada una de mis decisiones y ayudarme siempre en lo que necesite, aunque ellas no entiendan mucho de ciencia.

A mis padres y hermanos, por apoyarme cuando quise cambiar de carrera y por alentarme a seguir estudiando lo que me gusta de verdad, que es la ciencia.

A mi abuelo Dardo que extraño un montón, al que quisiera contarle todo lo que he logrado y crecido en este tiempo. Por las enseñanzas que me inculcó desde muy chico, por los buenos momentos compartidos, y por hacerme interesarme en la ciencia en general, formando en parte a la persona que soy hoy.

Al Centro de Investigaciones Nucleares e Instituto de Higiene que me abrieron las puertas para poder realizar dicha tesina.

Finalmente, al Premio L'Oréal UNESCO 2020 por las mujeres en la ciencia. Sin el financiamiento por los mismos, nada de esto hubiera sido posible, teniendo la oportunidad de tener un cargo (N.º 10108) y participar en dicho proyecto.



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Centro de
Investigaciones Nucleares
Facultad de Ciencias



Resumen

El cáncer de mama, es el cáncer más común y la principal causa de muerte en mujeres en todo el mundo. Es una enfermedad heterogénea clasificada en distintos subtipos moleculares debido a la presencia o ausencia de receptor de estrógeno (ER), progesterona (PR) o factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). El subtipo HER2, comprende casi entre 10-15% de todos los cánceres de mama invasivos. La primera línea de tratamiento del cáncer de mama HER2+, es mediante el uso de anticuerpos Trastuzumab y Pertuzumab, dado que se unen al subdominio IV y II del receptor, respectivamente. En este sentido, las tasas de supervivencia superan el 90% en cáncer de mama HER2+ temprano, si se trata con quimioterapia, terapia con doble anticuerpo, etc. Sin embargo, pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico, desarrollan resistencia a los mismos, lo que conduce a la progresión de la enfermedad, muriendo una gran cantidad de pacientes. Este hecho exige nuevos enfoques terapéuticos para tratar el cáncer, siendo los aptámeros candidatos con gran potencial dada su alta afinidad y alta especificidad por su blanco molecular. Además, tienen rápida penetración en los tejidos, facilidad de ser sintetizados y modificados químicamente, por lo que la administración de fármacos dirigida a tumores, mediante el uso de aptámeros, puede aumentar la eficacia de la terapia y reducir la toxicidad de la misma. Los aptámeros son obtenidos mediante SELEX, realizando distintas rondas contra un blanco específico y posteriormente, realizando la separación y la amplificación de los aptámeros unidos al blanco. De este modo, los aptámeros pueden unirse a blancos específicos, bajo ciertas condiciones (pH, Temperatura, fuerza iónica, etc) formando estructuras definidas, confiriéndoles la capacidad de unirse a diversas moléculas, presentando una unión específica aptámero-ligando con afinidades en el entorno de μM - nM . A efectos de mejorar la estrategia de SELEX, se diseñaron diferentes tipos de metodologías (Cell-SELEX, *In Vivo*-SELEX, etc) siendo aplicadas de acuerdo a las propiedades y entorno que presente la molécula blanco.

En este marco, se realizó una estrategia de selección de aptámeros por Cell-SELEX, con las líneas celulares BT-474 con alta expresión del receptor HER2. Se realizaron rondas que consistían en un Cell-SELEX convencional y rondas especializadas en las que se utilizó como guía los anticuerpos Trastuzumab y Pertuzumab a efectos obtener aptámeros contra los subdominios II y IV del receptor HER2. Finalmente, el enriquecimiento de las rondas se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados indican que se obtuvo una población de aptámeros enriquecidos, lo cual tiene gran potencial para ser utilizado a futuro en aplicaciones biomédicas. Esto nos impulsa a seguir trabajando con los aptámeros generados y en profundizar la caracterización de los mismos.

Palabras clave: Cáncer de mama; Receptor HER2; Trastuzumab; Pertuzumab; Aptámero; Cell-SELEX, LGCS.

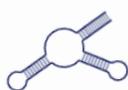
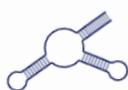


Tabla de contenidos

Agradecimientos	2
Resumen	3
I. Introducción	6
1. Cáncer	6
1.1 Cáncer de mama.....	7
1.2 Anatomía de la mama.....	8
1.3 Clasificación histológica del cáncer de mama	9
1.4 Clasificación molecular del cáncer de mama	11
1.5 Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)	14
1.6 Diagnóstico	16
1.7 Tratamiento	17
2. Aptámeros	20
2.1 Aplicaciones de aptámeros.....	21
2.2 Aptámeros con estructuras secundarias G-quadruplex	23
3. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX)	24
3.1 SELEX convencional	25
3.2 Cell-SELEX	27
3.3 Tissue-SELEX.....	29
3.4 <i>In Vivo</i> -SELEX	30
3.5 Astringencia	32
4. Antecedentes	33
II. Hipótesis y Objetivos	34
Hipótesis	34
Objetivos Generales	34
Objetivos Específicos.....	34
III. Materiales y métodos	35
1. Reactivos y materiales utilizados	35



2. Preparación de disoluciones y cultivo celular.....	36
2.1 Disoluciones generales.....	36
2.2 Preparación de anticuerpos Trastuzumab y Pertuzumab.....	36
2.3 Cultivo celular.....	37
3. Diseño de selección.....	38
3.1 Cell-SELEX	40
3.2 LGCS.....	41
3.3 Amplificación por PCR.....	42
3.4 Purificación de aptámeros	42
4. Caracterización de la población de aptámeros.....	43
4.1 Marcación de la población de aptámeros R6T+P1, R6P+P1 y R1P2 con Primer FITC	43
4.2 Citometría de población de aptámeros	43
4.3 Estrategia de Gating	45
IV. Resultados y Discusión	46
1.1 Enriquecimiento de aptámeros anti-HER2 en las sucesivas rondas de selección por Cell-SELEX	46
1.2 Evaluación de las poblaciones de aptámeros dirigida a los subdominios II y IV.	48
V. Conclusiones.....	52
VI. Bibliografía	53



I. Introducción

1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad o conjunto de enfermedades (**Figura 1**) que a diferencia de las infecciosas y parasitarias, no es desencadenada por alguna entidad extraña en nuestro cuerpo, sino por alteraciones en el ADN de la célula. Dichas alteraciones en el ADN pueden ser reordenamientos cromosómicos, mutaciones y cambios epigenéticos que llevan, en este último caso, a la activación de genes promotores del crecimiento tumoral o a la inhibición de genes supresores de tumores, provocando un crecimiento incontrolable de la célula que conduce al desarrollo del cáncer (Hausman, 2019; Provenzano, Ulaner, & Chin, 2018).

Esta enfermedad es una de las principales causas de muerte en el mundo, se estima que en el 2020 se produjeron 19,3 millones de casos nuevos y casi 10 millones de muertes por cáncer (**Figura 1**). Es un problema global en aumento, que se agudiza mayormente en los países con un bajo y medio poder adquisitivo debido principalmente a la falta de recursos que promuevan programas de prevención, pruebas diagnósticas y métodos modernos para el tratamiento (Smolarz, Nowak, & Romanowicz, 2022; Sung et al., 2021; Vineis & Wild, 2014).

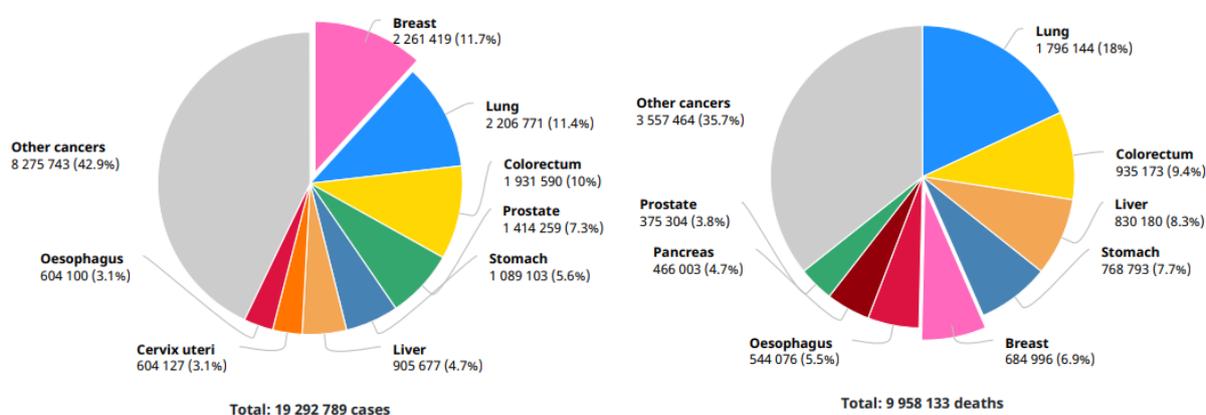


Figura 1. Distribución de la incidencia (izquierda) y mortalidad (derecha) mundial entre los diferentes tipos de cáncer en el año 2020, así como el número de cantidad de casos y muerte, para ambos sexos. Extraído y modificado de (Sung et al., 2021).

En el Uruguay, la situación epidemiológica en relación a las muertes por cáncer de acuerdo con la información difundida por el ministerio de salud, constituyen un 25% del total de las defunciones registradas en cada año (**Figura 2**) (CHLCC, 2022).

MORTALIDAD EN URUGUAY - 2020
 TOTAL DE MUERTES: 32.638

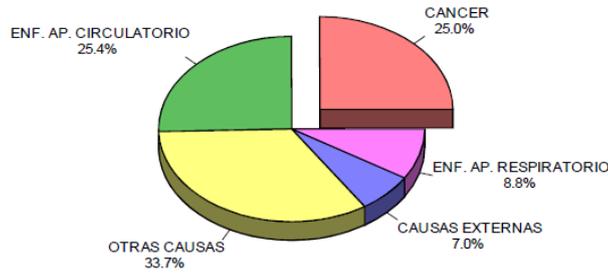


Figura 2. Distribución de la mortalidad en el Uruguay por diferentes causas. Extraído de (CHLCC, 2022).

1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer más común y la principal causa de muerte en mujeres en todo el mundo (**Figura 3**). Aproximadamente 1,38 millones de casos fueron diagnosticados en 2008 y alrededor del 60% de las muertes ocurrieron en países en desarrollo. Esto es debido a que dichos países enfrentan limitaciones en recursos e infraestructura que desafían el objetivo de mejorar el reconocimiento, diagnóstico y manejo oportuno, con una tasa de supervivencia estimada a los 5 años del 80% en los países desarrollados y por debajo del 40% en los países en desarrollo (Akram, Iqbal, Daniyal, & Khan, 2017). En consecuencia, mujeres de zonas rurales y remotas son las más afectadas puesto que tienen menos acceso a servicios de salud y menores ingresos (Gholikhani et al., 2022).

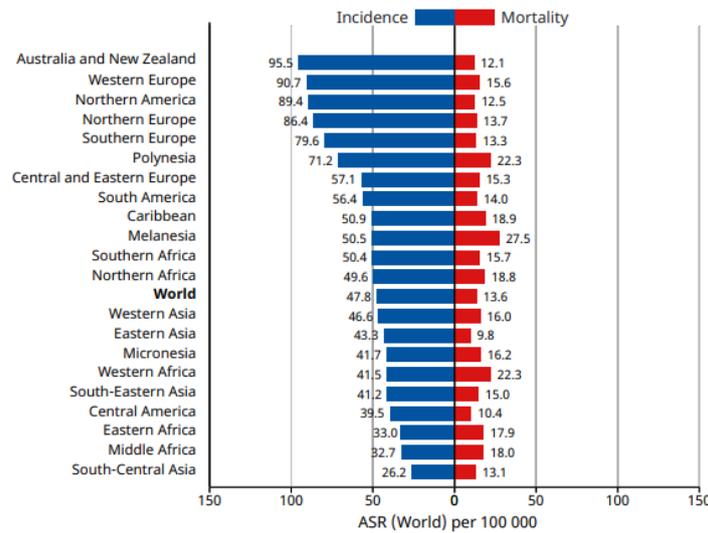
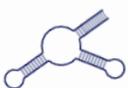


Figura 3. Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer de mama en el 2020 a nivel mundial, estandarizadas por 100.000 por año y por edad. Extraído y modificado de (Sung et al., 2021).



En Uruguay, si se excluye el cáncer de piel, el cáncer de mama es el más frecuente, registrándose aproximadamente unos 2000 casos anuales, siendo en mujeres una de las principales causas de muerte, en vista de que se producen 715 muertes por año. Por ende, respecto a las tasas de incidencia y mortalidad (periodo 2015-2019) por edad en comparación con otros tipos de cáncer (**Figura 4**), fueron de un 75,33% y 21,54% respectivamente (CHLCC, 2023).

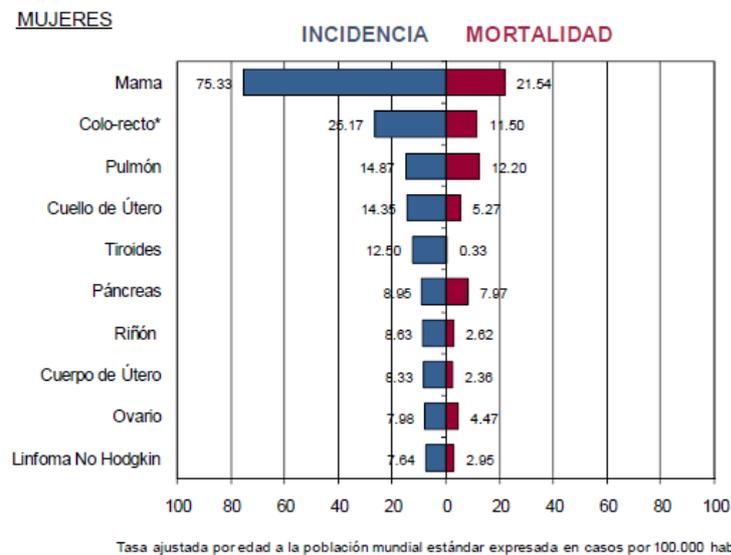


Figura 4. Principales sitios de incidencia del cáncer, con su respectiva tasa de mortalidad en Mujeres durante el periodo 2015-2019. Extraído y modificado de (CHLCC, 2023).

Por otra parte, el cáncer de mama es una enfermedad iniciada en las células mamarias, debido a causas como ser; herencia de fallas o generación de daño en el ADN, alteración hereditaria por exposición a estrógenos o genes como *P53*, *BRCA1*, *BRCA2*, entre otros. Dado que *P53* es un gen importante en el control de la división y destrucción de las células y *BRCA1* y *BRCA2* son genes implicados en la reparación del ADN. Asimismo, pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama u ovario tienen posibilidades de desarrollar este tipo de cáncer. Puesto que el cáncer de mama ocurre debido a una asociación entre factores genéticos y ambientales; cuando se produce una mutación en los genes involucrados en la codificación de la vía RAS/MEK/REK y la vía PI3K/AKT (vías que defienden a las células normales de la muerte celular), las células se vuelven incapaces de inducir su muerte celular, lo que conduce al desencadenamiento de dicho cáncer (Akram et al., 2017).

1.2 Anatomía de la mama

La mama está formada por tejido graso denominado tejido adiposo, dicho tejido está constituido de vasos sanguíneos, vasos linfáticos, ganglios linfáticos, tejido conjuntivo fibroso y ligamentos. Por otra parte, la epidermis de la areola y pezón se encuentran muy pigmentadas y arrugadas, conteniendo esta última varias glándulas sudoríparas apocrinas y sebáceas, así como pelo algo pequeño. Si bien tanto los hombres como las mujeres presentan mamas, las de las mujeres tienden a contener más tejido

glandular que los hombres (**Figura 5**). Es pertinente señalar que, a diferencia de la de los hombres, son muy sensibles a cambios hormonales en el cuerpo que están estrechamente asociados con el sistema genital, dado que adoptan cambios cíclicos en sincronía con el ciclo menstrual. Por otro lado, las mamas de las mujeres contienen entre 12 a 20 lóbulos que se dividen a su vez en lóbulos más pequeños, los cuales se encuentran conectados a través de conductos lácteos denominados conductos galactóforos. Estos conductos son dirigidos hacia la base del pezón para funcionar como transportadores de leche hacia estos. Asimismo, en lo profundo del pezón y la areola, varias fibras musculares lisas se ubican de manera radial y circular en el tejido conjuntivo denso y longitudinalmente a lo largo de los conductos galactóforos que se alargan hasta el pezón, para provocar el vaciamiento de las mamas, la erección del pezón y la contracción de la areola. Sin embargo, dicho tejido mamario también se puede expandir erráticamente hacia la axila (Akram et al., 2017; Jesinger, 2014).

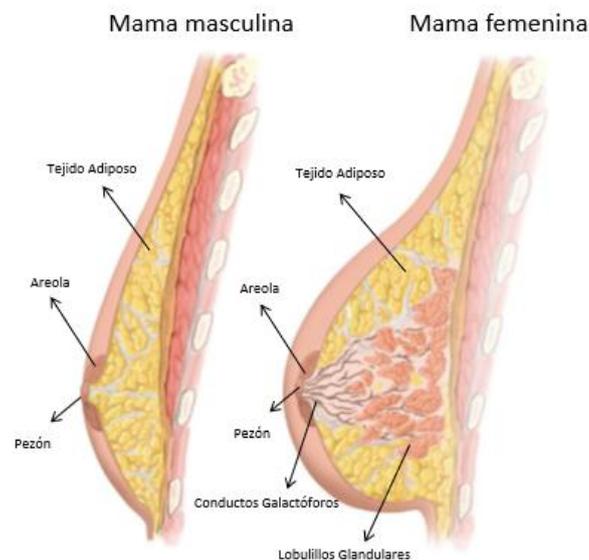
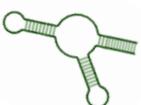
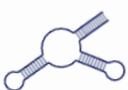


Figura 5. Anatomía de la mama normal masculina y femenina en sección transversal, con sus respectivas diferencias. Extraído y modificado de (Jesinger, 2014).

1.3 Clasificación histológica del cáncer de mama

Los cánceres de mama son heterogéneos, presentando características morfológicas y moleculares bien diferenciadas, lo que conlleva a que su comportamiento clínico y respuesta al tratamiento difiera. Es por ello, que la clasificación del cáncer es de suma importancia para proporcionar un diagnóstico preciso de la enfermedad, así como predecir el comportamiento de dicho tumor, facilitando la toma de decisiones para el tratamiento (Tsang & Tse, 2020).

Históricamente, los sistemas de clasificación del cáncer de mama se han basado en la evaluación histopatológica, incluyendo el tipo y grado histopatológico (Vuong, Simpson, Green, Cummings, & Lakhani, 2014). Según el sitio, los cánceres de mama a nivel histológico, se dividen en cánceres invasivos y no invasivos. El cáncer de mama no invasivo, es aquel que no se ha extendido fuera del



lóbulo o conductos galactóforos. Un ejemplo de este tipo de cáncer es el carcinoma ductal *in situ* (DIC), el cual aparece cuando se desarrollan células atípicas dentro de los conductos y que no se han extendido a la proximidad del tejido o al exterior, sin embargo, existe la posibilidad de que a futuro puedan progresar y convertirse en un cáncer de mama invasivo. Un cáncer de mama invasivo existe cuando las células tumorales dentro de los lobulillos o conductos galactóforos se distribuyen en las proximidades del tejido mamario. Por consiguiente, dichas células durante su desarrollo o cuando el tumor es grande, pueden pasar a través de la mama a diferentes partes del cuerpo a través del sistema inmunitario o a la circulación sistémica, llegando a otros órganos como ser el cerebro, los huesos, los pulmones y el hígado. Esta invasión es conocida como metástasis.

Dentro de los diferentes tipos de carcinoma que hay, el carcinoma de mama invasivo es el más frecuente en mujeres (Akram et al., 2017), habiendo más de 21 subtipos definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). De estos subtipos, el más frecuente es el carcinoma ductal invasivo (40% al 75% de los casos), perteneciendo el resto a un tipo “especial” morfológicamente distinto que incluye al carcinoma invasivo lobulillar, tubular, mucinoso, metaplásico, carcinoma con características medulares, neuroendocrinas o apocrinas (**Figura 6**).

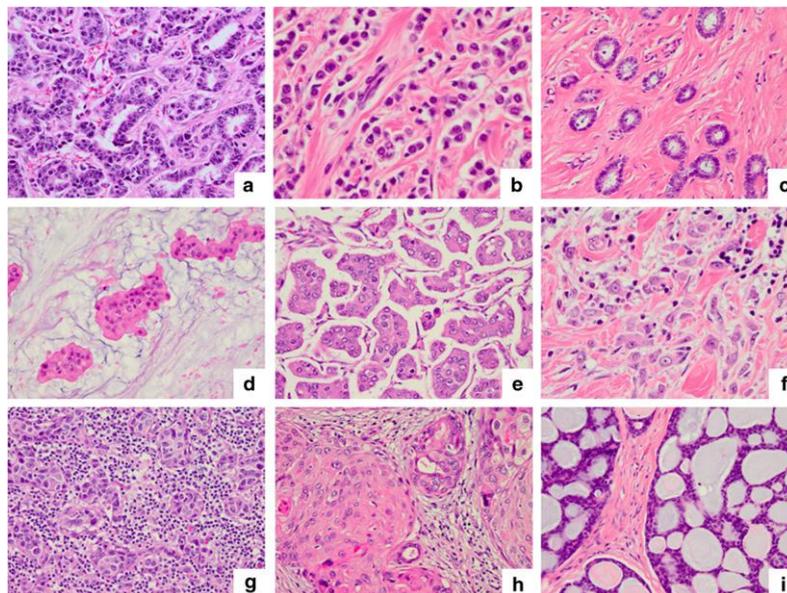


Figura 6. Algunas variantes histológicas, morfológicas representativas del cáncer de mama invasivo, siendo a) carcinoma ductal invasivo, b) carcinoma lobulillar clásico, c) carcinoma tubular, d) carcinoma mucinoso, e) micropapilar invasivo, f) carcinoma lobulillar pleomórfico, g) carcinoma medular, h) carcinoma metaplásico, i) carcinoma quístico adenoide. Extraído de (Vuong et al., 2014).

Asimismo, todos los carcinomas invasivos, independientemente del tipo histológico, son categorizados por un sistema de clasificación de Bloom y Richardson (Bloom & Richardson, 1957), modificado por Elston y Ellis (Elston & Ellis, 1991). En dicho sistema, se asignan puntuaciones que

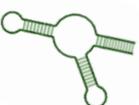
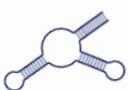


van del 1 al 3, para la proporción de formación de túbulos (siendo 3 una formación deficiente), el grado de pleomorfismo nuclear (siendo 3 alto grado de pleomorfismo) y el recuento mitótico (siendo 3 alto recuento mitótico). Posteriormente, las puntuaciones se combinan para dar un grado de 1 (entre 3 y 5), 2 (entre 6 y 7) o 3 (entre 8 y 9), en el que los tumores de grado 1 son los más diferenciados y los de grado 3 menos. La diferencia entre los grados recae además que aquellos cánceres de mama de alto grado, reaparecen y hacen metástasis tempranamente, mientras que aquellos con grado bajo, suelen tener una buena respuesta clínica (Vuong et al., 2014).

1.4 Clasificación molecular del cáncer de mama

Más reciente, los datos moleculares obtenidos de una diversidad de técnicas como ser hibridación genómica comparativa (CGH), perfiles de expresión génica, secuenciación masiva, entre otros, han permitido detectar mutaciones, reordenamientos cromosómicos y alteraciones en el número de copias del genoma. Estos datos que aportan información genotípica, han sido utilizados para refinar la clasificación del cáncer de mama, de manera de proporcionar un nuevo nivel de conocimiento sobre la complejidad de los cambios genéticos y la existencia de heterogeneidad intratumoral, permitiendo predecir el pronóstico, así como el tipo de respuesta potencial y tratamiento endócrino. Lo anterior, con el objetivo de dar una terapia más individualizada del paciente mediante el uso de biomarcadores. Los biomarcadores son “una característica medible, que permite evaluar objetivamente, usándose como un indicador de procesos biológicos normales, patogénicos o respuestas farmacológicas en una intervención terapéutica” (Kashyap et al., 2022). En la práctica clínica de rutina para cáncer de mama, sólo tres se usan en todo el mundo: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y el receptor de factor epidérmico humano 2 (HER2) (Provenzano et al., 2018; Vuong et al., 2014). Estas moléculas normalmente están presentes en células normales pero en menor cantidad (Tsang & Tse, 2020). Por tanto, una clasificación molecular es necesaria de manera de categorizar a los pacientes que puedan beneficiarse de una terapia dirigida, como ser la terapia hormonal y la terapia anti-HER2 (Orrantia-Borunda, Anchondo-Nuñez, Acuña-Aguilar, Gómez-Valles, & Ramírez-Valdespino, 2022).

La inmunohistoquímica de estos receptores permite clasificar molecularmente los cánceres de mama en 4 subtipos intrínsecos de acuerdo a la expresión de los mismos (ER+, PR+, HER2+): Luminal A, Luminal B, subtipo HER2 y cáncer de mama triple negativo (TNBC), siendo este último caracterizado por la falta de expresión de dichos receptores (**Figura 7,8**). Por otra parte, se ha visto que la expresión de ki-67 muestra tasas de supervivencia más bajas, por lo que se ha utilizado como biomarcador para proveer información sobre la proliferación celular, permitiendo en conjunto, determinar la agresividad del cáncer junto con la respuesta al tratamiento y el tiempo hasta la ocurrencia, por ende, el mismo es crucial al momento de elegir la terapia de tratamiento adecuada (Gupta, Rai, Agarwal, & Namdev, 2018; Hammond et al., 2010; Orrantia-Borunda et al., 2022).



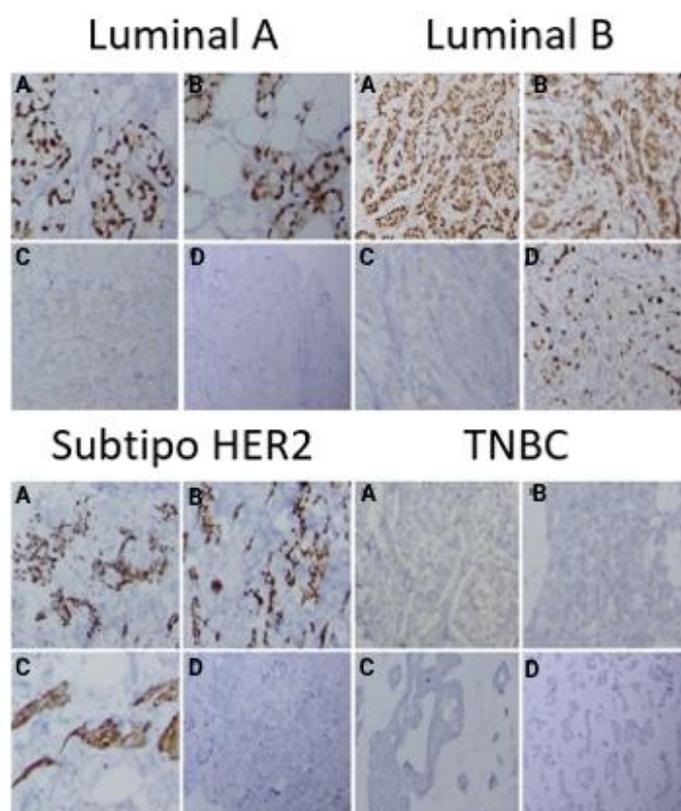


Figura 7. Inmunohistoquímica de los carcinomas de mama invasivos Luminal A, Luminal B, subtipo HER2 y TNBC. Siendo el cuadrante teñido (en caso de corresponder): A. Receptor de Estrógeno, tinción nuclear; B. Receptor de Progesterona, tinción nuclear, C. Receptor HER2, tinción de membrana, D. Ki-67, tinción nuclear. Extraído y modificado de (Orrantia-Borunda et al., 2022).

El subtipo molecular luminal A es el más común y representa entre 40-50% de los cánceres de mama invasivos. Generalmente es de bajo grado, de crecimiento lento, con el mejor pronóstico y mayor tasa de supervivencia entre todos los subtipos intrínsecos. Se caracteriza por la presencia de ER y/o PR y la ausencia de HER2, asimismo tienen una baja expresión del marcador de proliferación celular ki-67 (menor del 20%). Los luminal B constituyen entre 10-20% de los tumores luminales. Suelen ser de mayor grado, por lo que tienen un peor pronóstico que los anteriores. Además, muestran una expresión más baja de genes relacionado con ER, pero una expresión más alta de genes relacionados con la proliferación y una expresión variable de genes relacionados con HER2 que los cánceres luminales A. Son ER+ y pueden ser PR- o PR+. Por otra parte, tienen una alta expresión de ki-67, haciendo que este tipo de tumores crezcan más rápido que los luminales A (Inic et al., 2014). El subtipo HER2 comprende aproximadamente entre 10-15% de todos los cánceres de mama invasivos, y está caracterizado, por la sobreexpresión de genes asociados a la señalización de otros genes implicados en la activación de la vía de HER2/HER2, ubicados en el amplicón de HER2 en el cromosoma 17, brazo q, banda 1, subbanda 2 (Chr17q12), y por la ausencia de ER y PR. Estos tumores crecen más rápido que los luminales y suelen ser de alto grado, teniendo un curso clínico agresivo. Dentro de este subtipo se distinguen dos

subgrupos: HER2 luminal (ER+, PR+, HER2+ y ki-67 entre 15-30%) y HER2 enriquecido (ER-, PR-, HER2+ y ki-67>30%) (Krishnamurti & Silverman, 2014). El subtipo TNBC constituye el 15-20% de todos los cánceres de mama y es el más común entre las mujeres menores de 40 años y mujeres afroamericanas. Dicho subtipo se clasifica en varios subgrupos adicionales, como ser los basales (BL1 y BL2), claudin-bajo mesenquimales (MES), receptores de andrógenos luminales (LAR) e inmunomoduladores (IM), en el que los dos primeros están presentes con una frecuencia del 50-70%, mientras que el resto entre 20-30%. Asimismo, a diferencia de los otros subtipos, cada uno de estos subgrupos presenta resultados clínicos, genotípicos y sensibilidades farmacológicas distintas. El TNBC es el más agresivo de todos los subtipos y el 80% de los cánceres de mama (gen supresor de tumores *BRCA1* y *BRCA2*) pertenecen a este grupo. El riesgo de desarrollar TNBC varía según la genética, la edad, el peso, la raza y la obesidad, así como los patrones de lactancia y la paridad. En suma, el TNBC presenta una alta tasa de proliferación, alteración de genes implicados en la reparación del ADN y aumento de la inestabilidad genómica, siendo más agresivo, presentando recaídas tempranas, con tendencias a presentarse en estadios avanzados (Kumar & Aggarwal, 2016; Orrantia-Borunda et al., 2022; Tsang & Tse, 2020).

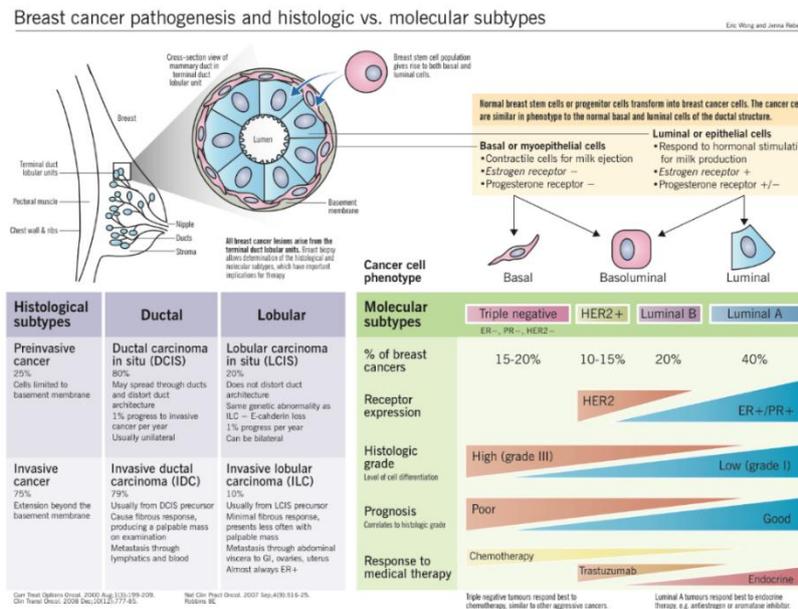


Figura 8. Clasificación histopatológica y clasificación molecular del cáncer de mama, y sus diferencias, siendo ER (receptor de estrógeno), PR (receptor de progesterona), HER2 (receptor epidérmico humano). Extraído de Eric Wong y Jenna Rebelo.

1.5 Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)

En el año 1984, Weinberg y colaboradores describieron por primera vez al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, HER2/neu, erbB2), una glicoproteína transmembrana de 185 kDa receptora de tirosina quinasa. Dicho HER2, es miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, también conocido como erbB) o familia HER (**Figura 9**) (Schechter et al., 1984). La familia HER está constituida por HER1 (erbB1), HER2 (erbB2), HER3 (erbB3) y HER4 (erbB4). Dicha familia de receptores cumple un rol en la comunicación célula-célula y célula-estroma, principalmente mediante un proceso denominado transducción de señales. En este proceso, diversos factores de crecimiento externos o ligandos influyen en la transcripción de varios genes al fosforilar una serie de residuos, provocando la activación de intermediarios de señalización intracelular, de los cuales varios poseen actividad enzimática y en última instancia terminan afectando la proliferación celular, la supervivencia, la motilidad y la adhesión (Eigenbrot, Ultsch, Dubnovitsky, Abrahmsén, & Härd, 2010; Ross et al., 2009; Schechter et al., 1984).

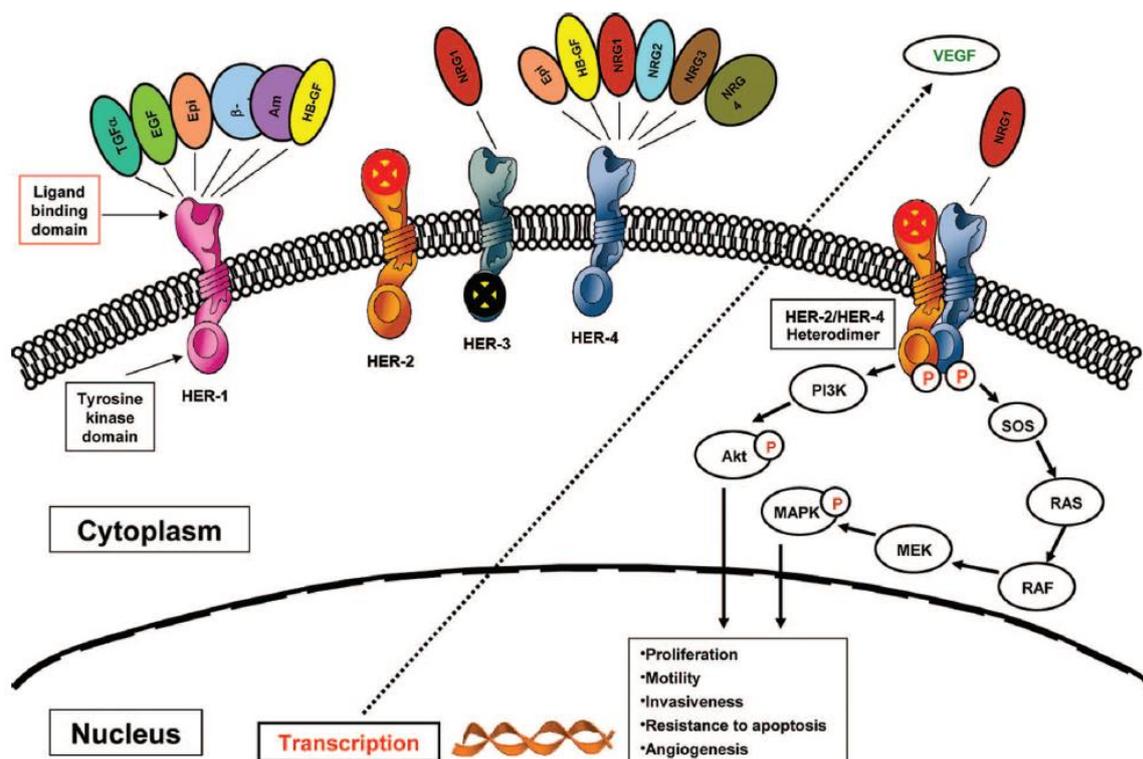
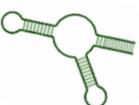
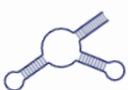


Figura 9. Familia de genes del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER), en el que se observa la complejidad de las vías de señalización iniciadas por receptores de proteínas de la familia HER en la superficie celular y como su activación o inhibición estimulan la señalización corriente abajo en otras vías biológicas. Extraído de (Ross et al., 2009).

Los receptores de la familia HER son mediadores esenciales de la proliferación y diferenciación celular en el desarrollo del embrión y en tejidos adultos, por lo que su activación inapropiada, se asocia con el desarrollo de muchos tipos de cáncer. De igual modo, los receptores de HER están constituidos por una región extracelular de aproximadamente 630 aminoácidos que presenta cuatro dominios denominados I/L1, II/CR1, III/L2 y IV/CR2, dispuestos como una repetición en tándem de una unidad de dos dominios, una sola región transmembrana y una región de tirosina quinasa citoplasmática intracelular responsable de la transducción de señales. Tras su homodimerización y/o heterodimerización inducida por ligandos del dominio extracelular (a excepción de HER2), los receptores HER experimentan un cambio conformacional que provoca la activación de la quinasa citoplasmática, la autofosforilación y el posterior inicio de transducción de señales a través de vías oncogénicas, como ser la PI3K/AKT/mTOR y las vías RAS/RAF/MEK/ERK (**Figura 9**) (Hanker et al., 2021). No obstante, en cuanto al miembro de la familia HER2, es el único receptor HER que en su conformación natural se asemeja a un estado activado por ligando y carece de un ligando de alta afinidad (Cho et al., 2003), por lo que puede formar heterodímeros con los otros tres miembros de la familia (siendo entre HER2 y HER3 el complejo de señalización más activo entre los dímeros de tirosina quinasa) o encontrar como homodímero en el caso de una concentración del receptor elevada (como en el cáncer).

La formación del heterodímero, tras la unión del ligando, produce la fosforilación y activación de las vías de señalización río abajo de la fosfatidil-inositol-3 quinasa (PI3K), y las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno Ras/Raf (MAPK) que, en consecuencia, mejoran la proliferación celular, la supervivencia y la inhibición de la apoptosis (**Figura 10**). Por otra parte, en condiciones normales, el nivel de expresión de HER2 permanece estable y cumple un papel fundamental en la señalización mitogénica. Sin embargo, cuando ocurre la sobreexpresión de HER2, se puede alterar el equilibrio dinámico en muchos procesos celulares, provocando un crecimiento tumoral incontrolable que conduce al desarrollo de cáncer de mama. Lo anterior, a causa de que la sobreexpresión del receptor puede hacer que el mismo esté disponible en exceso para formar heterocomplejos adicionales o debilitar la especificidad de sus compañeros de heterodimerización. De hecho, la heterodimerización acoplada a HER2 puede activar la proliferación y la supervivencia, y los heterodímeros que contienen HER2 pueden escapar de la internalización o degradación de dímeros HER2, por lo que todos estos procesos llevan a un aumento de la tumorigénesis y metástasis. Dado que HER2 se sobreexpresa específicamente en diversos tipos de cáncer, siendo en forma agresiva en el cáncer de mama, es necesario el desarrollo de diagnósticos y tratamientos para dicha situación (Alcalá-Corona, Espinal-Enríquez, de Anda-Jáuregui, & Hernández-Lemus, 2018; Biri-Kovács et al., 2020). Actualmente, las terapias basadas en anticuerpos e inhibidores de tirosina quinasa dirigidas a estos receptores se han utilizado ampliamente en el tratamiento clínico de diversas neoplasias malignas, siendo una de las terapias tumorales dirigidas más exitosas hasta la fecha (Bai et al., 2023).



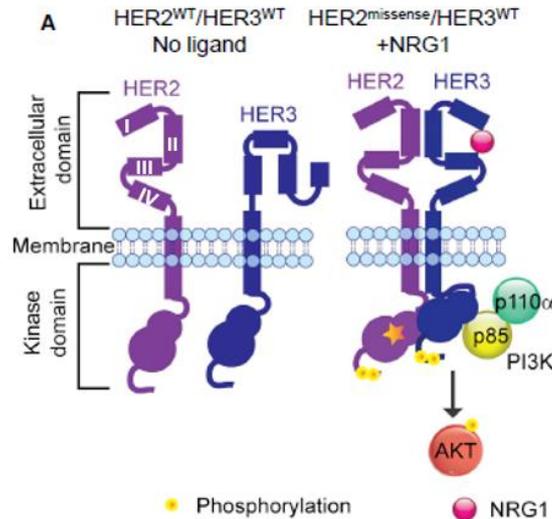


Figura 10. Representación esquemática de un receptor HER2 y HER3, en el que se puede observar los distintos dominios extracelulares (I, II, III, IV) y como en ausencia de ligando, HER3 está en conformación cerrada, no interaccionando con HER2, pero en presencia del ligando NRG1 y HER2 mutado, se promueve el cambio conformacional de HER3. Promoviendo la heterodimerización HER2/HER3 y por ende la fosforilación y activación de la vía de señalización PI3K. Extraído y modificado de (Hanker et al., 2021).

1.6 Diagnóstico

El gen *ErbB2* localizado en el Chr17q12, que codifica el receptor HER2, actúa como un oncogén y su amplificación genera la sobreexpresión de la proteína HER2. Esta sobreexpresión anormal induce una cascada de señalización que promueve la proliferación descontrolada de células tumorales, por lo que su sobreexpresión se encuentra asociada a un mal pronóstico, provocando incluso cáncer de mama metastásico (Swain, Shastry, & Hamilton, 2023).

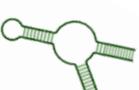
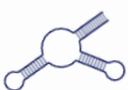
La manera más común de dar un diagnóstico se basa en la realización de una mamografía de detección (radiografía), sin embargo, las técnicas de diagnóstico molecular, como los métodos de análisis de la expresión de receptores hormonales y proteínas (ER, PR, HER2, HERmark™), métodos séricos (CellSearch®, prueba de traducción de biomarcadores) y métodos de perfilado de expresión génica (Mammaprint™, OncoVue®Prueba, ganglio linfático mamario GeneSearch™, aspiración de líquido del pezón, DiaGenic BCtect®, Oncotipo DX®, Theros H/ISM y MGISM), también se utilizan. En los últimos 30 años, gracias a dichas técnicas se ha reducido la tasa de mortalidad por cáncer de mama de 3,4 al 1,8% entre mujeres estadounidenses. A pesar de esto, la tasa de mortalidad actual es aún alta debida a un diagnóstico tardío, dado por el temor que presentan los pacientes al diagnóstico y tratamiento del cáncer por falta información, mala interpretación de la mamografía u otros, como ser equipos costosos (Gholikhani et al., 2022).

En particular, los métodos más comunes en el análisis del cáncer de mama invasivo subtipo HER2 son: la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), que cuantifica el número de copias del gen *ErbB2* y por lo tanto informa sobre el nivel de amplificación del mismo; y la inmunohistoquímica (IHC), que mide la expresión del receptor de HER2 en la superficie celular, mediante la tinción de la membrana (**Figura 7**) (Swain et al., 2023). Los ensayos de FISH que fueron aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) son PathVysion (Abbott), INFORM (Ventana Medical Systems) y PhrmDc (Dako). En estos, los ensayos con dos sondas aportan información sobre la proporción de HER2 al centrómero 17 (CEP17), el cual sirve como control, mientras que los ensayos con una sola sonda determinan directamente el número de copias del gen *ErbB2*. Sin embargo, dicho método puede dar lugar a falsos negativos en la amplificación y además es costoso, requiere tiempo y técnicamente es mucho más desafiante que IHC. Independientemente de esto, se considera como un ensayo preciso, produciendo rara vez resultados equívocos, en aproximadamente solo el 5% de los casos (Ballinger, Sanders, & Abramson, 2015; Tse et al., 2011; Yeh et al., 2009). Por otra parte, las pruebas de IHC que fueron aprobados por la FDA son HercepTes (Dako) y PATHway (Ventana Medical Systems). Dichas pruebas, utilizan la tinción por IHC del receptor HER2 y posteriormente un patólogo clasifica la extensión como 0, 1+, 2+ o 3+. No obstante, la fiabilidad de dicha metodología está influenciada por variables preanalíticas, incluyendo la manipulación, fijación y tinción, así como la interpretabilidad por parte del patólogo. Por lo que generalmente si se producen resultados equívocos, se confirman mediante FISH (Fritzsche et al., 2006; Press et al., 2005; Schnitt & Jacobs, 2001; Siddiqui & Rimm, 2010).

1.7 Tratamiento

Un agente terapéutico se caracteriza por la destrucción de células tumorales con una influencia mínima sobre las células normales (Liu et al., 2012). Las estrategias de tratamiento actuales para los diferentes subtipos de cáncer de mama son seleccionadas de acuerdo al subtipo molecular que presente el paciente (**Figura 8**). Dicho tratamiento, a su vez, depende en gran medida del estadio del cáncer en el momento del diagnóstico; en las primeras etapas se tratan con cirugía, seguida de quimioterapia leve o radioterapia, y en el caso de la etapa tardía, con mastectomía en la que dichos tejidos mamarios se extirpan por completo, acompañado de quimioterapia intensiva y radioterapia (Gholikhani et al., 2022).

Dado que HER2 se expresa a niveles relativamente bajos en tejidos normales, en las últimas décadas se desarrollaron varias estrategias para atacar la sobreexpresión de dicho receptor (**Figura 11**).



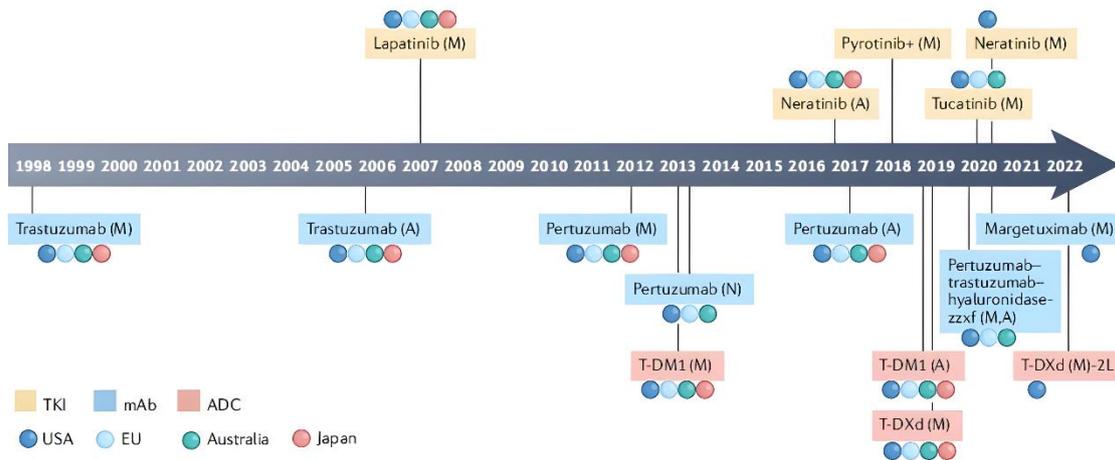


Figura 11. Cronología de tratamientos terapéuticos anti-HER2 por parte de la FDA. Extraído de (Swain et al., 2023).

El uso de anticuerpos monoclonales humanizados (Trastuzumab, Pertuzumab y otros), inhibidores de tirosina quinasa (TIK) y conjugados de anticuerpo-fármaco (T-DM1 y otros) han contribuido a mejorar la supervivencia en pacientes HER2+ (Biri-Kovács et al., 2020; Gholikhani et al., 2022; Vanderhoeven et al., 2018). El primer anticuerpo monoclonal humanizado utilizado como terapia contra el cáncer de mama HER2+ y aprobado por la FDA fue Trastuzumab. El mismo, se une al dominio extracelular, en el subdominio IV del receptor HER2, suprimiendo las vías de señalización, inhibiendo la detención del ciclo celular y funcionando también como mediador de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) (Biri-Kovács et al., 2020; Swain et al., 2023). Sin embargo, a pesar del éxito del mismo, entre el 40-60% de pacientes no responden a dicho tratamiento, desarrollan resistencia o incluso presentan toxicidad cardíaca (Nahta & Esteva, 2006; Vanderhoeven et al., 2018). Además, dicha eficacia en parte depende del mecanismo de ADCC, mediado a través del dominio Fc del anticuerpo, y su unión al receptor expresado en células inmunes innatas (principalmente, células Natural Killer). Debido a esto, se desarrolló un segundo anticuerpo monoclonal humanizado, llamado Pertuzumab (Musolino et al., 2008; Nordstrom et al., 2011). Pertuzumab, se une al subdominio II del receptor HER2, provocando que se inhiba la heterodimerización con HER1, HER3 y HER4, bloqueando la vía de señalización corriente abajo (**Figura 12**) (Ishii, Morii, & Yamashiro, 2019).

Los mecanismos de ambos y su efecto en la actividad antitumoral mediada por el sistema inmunitario a través de ADCC y citotoxicidad mediada por complemento (CDC), sugirió que la terapia de combinación podría ser sinérgica (Mamidi, Cinci, Hasmann, Fehring, & Kirschfink, 2013; Nahta, Hung, & Esteva, 2004; Scheuer et al., 2009). Se verificó, que su combinación con quimioterapia para tratar el cáncer de mama HER2+ en entornos metastásicos, adyuvantes y neoadyuvantes, mostró mejores resultados que la combinación sola de Trastuzumab con quimioterapia, lo que terminó llevando

a la aprobación de Pertuzumab por parte de la FDA en combinación con Trastuzumab (Swain et al., 2023).

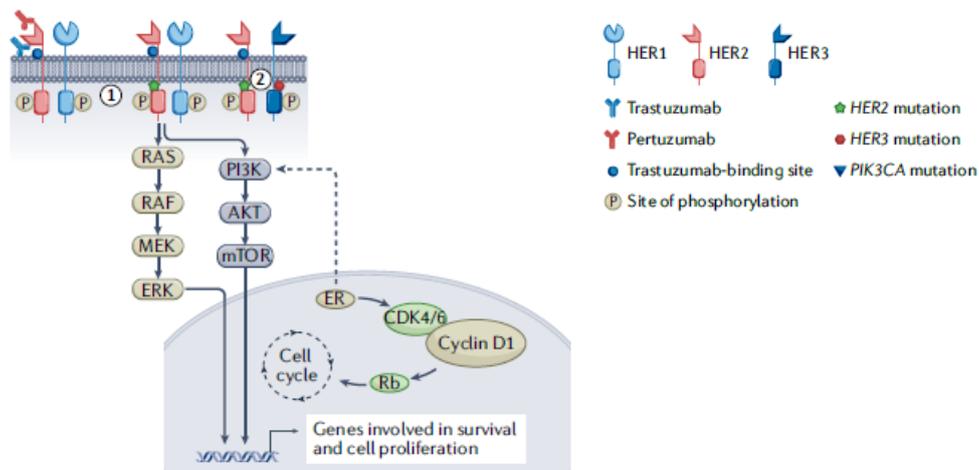
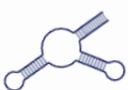


Figura 12. Cascada de señalización en la que se observa que cuando los anticuerpos Trastuzumab y Pertuzumab se unen a sus respectivos subdominios del receptor HER2, se bloquea la vía de señalización. (1) Mutaciones en HER2 que conducen a la activación de las vías PI3K-AKT y RAS-MAPK. (2) Mutaciones coexistentes en HER2 y HER3 que conduce a la activación de la vía PI3K-AKT. Modificado y extraído de (Swain et al., 2023).

Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC, del inglés *antibody-drug conjugate*) como su nombre lo indica están formados por la unión de un anticuerpo y un fármaco con el objetivo de desencadenar un efecto citotóxico en las células tumorales específicas, una vez que el anticuerpo se une a la célula. Recientemente, el conjugado Ado-Trastuzumab-Emtansina (TMD-1) fue aprobado para la terapia del cáncer de mama subtipo HER2+, por el Fondo Nacional de Recursos (FNR) (Biri-Kovács et al., 2020; Swain et al., 2023).

Actualmente las tasas de supervivencia superan el 90% en cáncer de mama HER2+ temprano, si se trata con quimioterapia, terapia con doble anticuerpo o conjugados anticuerpo-fármaco. Sin embargo, pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico, desarrollan resistencia, lo que conduce a la progresión de la enfermedad, muriendo una gran cantidad de pacientes. Este hecho exige nuevos enfoques terapéuticos para tratar el cáncer de mama, siendo los aptámeros, candidatos con un gran potencial (Biri-Kovács et al., 2020; Gholikhani et al., 2022; Swain et al., 2023).



2. Aptámeros

El término aptámero deriva de la palabra latina “aptus”, que significa “encastre”, y la palabra griega “meros”, que significa “partícula”. Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN cortos, estructurados, y descritos por primera vez a principios de la década de 1990. Dichos aptámeros, son generados *in vitro* por un proceso denominado “Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment” (SELEX) para unirse a objetivos específicos (Ellington & Szostak, 1990; Tuerk & Gold, 1990). Bajo ciertas condiciones (pH, temperatura, fuerza iónica, y otras), los aptámeros suelen formar estructuras definidas debido a su predisposición a formar enlaces intramoleculares. Pueden plegarse en varias estructuras secundarias (horquillas, tallos, bucles, pseudonudos, G-quadruplex y kissing hairpin), las cuales pueden actuar en conjunto, formando estructuras tridimensionales (3D) (Zhou & Rossi, 2017) que son estabilizadas mediante interacciones de tipo no covalente (hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, cargas electrostáticas y apilamiento de anillos aromáticos) (Gholikhani et al., 2022). Esto último, les confiere a los aptámeros la capacidad de unirse específicamente a diversas moléculas (pequeñas moléculas, iones, hormonas, células, proteínas de la superficie celular, bacterias, virus), presentando una unión específica aptámero-blanco que da como resultado, altas afinidades en el entorno de μM - pM de K_D . (Figura 13) (Roxo, Kotkowiak, & Pasternak, 2019; Yeoh, Anna, Tang, & Citartan, 2022).

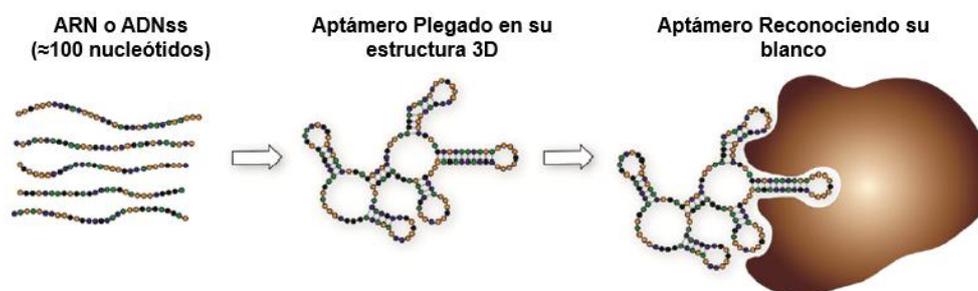


Figura 13. Representación esquemática de una interacción aptámero-objetivo. Extraído y modificado de (Darmostuk, Rimpelova, Gbelcova, & Ruml, 2015).

La complejidad de estructuras les confiere una afinidad y especificidad de unión comparables a los anticuerpos, puesto que son capaces de distinguir entre moléculas estrechamente relacionadas, como isómeros conformacionales, blancos que contienen diferentes grupos funcionales o incluso una mutación de aminoácido. Asimismo, pueden discriminar entre enantiómeros o proteínas que se diferencian en algunos aminoácidos (Sola et al., 2020), por lo que también se denominan “anticuerpos químicos” (Yeoh et al., 2022; Zhou & Rossi, 2017). Son llamados “anticuerpos químicos” o los “rivales de los anticuerpos” (Jayasena, 1999), debido a que son funcionalmente similares, pero difieren en su naturaleza química. No obstante, presentan varias ventajas sobre los anticuerpos, convirtiéndolos en una clase prometedora de elementos de reconocimiento molecular a la par de los anticuerpos dado al



menor costo de producción debido a que se producen mediante síntesis química, tienen menor capacidad de sufrir desnaturalización y renaturalización reversible sin pérdida de la capacidad de unión al blanco, presentan baja inmunogenicidad y alta facilidad de modificarlos químicamente. También presentan una alta estabilidad a pH y temperatura extremas, y rápida penetración en los tejidos debido a su pequeño tamaño (**Figura 14**) (Li et al., 2021; Yeoh et al., 2022).

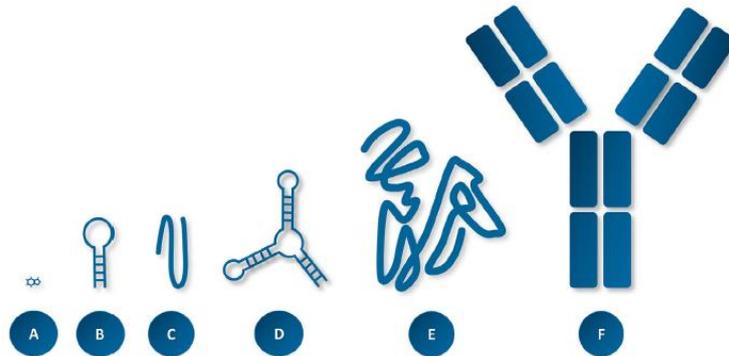
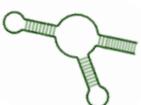
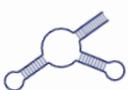


Figura 14. Comparación de diferentes moléculas según su tamaño. A) Cafeína, 0.2 kDa; B) 50mer Oligonucleótido, 16 kDa; C) Insulina humana, 6 kDa; D) 100mer Oligonucleótido, 32 kDa; E) albúmina sérica humana, 66 kDa; F) Anticuerpo IgG-1 de 150 kDa. Extraído de (Kohlberger & Gadermaier, 2022).

2.1 Aplicaciones de aptámeros

Los aptámeros pueden ser modificados con facilidad después de su desarrollo mediante hibridación y conjugación a una variedad de nanopartículas y nanopolímeros, que los hacen ideales para aplicaciones que incluyen diagnóstico molecular y la identificación de dianas biológicas. Asimismo, la modificación de aptámeros con quantum dots, nanopartículas de silicio, carbono y nanomateriales de oro también se pueden utilizar para la detección de células tumorales, imagenología molecular y administración de fármacos (Gholikhani et al., 2022; Sola et al., 2020). Por lo tanto, aptámeros con pesos moleculares pequeños de aproximadamente 20 kDa, debido a la facilidad que tienen de penetrar en los tejidos tumorales y de reconocer específicamente su blanco, permite la utilidad de los mismos como un sistema de entrega de fármacos para el tratamiento de cáncer, ya que pueden servir como ligandos de direccionamiento al sitio del tumor y aumentar la concentración efectiva del fármaco, mientras se minimizan los efectos secundarios en los tejidos normales (Gholikhani et al., 2022; H. Wang et al., 2018). Debido a que no presentan inmunogenicidad, los aptámeros se convirtieron en herramientas atractivas para varias aplicaciones en biomedicina, desarrolladas originalmente para anticuerpos, permitiendo la entrega de fármacos tales como pequeños ARN de interferencia (siRNAs), péptidos, moléculas de síntesis, micro ARNs (miRNAs) (Darmostuk et al., 2015). Sin embargo, el uso de aptámeros para la aplicación terapéutica está limitada por la rápida degradación de las nucleasas y el rápido metabolismo de los aptámeros en condiciones fisiológicas. En efecto, para disminuir dicha



degradación, e incrementar el tiempo de vida media en plasma, se requiere que dichos aptámeros sean modificados químicamente. Estas modificaciones químicas pueden ocurrir por sustituciones y remplazo de enlaces fosfodiéster con 2-F, 2-NH₂, 2-OMe o anillos de azúcar, por ciclación de ácidos nucleicos mediante la unión de los extremos 5' y 3', por incorporación de nucleótidos no naturales en la cadena de oligonucleótidos, o por modificaciones de dialkyl lipid/PEG/colesterol en el extremo 5' terminal, inhibiendo la digestión de aptámeros por las nucleasas (Gholikhani et al., 2022).

Además de las aplicaciones terapéuticas, los aptámeros se pueden utilizar en muchas otras aplicaciones u otros fines (**Figura 15**), como ser la imagenología molecular (Calzada, 2020; Calzada et al., 2013; Sicco et al., 2021), detección de infecciones virales y bacterianas agudas, detección de proteínas en ensayos tipo Western Blot, biosensores, etc (Bayat et al., 2018; Darmostuk et al., 2015).

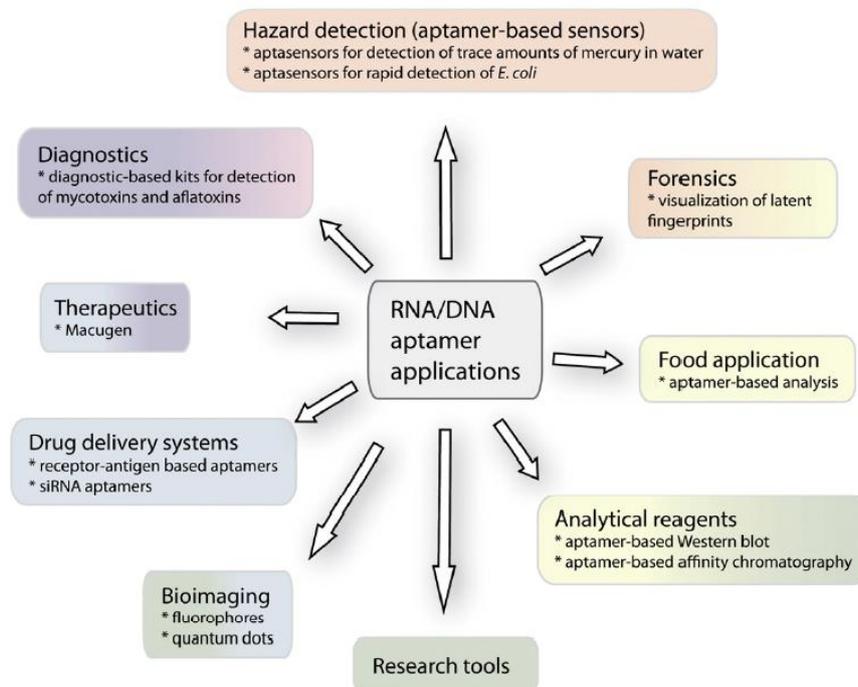


Figura 15. Diferentes campos de aplicación de los aptámeros. Extraído de (Darmostuk et al., 2015).

2.2 Aptámeros con estructuras secundarias G-quadruplex

Algunos aptámeros ricos en G pertenecen a un gran subgrupo con la capacidad de plegarse en estructuras denominadas G-quadruplex. Dichas estructuras de ácido nucleico no canónicas están formadas por la interacción de por lo menos cuatro nucleótidos de guanina que se acoplan en una disposición plana mediante enlaces de hidrógeno de Hoogsteen, estabilizados por un catión en el centro (generalmente potasio, pero también pueden integrar otros iones como magnesio, calcio u otros según su radio atómico). La estabilidad de dicha estructura es muy importante, ya que mejora las interacciones electrostáticas con los ligandos de unión cargados positivamente (dado que tienen el doble de densidad de carga negativa por unidad de longitud en comparación con el ADN dúplex), así como las interacciones hidrofóbicas de dicho ligando. Asimismo, su estructura es muy polimórfica (**Figura 16**), puesto que puede estar formada por una, dos o cuatro cadenas separadas de ADN o ARN, en las que la dirección de dichas hebras puede presentar varias combinaciones y la disposición de los G-quadruplex puede ser paralela, antiparalela o híbrida. En comparación con las secuencias no estructuradas, son termodinámica y químicamente estables en condiciones fisiológicas, no muestra inmunogenicidad y son resistentes a numerosas nucleasas séricas, por lo que su alto grado de polimorfismo permite reconocer diferentes objetivos, siendo capaces de reconocer moléculas pequeñas excepcionalmente bien (Kohlberger & Gadermaier, 2022; Roxo et al., 2019). Es por ello, que los mismos han sido utilizados en los últimos años, para el desarrollo de una serie de aptámeros ricos en G, que funcionen como anticoagulantes, agentes terapéuticos para la terapia del cáncer u otras enfermedades, así como nanodispositivos y aptasensores (Kohlberger & Gadermaier, 2022).

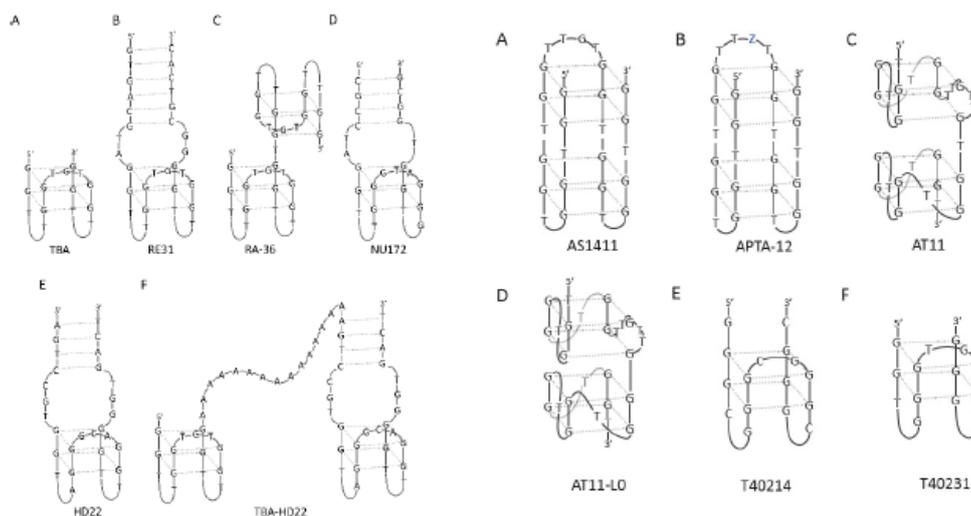
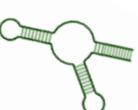
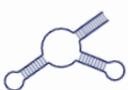


Figura 16. Modelos de aptámeros G-quadruplex. Se muestran las distintas estructuras que pueden adoptar. Extraído y modificado de (Roxo et al., 2019).



3. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX)

En el año 1990, varios grupos aislaron las primeras secuencias de ARN. Entre ellos, Tuerk y Gold enriquecieron dos ligandos de ARN de alta afinidad para la polimerasa de ADN T4 a partir de una biblioteca que contenía regiones aleatorias de 8 nucleótidos mediante un procedimiento *in vitro* en el que las secuencias de ARN candidatas se sometieron a sucesivas rondas de selección con el objetivo de aumentar su afinidad y obtener una biblioteca enriquecida (Tuerk & Gold, 1990). Por otra parte, Ellington y Szostak demostraron la utilidad de este procedimiento utilizando 10 secuencias diferentes, identificando con éxito moléculas de ARN capaces de unirse específicamente a pequeños colorantes orgánicos, siendo Ellington el que definió el término “aptámero” (Ellington & Szostak, 1990).

El proceso de selección de un aptámero se denominó “Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment” (SELEX), el cual es un procedimiento iterativo en el que una biblioteca de oligonucleótidos de aptámeros generada aleatoriamente, se expone al objetivo deseado en varios ciclos repetitivos bajo ciertas condiciones de manera de eliminar los aptámeros no específicos y de baja afinidad y quedarse con los aptámeros de mayor afinidad y especificidad por el blanco. Cada ronda de SELEX (**Figura 17**) generalmente consta de cuatro pasos (incubación, unión, partición y amplificación) y dicho producto final es sensible al entorno de selección (dado por una combinación de condiciones experimentales y propiedades inherentes al objetivo), por lo que es importante ajustar el proceso de selección de aptámeros a las condiciones en las que se desea que funcione el aptámero final.

Cómo los aptámeros interactúan con afinidades de unión similares a los anticuerpos, casi todos los aptámeros seleccionados a través de esta técnica, muestran una alta afinidad hacia los objetivos blanco con una constante de disociación (k_D) en rango μM - nM (Darmostuk et al., 2015; Sola et al., 2020; Zhou & Rossi, 2017). Sin embargo, en comparación con la producción de anticuerpos *in vivo*, la tasa de éxito de SELEX suele ser generalmente más baja, debido a que los aptámeros son más pequeños y menos complejos estructuralmente que los anticuerpos. A pesar de esto, mediante el uso de técnicas de SELEX especializadas, así como el desarrollo de bibliotecas de oligonucleótidos optimizadas e introducción de procedimientos de control de calidad, dicha probabilidad de éxito, estimada por debajo del 30%, puede aumentarse significativamente (Kohlberger & Gadermaier, 2022).



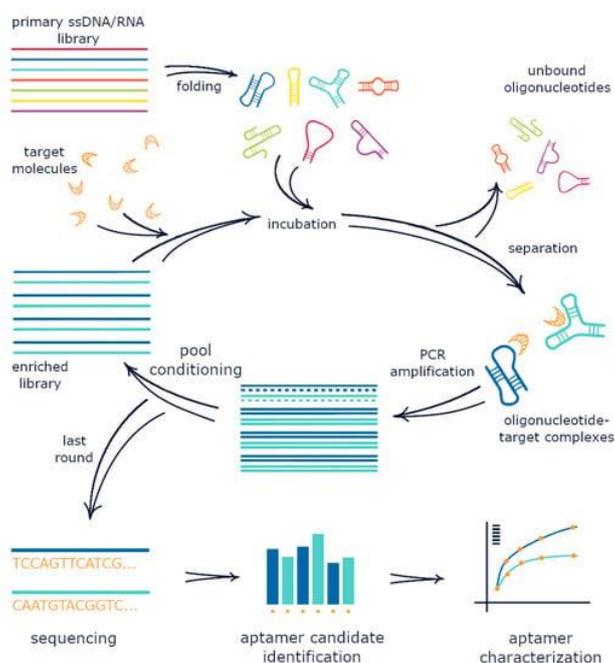
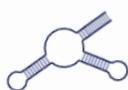


Figura 17. Resumen esquemático del procedimiento de selección de aptámeros por SELEX. Extraído de (Komarova & Kuznetsov, 2019).

En la actualidad, hay diferentes tipos de SELEX y cada uno es aplicado de acuerdo a las propiedades que presente la molécula objetivo específico, por lo que la estrategia de SELEX elegida va a depender de la molécula blanco (compuestos orgánicos e inorgánicos, péptidos, proteínas, células bacterianas o de mamíferos), del tipo de plataforma utilizada a la que se dirige el aptámero a implementar (electroquímica, fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, amplificación, etc) y de la matriz o ambiente en el que se vaya a utilizar dicho aptámero (sangre, saliva, orina, leche materna, buffers, etc) (Gholikhani et al., 2022). Asimismo, siempre que los aptámeros obtenidos sean más grandes que su molécula blanco, tenderán a integrarlo en su estructura, pero si la misma es más grande, el aptámero se integrará en la estructura del blanco, adhiriéndose a la superficie. Esto último posibilita que hasta la fecha se desarrollen miles de aptámeros contra una amplia variedad de objetivos blanco (Kohlberger & Gadermaier, 2022).

3.1 SELEX convencional

En este método de selección de aptámeros se parte de una biblioteca combinatoria de oligonucleótidos de ADN o ARN sintetizados químicamente. Dichos oligonucleótidos contienen una región aleatoria entre 20 a 80 nucleótidos de longitud que están flanqueados por regiones constantes cortas de 15 a 25 nucleótidos en el extremo 5' y 3', utilizadas generalmente para la hibridación con cebadores específicos durante el paso de amplificación.



SELEX consiste en múltiples iteraciones (**Figura 18**). En un principio, la biblioteca inicial consta teóricamente de hasta 10^{15} secuencias únicas (en 1-2 nmol de biblioteca) por lo que pueden proporcionar la suficiente diversidad estructural como para identificar la molécula blanco con alta afinidad (Zhou & Rossi, 2017). Posteriormente, dicha biblioteca se incuba con la molécula blanco y durante la misma algunas secuencias se unen, mientras que otras lo hacen débilmente o directamente no interactúan con el blanco. Ulteriormente, ocurre la partición, en la cual las secuencias unidas se aíslan de aquellas que interactúan débilmente o no con la molécula blanco, para luego ser extraídas y amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el caso de secuencias de ADN o por PCR de transcripción inversa (RT-PCR) en el caso de secuencias de ARN, con el objetivo de ser utilizadas en las siguientes rondas de selección. Si la selección se realiza con aptámeros de ARN, primero se parte de una biblioteca ADNss y se convierte en una biblioteca ADNds mediante PCR. Luego dicha biblioteca se transcribe en secuencias ARN por medio de una ARN polimerasa (por ejemplo, ARN polimerasa T7) de manera de obtener una biblioteca de ARN e iniciar el proceso de SELEX. En general, se opta por los aptámeros de ADN debido a su estabilidad y costos de fabricación más bajos, sin embargo, los aptámeros de ARN suelen tener conformaciones tridimensionales mucho más variadas e interacciones intercatenarias más fuertes, lo que probablemente aumenta la especificidad y afinidad de unión. Después de varios ciclos iterativos, las secuencias específicas de oligonucleótidos de aptámero obtenidos se enriquecen y se secuencian. Posteriormente, su afinidad por la molécula blanco se determina mediante varios métodos. Dicha identificación y caracterización adicional de las secuencias candidatas, permite su aplicación para diagnóstico, terapia dirigida, entre otras (Bayat et al., 2018; Darmostuk, 2015; H. Wang et al., 2018).

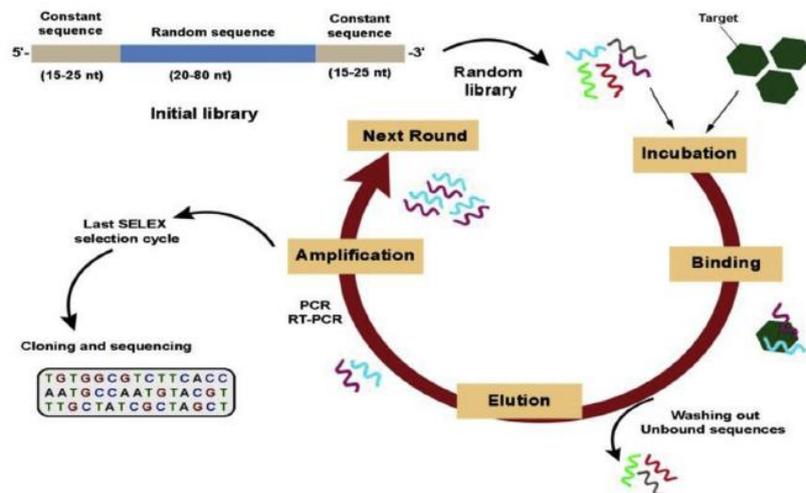
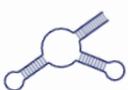


Figura 18. Representación esquemática de los distintos pasos presentes en un SELEX convencional. Extraído de (Bayat et al., 2018).

Si bien el SELEX convencional es un método eficaz, se suelen realizar hasta 20 rondas de selección para enriquecer los aptámeros con alta afinidad por el objetivo. Gracias a la incorporación de secuenciación de alto rendimiento (HTS), dicho proceso puede ser acelerado a unas pocas semanas al reducir la cantidad de ciclos, ya que HTS otorga millones de lecturas por muestra permitiendo la identificación de especies de aptámeros enriquecidas en las primeras rondas de selección. La utilización de dicha herramienta permite, no solo monitorear el enriquecimiento de las secuencias a medida que transcurren las rondas, sino también reducir el número de las mismas, el sesgo asociado con la PCR, así como la identificación de grupos de aptámeros y motivos conservados que podrían estar involucrados o ser necesarios para la unión a la molécula blanco. No obstante, como en dicha metodología los aptámeros son obtenidos en condiciones *in vitro*, estos pueden tener inconvenientes en reconocer a dicha blanco en condiciones *in vivo*. Por ende, se han establecido métodos alternativos para la selección de aptámeros con el objetivo de disminuir el tiempo de selección y mejorar las tasas de acierto de los ligandos obtenidos contra las moléculas blanco (Roxo et al., 2019; Sola et al., 2020), como ser, Cell-SELEX, Tissue-SELEX, *In vivo*-SELEX, entre otros.

3.2 Cell-SELEX

El método de SELEX descrito anteriormente consiste en la realización de un SELEX *in vitro* contra una molécula blanco (generalmente proteínas) previamente caracterizada y purificada, cuya conformación es estable en dichas condiciones. Sin embargo, cuando las moléculas blanco están presentes en un estado modificado (por ejemplo, proteínas recombinantes con tags) o su dominio de unión está enmascarado en condiciones fisiológicas, los métodos de SELEX convencionales, presentan la dificultad de no ser capaces de reconocer la estructura natural del ligando blanco en condiciones *in vivo*. Por otra parte, con el apogeo de aplicar aptámeros en el campo médico, los blancos complejos se vuelven más atractivos y debido a la complejidad estructural de las células u organismos vivos, es necesario recurrir a métodos alternativos que superen las desventajas del SELEX anteriormente mencionado. Los aptámeros sintetizados que son capaces de reconocer elementos blanco de dichas células, pueden generarse utilizando un proceso denominado Cell-SELEX (Bayat et al., 2018; Kohlberger & Gadermaier, 2022), que a diferencia del SELEX convencional, permite la utilización de células enteras eucariotas o procariotas, células que expresan una proteína blanco preidentificada o un tipo de célula particular sin conocimiento previo de proteínas marcadoras de superficie celular, por lo que dicha metodología es utilizada cuando se quiere obtener aptámeros altamente específicos contra un componente de la superficie de la célula (como proteínas de membrana, lípidos, polisacáridos y receptores) o contra la célula completa (para la detección de componentes bacterianos o virales) (Darmostuk et al., 2015; Gholikhani et al., 2022).



Cell-SELEX se divide en pasos similares al SELEX convencional (**Figura 19**), pero en dicha metodología, se utilizan células como blanco para la selección. Estas células blanco se incuban con la biblioteca de oligonucleótidos inicial durante un tiempo determinado, a una temperatura específica dada. Posteriormente, aquellos aptámeros no unidos se eliminan por lavado y los unidos se eluyen para finalmente ser amplificados mediante PCR, y así ser utilizados para la siguiente ronda de selección. No obstante, para aumentar la especificidad y afinidad de los aptámeros, es esencial incluir un paso de contraselección para eliminar aquellos aptámeros que se unen de manera no específica a los componentes celulares debido a que los aptámeros tienen una propensión a unirse a todos los componentes celulares de manera no específica, pudiendo llevar a impedir el enriquecimiento efectivo de secuencias que reconocen al componente blanco. Para la contraselección es necesario utilizar una línea celular parental o similar desde el punto de vista oncogénico, morfológico y fenotípico, pero que no exprese el blanco o en su defecto en el caso de selección frente a un tipo de tumor (Bayat et al., 2018; Darmostuk et al., 2015; Sola et al., 2020; Zhou & Rossi, 2017).

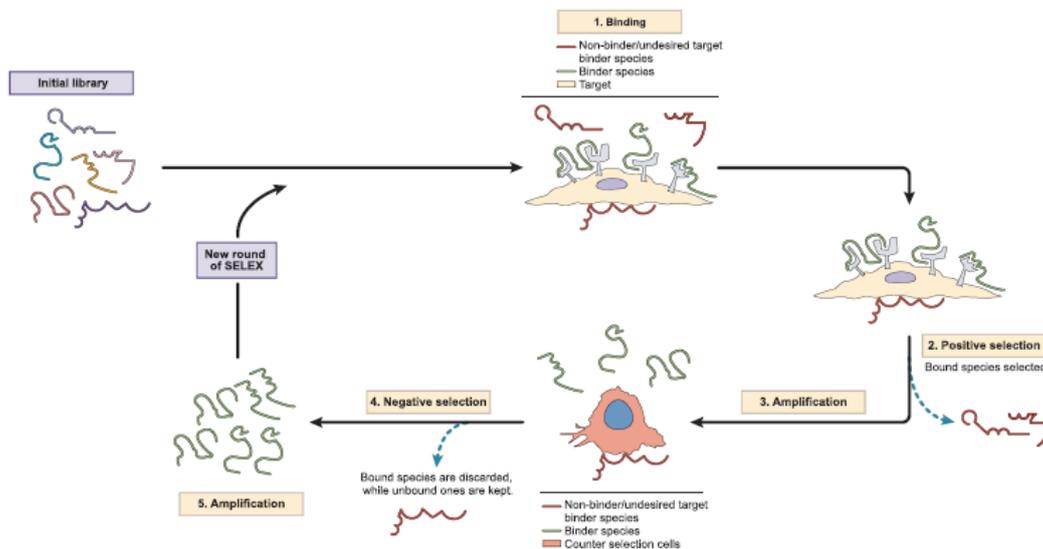


Figura 19. Representación esquemática de los distintos pasos presentes en un Cell-SELEX. Extraído de (Zhou & Rossi, 2017).

Existen diferentes enfoques para producir células negativas (no expresan la proteína blanco) o células positivas (sobrexpresan la proteína blanco), uno de ellos es la utilización de fragmentos del gen gBlocks para sintetizar ADNc que incluya la secuencia blanco de interés y así obtener células positivas. En caso contrario, el uso de la tecnología CRISPR/Cas 9 puede ser aplicado en células positivas para eliminar el gen que sobreexpresa la proteína blanco y de esta manera adquirir células negativas que se puedan utilizar en la contraselección. En la contraselección, las células negativas se incuban con los aptámeros y aquellas secuencias que no se unen se amplifican mediante PCR, si la contraselección es eficaz, los aptámeros generados serán capaces de diferenciar entre células negativas y positivas, dirigir



fármacos a las células blanco o incluso identificar bacterias patógenas a nivel de especie (Kohlberger & Gadermaier, 2022; Zhou & Rossi, 2017).

Ligand-Guided Cell-SELEX (LGCS)

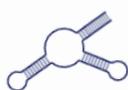
Es una variante de Cell-SELEX que guía la selección de aptámeros hacia una blanco específico presente en la superficie celular (como ser un receptor) utilizando para ello ligandos que sean afines contra dicha molécula como guía, por ejemplo, los anticuerpos. En dicha variante, primero se incuba la biblioteca de oligos con las células blanco que expresan el receptor elegido y luego se agrega el anticuerpo a la molécula blanco para desplazar selectivamente aquellos aptámeros que se encontraban unidos al mismo epítipo. Posteriormente, los aptámeros desplazados se amplifican por PCR para ser utilizados en las siguientes rondas de selección.

Dicha metodología es útil, si se quiere identificar aptámeros contra epítipos específicos que sean compartidos por un anticuerpo, el desafío está en que la afinidad del aptámero sea similar o superior a la del anticuerpo (Sola et al., 2020).

3.3 Tissue-SELEX

Si bien el método de Cell-SELEX descrito anteriormente sirve para obtener aptámeros específicos contra componentes celulares, requiere de mucho tiempo de dedicación y tanto la afinidad, así como la especificidad de unión al final dependerá en parte de cómo se realizó el proceso de selección. Dado que luego de dicho proceso, se ha visto que algunos de los aptámeros seleccionados por Cell-SELEX fallaron en estudios *in vivo* y puesto que las células cancerosas cultivadas no reflejan la aparición y el desarrollo real de tumores *in vivo* (dificultando que los aptámeros funcionen en tejidos patológicos y limitando su aplicación en el diagnóstico clínico), fue necesario del desarrollo de una nueva variante denominada Tissue-SELEX, como alternativa complementaria.

En Tissue-SELEX la estrategia de obtención de aptámeros (**Figura 20**) es la misma que en Cell-SELEX pero en vez de utilizar células, utiliza tejidos completos como objetivo para la unión de aptámeros dado que dichos tejidos están constituidos por diferentes tipos de células, presentando una complejidad, heterogeneidad y estructura morfológica que favorece la selección de aptámeros para su utilización en condiciones *in vivo* (Li et al., 2021; Sola et al., 2020).



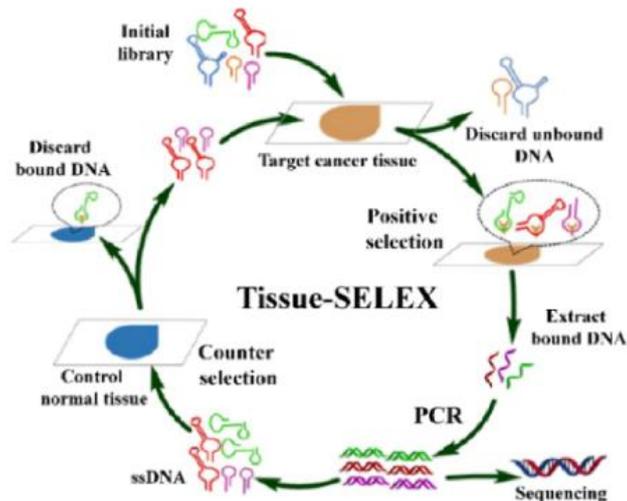
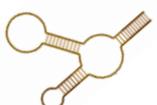


Figura 20. Representación esquemática de los distintos pasos que se realizan en un Tissue-SELEX (Li et al., 2021).

3.4 *In Vivo*-SELEX

Dado que los aptámeros seleccionados mediante metodologías SELEX *in vitro* no necesariamente pueden funcionar en condiciones *in vivo*, fue necesario el desarrollo de una metodología de SELEX alternativa denominada *In Vivo*-SELEX, basada en la utilización de animales o plantas vivas para la generación de aptámeros específicos dirigidos a un órgano, tejido o una afección objetivo, permitiendo que circulen por todo el organismo (Darmostuk et al., 2015; Zhou & Rossi, 2017).

El proceso general de selección es muy similar al SELEX convencional (**Figura 21**), donde se comienza con una biblioteca aleatoria de oligonucleótidos de ADN o ARN modificados con fluoropirimidina que se inyecta por vía intravenosa, por ejemplo, en el caso de un modelo animal de laboratorio como el ratón para que dichos oligonucleótidos puedan circular y distribuirse por todo el cuerpo, quedando aptámeros unidos a los tejidos órgano, blanco y aptámeros no unidos que se eliminan por el riñón. Posteriormente, se realiza la eutanasia del animal, se extrae el órgano o tejido de interés junto con los aptámeros de ADN o ARN unidos y la biblioteca se purifica. Luego, dichos aptámeros aislados, son amplificados mediante PCR, utilizando primers específicos que reconocen las regiones constantes flanqueadas presentes en la biblioteca inicial, al igual que en el SELEX convencional. Finalmente, el grupo de aptámeros adquiridos en la ronda anterior, se vuelve a inyectar en el mismo organismo para repetir el procedimiento durante varias rondas, de manera de que en cada ronda se obtenga un enriquecimiento de aptámeros de mayor afinidad al tejido u órgano de interés. Asimismo, es posible incorporar un paso de contraselección en el que los aptámeros con afinidad por tejidos u órganos en condiciones normales son eliminados en las sucesivas rondas.



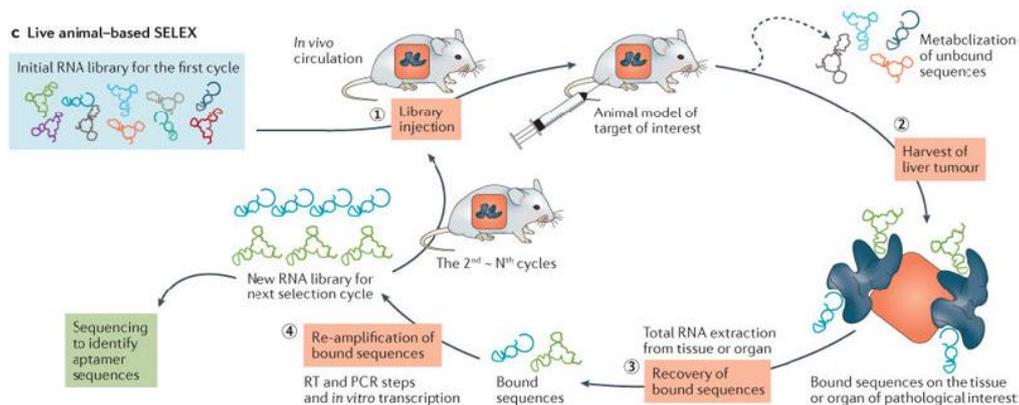
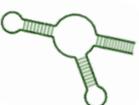
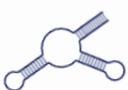


Figura 21. Representación esquemática de los sucesivos pasos que se realizan en *In Vivo*-SELEX. Extraído de (Zhou & Rossi, 2017).

A diferencia de las otras metodologías, esta técnica de SELEX abarca las propiedades presentes en los aptámeros, como ser la biodisponibilidad, el tiempo de circulación y la distribución tisular, por lo que reduce la necesidad de una optimización farmacológica posterior a la selección (Bayat et al., 2018). Sin embargo, una de las principales limitaciones del *In Vivo*-SELEX es que los ácidos nucleicos son susceptibles a la degradación enzimática por nucleasas, y si bien una modificación de la biblioteca de ARN con fluoropirimidina antes de comenzar dicho proceso de selección aumenta significativamente la resistencia a nucleasas, mejorando la vida media cuando se administra en el torrente sanguíneo, podría haber aptámeros que presenten un mayor contenido de fluoropirimidina o con una estructura que le confiera mayor resistencia a las nucleasas, provocando un sesgo en la selección (Gholikhani et al., 2022; Sola et al., 2020).

Desde su primera aplicación, la metodología SELEX ha sufrido diversos cambios y mejoras, gracias a esto, hoy en día la selección de aptámeros lleva horas en lugar de la cantidad de semanas que requiere un SELEX convencional. Mas aún, los enfoques novedosos respaldados con análisis computacionales no solo permiten dilucidar la estructura del aptámero, sino también la afinidad de unión incluso antes de que dicho aptámero se seleccione, lo que hace que el proceso sea más rentable. A su vez, las diferentes modificaciones químicas post-SELEX aumentan la estabilidad *in-vivo* de los aptámeros. Por ende, lo anteriormente mencionado permite que se abra a futuro un nuevo abanico de oportunidades para la aplicación de aptámeros (**Figura 15**) (Darmostuk et al., 2015).



3.5 Astringencia

Son dos las características principales que destacan de los aptámeros: la afinidad y la especificidad. Un aptámero, conformacionalmente flexible, presenta una unión con muchos blancos no deseados que tienen motivos similares al de la molécula blanco, por lo que es importante comprender las interacciones entre un aptámero y la molécula blanco. La afinidad es la fuerza de interacción que puede existir entre un aptámero y el blanco, determinada por la constante de asociación (k_a), que es inversamente proporcional a la constante de disociación (k_D). Dicha constante de disociación depende de las cinéticas de unión k_{on} u *on-rate* (tasa de asociación del aptámero a la molécula blanco) y desunión k_{off} u *off-rate* (tasa de disociación del aptámero unido a la molécula blanco). Por lo tanto, aquellos nucleótidos que presenten un *off-rate* o k_D baja presentarán fuertes interacciones con la molécula blanco, pudiendo unirse incluso cuando la concentración del blanco es pequeña. Por otra parte, la especificidad implica que el aptámero reconozca y se una solo al blanco deseado, no interaccionando de forma cruzada con ninguna molécula no blanco presente en la muestra (Kalra, Dhiman, Cho, Bruno, & Sharma, 2018; Komarova & Kuznetsov, 2019). Dado estos parámetros, la concentración de la molécula blanco (que depende de la concentración de aptámeros, la constante de disociación, la eficiencia de partición en la selección y el número de ciclos de PCR en el paso de amplificación durante la unión del aptámero al mismo) es crítica para el proceso de selección. Con una concentración de la molécula blanco más baja, aumenta la probabilidad de aislar aptámeros con alta afinidad, mientras que, con una concentración del blanco más alta, mayor es la probabilidad de aislar ligandos con menor afinidad (**Figura 22**) (Komarova & Kuznetsov, 2019; J. Wang, Rudzinski, Gong, Soh, & Atzberger, 2012).

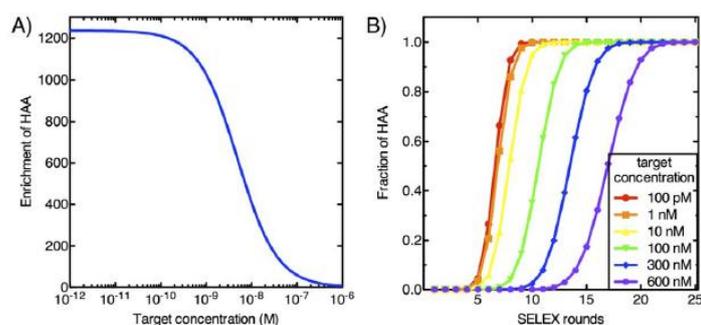


Figura 22. Influencia de la concentración del blanco en la eficiencia de selección. Extraído de (J. Wang, Rudzinski, Gong, Soh, & Atzberger, 2012).

Sin embargo, esto no es del todo realista, ya que solo ocurre cuando se ignoran los efectos contaminantes de los aptámeros de fondo unidos de forma no específica, y prácticamente todos los métodos de selección muestran una unión inespecífica, lo que implica una presencia competitiva que puede afectar las ganancias de eficiencia.

4. Antecedentes

En trabajos anteriores, el grupo de Aptámeros de la UdelaR en colaboración con el grupo de Aptámeros del Instituto Ramón y Cajal (Madrid-España), hizo una selección de aptámeros de ADN específicos contra el receptor HER2, para ser aplicados como biofármacos de diagnóstico y terapia. Dicha selección de aptámeros consistió en un SELEX convencional (**Figura 18**), el cual se realizó con la porción extracelular de la proteína humana recombinante (YPC1045), en una suspensión salina con resina de Níquel (Ni), a 37°C. Tras seis rondas de selección y amplificación se obtuvo un pool enriquecido con aptámeros muy afines y específicos. Asimismo, fueron realizadas rondas de contra selección (o selección negativa), de manera de eliminar secuencias inespecíficas que no reconocieran a dicho blanco. Dichas secuencias posteriormente fueron aisladas, y secuenciadas por el método Sanger. Posteriormente se realizó la evaluación de las secuencias obtenidas mediante análisis bioinformático, y cuatro de ellas (F17, F21, F23 y F30) fueron sintetizadas para su caracterización, realizando una modificación con un grupo aminohexilo en los extremos 5' o 3' para futuras funcionalidades. Además, se realizaron ensayos de Termoforesis en Microescala (o MTS) en la Universidad de Missouri, y se vio que uno de los aptámeros candidatos, el F21, mostró una constante de disociación (k_D) de 42 nM. Datos no publicados hasta el momento.

A efectos de continuar con la caracterización de los aptámeros seleccionados, en la tesina de Licenciatura en Ciencias Biológicas del estudiante Mauro de Castro, se realizaron ensayos de SPR (Resonancia de plasmón superficial) y de citotoxicidad con dos líneas celulares, BT-474 (alta expresión de HER2) y MDA-MB-231 (baja expresión de HER2) para los cuatro aptámeros modificados en 5' o 3'. Estos resultados no fueron prometedores a la vez de que no mostraron reproducibilidad por lo que no se puede decir que existe un buen candidato entre los aptámeros seleccionados. Datos no publicados hasta el momento.

Es importante destacar que no existen hasta el momento aptámeros anti-HER2 que hayan mostrado gran potencial (Kim et al., 2019; Tan et al., 2020; Tang et al., 2020).



II. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Una combinación de los métodos de Cell-SELEX y LGCS utilizando los anticuerpos monoclonales Trastuzumab y Pertuzumab ayudaría a seleccionar aptámeros específicos contra los subdominios IV y II del receptor HER2.

Objetivos Generales

Explorar Cell-SELEX para obtener nuevos aptámeros contra el receptor HER2.

Objetivos Específicos

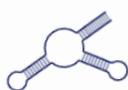
- 1- Realizar una selección de aptámeros en una línea celular con sobreexpresión del receptor HER2.
- 2- Dirigir la selección contra los subdominios II y IV aplicando LGCS.
- 3- Caracterizar el enriquecimiento mediante citometría de flujo.



III. Materiales y métodos

1. Reactivos y materiales utilizados

Los reactivos cloruro de magnesio hexa hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), TRIzol™ (REF 15596026) esperma ADN de Salmón (DNA salmon), dNTPs 10 mM, agarosa y buffer fosfato salino (PBS) fueron comprados a la empresa Sigma Aldrich. Los reactivos 10X Taq polimerasa ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (buffer polimerasa), cloruro de magnesio (MgCl_2), Gel Red, 6x Loading dye buffer (REF SM1193) y Lader (REF SM1193) fueron comprados a la empresa Thermo Scientific. Los reactivos cloruro de calcio (CaCl_2) y cloruro de potasio (KCl) fueron adquiridos de la empresa Honeywell FLUKA. Los reactivos $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ (HEPES solución buffer) y el RPMI 1640 fueron adquiridos de la empresa Capricorn Scientific. Los reactivos TrypLE Express (TE) y Tripsina fueron comprados a la empresa Gíbcico. La biblioteca de aptámeros de ADN y primers (forward y reverse) fueron sintetizados y adquiridos en la empresa Integrated DNA Technologies (IDT). Los anticuerpos Herceptin® Trastuzumaby Perjeta® Pertuzumab fueron adquiridos de la empresa Roche y el anticuerpo isotipo comercial Alexa fluor 647 anti-human CD340 (erbB2/HER2, REF 324412) de la empresa BioLegend. Por otra parte, las líneas celulares BT-474 (REF HTB-20) y MDA-MB-231 (REF HTB-26) fueron compradas a la empresa ATCC, el reactivo CHCl_3 (Cloroformo) fue adquirido de la Drogería Industrial Uruguaya, el hidróxido de sodio (NaOH) de la empresa J.T Baker, el buffer Tris, Acetato y EDTA (TAE Buffer, REF EB1000) de la empresa Quick SILVER, el Buffer 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol; Cloruro de Hidrógeno (Tris HCL) de la empresa Desheng, el cloruro de sodio (NaCl) de la empresa DORWIL Química Analítica, el cloruro de potasio (KCl) y cloruro de calcio (CaCl_2) de la empresa Honeywell FLUKA, el 2X Mifi MIX (REF BIO-25049) de la empresa Biotline, el $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (Citrato de Sodio) de la empresa Mallinckrodt y el Etanol (99,5% de pureza) de la empresa Biopack. Finalmente, el kit de purificación NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (REF 740609.50) fue adquirido de la empresa Macherey-Nagel y los microconos de 30 kDa (REF MRCF0R030) y 10 kDa (REF MRCPRT010) de la empresa Merck Milipore. En el caso de los materiales utilizados, las placas de cultivo de fondo plano de 6 pocillos y de 24 pocillos, así como los frascos de cultivo y las pipetas de 5 mL y 10 mL, fueron compradas a la empresa Nest, las micropipetas a Termofisher y los tips con filtro para los mismos, fueron adquiridos de la empresa Axygen.



2. Preparación de disoluciones y cultivo celular

2.1 Disoluciones generales

Binding Buffer (BB): Tris HCl 50 mM, NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 5 mM y 2mM de MgCl₂ 6H₂O, pH= 7.5.

Citrato de Sodio 0,1 M en un 10% de EtOH previamente preparado, pH= 8.5

Etanol al 75%

2.2 Preparación de anticuerpos Trastuzumab y Pertuzumab

Se tomaron alícuotas de cada uno de los anticuerpos en sus viales originales y se colocaron cada uno en microcon de 30 kDa completando con agua miliQ para un volumen final de 400 µL. Se centrifugó en una microcentrífuga (marca DLAB serie D3024) a 13000 rpm durante 20 minutos para descartar el sobrenadante. Dicho paso se repitió dos veces. Posteriormente, se invirtió cada microcon, se centrifugó a 1500 rpm durante 2 minutos y se recogió la fracción de anticuerpo concentrada y sin sales. Finalmente, se realizó la cuantificación en un equipo de nanodrop (Eppendorf Biophotometer® D30) y mediante la Ley de Lambert-Beer y los coeficientes de absortividad molar para cada anticuerpo, se determinó la concentración de los mismos, de manera de preparar una solución 5 µM en un volumen final de 1 mL.

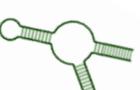
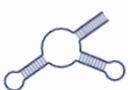


2.3 Cultivo celular

La selección de aptámeros se realizó en cabina de flujo laminar vertical BSL2 (marca Holten LaminAir 1.5) a partir de un cultivo de células BT-474, en un frasco T25 que se encontraba en estufa a 37°C (marca Heal Force 90), en un 80% de confluencia, lo que corresponde con 4×10^6 células en 4 mL aproximadamente. Ulteriormente, se descartó el medio de cultivo, se lavó con PBS 1X a 37°C y se agregó 500 μ L de Tripsina para despegar las células en estufa y así proseguir con el plaqueo. Para las primeras rondas de selección (R1 y R2), se plaqueó en placas de 6 pocillos, 1×10^6 células en 1,5 mL de medio RPMI suero fetal bovino 10% (RPMI SFB 10%) mientras que para el resto de las rondas (R3, R4, R5 y R6), se plaqueo en placas de 24 pocillos, $2,5 \times 10^5$ células en 1,5 mL de medio RPMI SFB 10% (**Figura 23**). Ambos plaqueos con células BT-474 se dejaron incubando en estufa a 37°C, durante 48 horas.



Figura 23. Células BT-474 en un 80% de confluencia, observadas en un microscopio de campo claro con aumento 4X. A la izquierda un pocillo de una placa de 6 pocillos con 1×10^6 células y a la derecha un pocillo de una placa de 24 con $2,5 \times 10^5$ células. Ambas crecieron en medio de cultivo RPMI SFB 10% a 37°C.



3. Diseño de selección

Se diseñó una biblioteca de aptámeros de ADN (**Figura 24**), la cual presenta dos regiones constantes en la que se unen el primer forward y el primer reverse (18 nucleótidos), y una región variable de 30 nucleótidos, en la que en cada posición puede haber tanto purinas (Adenina y Guanina) como pirimidinas (Citosinas y Timina). Dicha biblioteca presenta una masa molar de 20412 kDa, y cada uno de los primers tiene un largo de 18 nucleótidos y masa molar de aproximadamente 5000 kDa. El tamaño de la biblioteca fue considerado el adecuado para los fines diagnósticos en donde se generarán sondas de imagenología molecular.

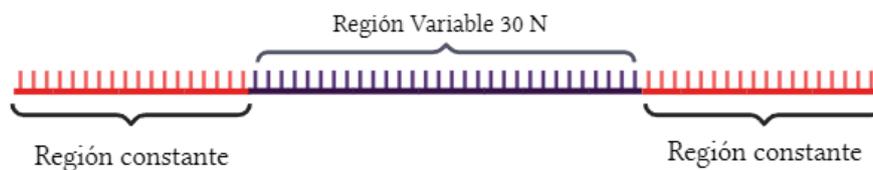


Figura 24. Representación esquemática de la biblioteca de ADN simple hebra utilizada, en la que se observa en rojo, las regiones constantes en las que se unen los primers de 18 nucleótidos y en violeta, la región variable que indica que en cualquier posición puede haber cualquier nucleótido de purina (Adenina y Guanina) o pirimidina (Citosinas, Timina). Esquema realizado en BioRender.

La selección de aptámeros mediante la metodología de Cell-SELEX se realizó en dos situaciones distintas (**Figura 25**). Dicha selección se realizó con la línea celular BT-474 en un 80% de confluencia en donde para la ronda 1 y 2 se tenían 1×10^6 células y para la ronda 3, 4, 5 y 6 se tenían $2,5 \times 10^5$ células en medio de cultivo RMPI SFB 10%.

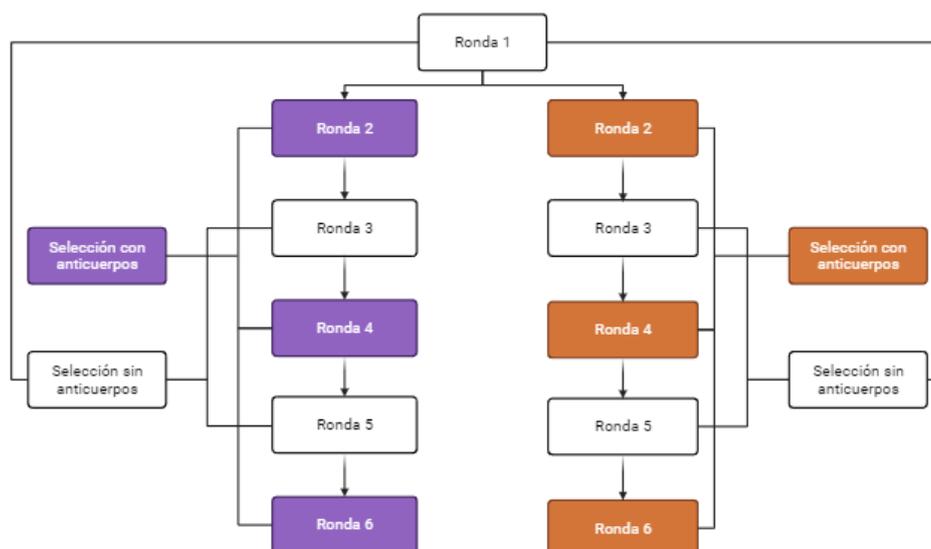
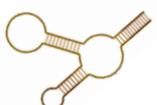


Figura 25. Esquema de las sucesivas rondas realizadas en paralelo mediante Cell-SELEX, en la que se puede observar en color violeta o anaranjado en cuáles rondas se realizó una selección con anticuerpos y en color blanco, en cuáles se realizó una selección sin anticuerpos, siendo el color violeta anticuerpos Trastuzumab y el anaranjado anticuerpos Pertuzumab. Esquema realizado en BioRender.



Considerando que se partió de 1×10^6 millones de células para el paso de incubación, la relación aptámero/receptor HER2 fue de 1:1.000, teniendo en cuenta que por cada célula hay 1×10^6 millones de receptores HER2 (Komarova & Kuznetsov, 2019; Onsum et al., 2013). Asimismo, en cada una de las rondas de selección se partió siempre de la misma cantidad de masa de ADN. A lo largo de las rondas se cambiaron las tres condiciones principales para generar astringencia en el proceso: se cambiaron las condiciones de tiempo de incubación de aptámero (de 30 minutos a 15 minutos) y anticuerpo (de 30 minutos a 60 minutos), así como la cantidad de células (de 1×10^6 células a $2,5 \times 10^5$ células) y lavados con BB, de manera de poder aumentar la afinidad y especificidad de los aptámeros (**Figura 26**).

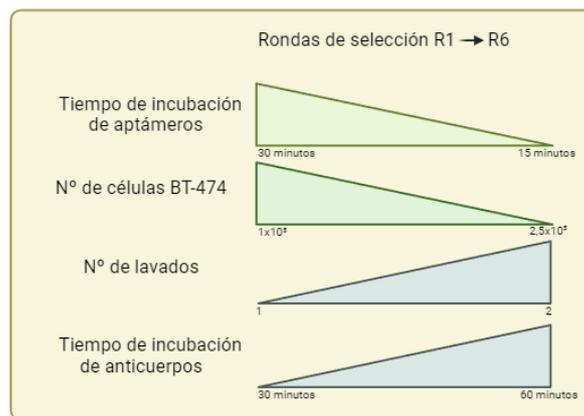


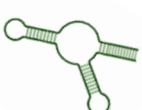
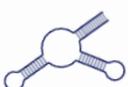
Figura 26. Representación esquemática de las variaciones de tiempo de incubación, número de células y lavados, desde R1 a R6. Realizado en BioRender.

Dado que dicha estrategia es compleja, se diseñó un sistema de nomenclatura a efectos de interpretar en qué condiciones fueron obtenidos los aptámeros en las sucesivas rondas. Las rondas en donde se utilizó anticuerpo se nombraron con el símbolo +, mientras que las rondas en donde no se utilizó anticuerpo se nombraron con el símbolo - (**Tabla 1**). Sin embargo, ninguna de las rondas fueron rondas de contraselección o selección negativa dado que esta estrategia no incluyó este tipo de rondas.

Tabla 1. Nomenclatura de las rondas de selección

Caracteres	Significado
Rn	Ronda n *
P	Pertuzumab
T	Trastuzumab
+	Incubación con el anticuerpo
-	Incubación sin el anticuerpo
P1	PCR 1
P2	PCR 2

* n es el número de la ronda y puede tomar valores de 1 hasta n.



3.1 Cell-SELEX

Estas rondas Cell-SELEX se caracterizan por ser rondas de selección convencionales en las que los aptámeros obtenidos son los que se unen a la célula. En dicha ronda de selección esquematizada en la **Figura 27**, se utilizó en la reestructuración un termobloque de la marca Digital Dry Bath serie DKT200-1, en la cuantificación un nanodrop de la marca Eppendorf, en la amplificación un termociclador de la marca DLAB serie TC100-G y un equipo de electroforesis de la marca Allsheng serie Mini-ES2. Asimismo, la selección se realizó en cabina de flujo laminar vertical BSL2 y se dividió en 10 pasos indicados a continuación.

1. Bloqueo con DNA esperma de salmón; 2. Reestructuración de la biblioteca de aptámeros; 3. Incubación de células con la biblioteca de aptámeros; 4. Extracción de ADN con Trizol o temperatura (en el caso de la ronda 6); 5. Cuantificación por nanodrop; 6. Amplificación inicial mediante PCR; 7. Electroforesis en gel de agarosa 0,6%; 8. Amplificación final mediante PCR; 9. Cuantificación por nanodrop; 10. Electroforesis en gel de agarosa 0,6%.

Luego de finalizada la ronda, a excepción de la ronda 1, la misma pasó a llamarse RnT- o RnP, siendo n el número de la ronda (**Tabla 1**). Por otra parte, en las siguientes rondas -, el primer paso de bloqueo no se realizó, sino que se partió desde el punto 2.

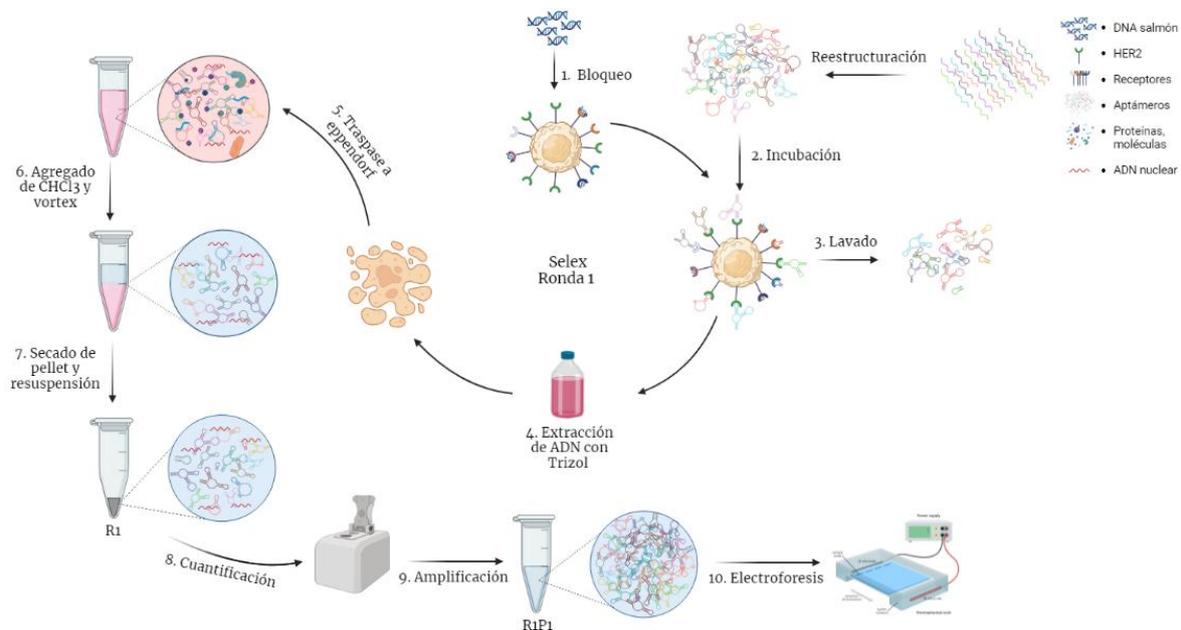


Figura 27. Representación esquemática de la ronda 1 como ejemplo en la que se muestra los sucesivos pasos realizados para las rondas de selección de Cell-SELEX sin la utilización de los anticuerpos Trastuzumab y Pertuzumab. A la derecha se observa las referencias de dichas moléculas, como ser el receptor HER2 de interés, DNA esperma de salmón, aptámeros, entre otros. Esquema realizado en BioRender.

3.2 LGCS

Estas rondas se caracterizan por ser rondas de competencia con anticuerpos por lo cual obtenemos los aptámeros que han sido desplazados por los mismos, y que por ende compiten por un epítipo dado. En dicha ronda de selección esquematizada en la **Figura 28**, se utilizaron los mismos equipos de la rondas Cell-SELEX. En este caso, la selección consistió en 7 pasos, ya que no se realizó una amplificación final mediante PCR.

1. Reestructuración de la biblioteca de aptámeros; 2. Incubación de células con los anticuerpos; 3. Incubación de células con la biblioteca de aptámeros; 4. Obtención del sobrenadante con aptámeros; 5. Cuantificación por nanodrop; 6. Amplificación inicial mediante PCR; 7. Electroforesis en gel de agarosa 0,6%

Luego de finalizada la ronda, a excepción de la ronda 1, la misma pasó a llamarse RnT+ o RnP+, siendo n el número de la ronda (**Tabla 1**).

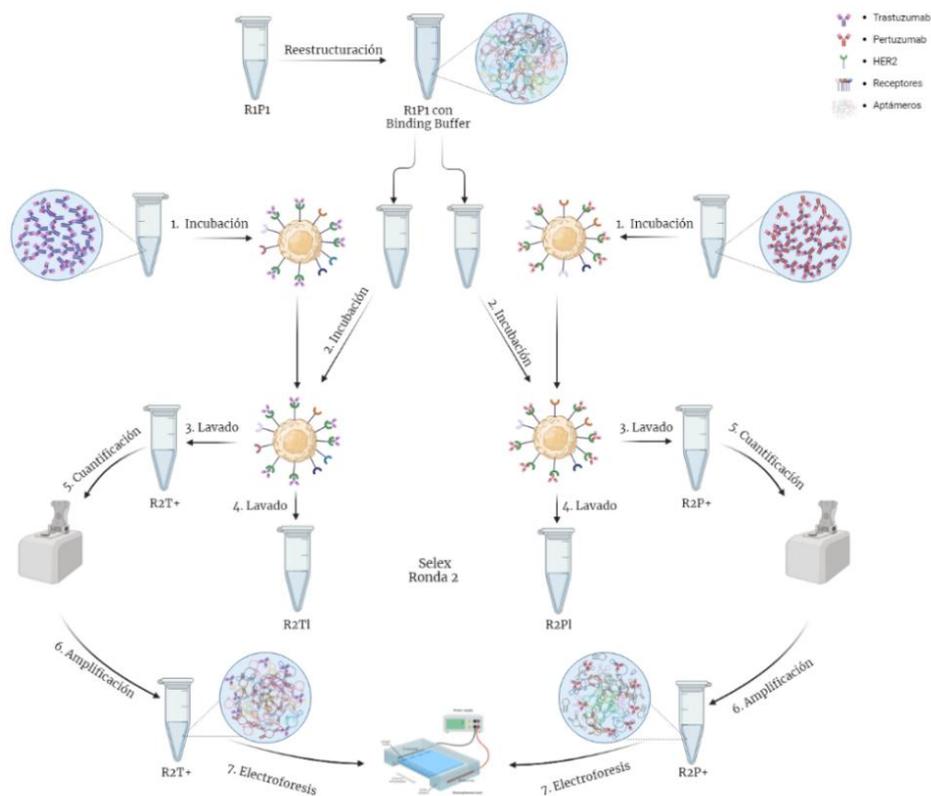
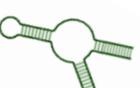
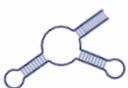


Figura 28. Representación esquemática de la ronda 2 como ejemplo en la que se muestra los sucesivos pasos realizados para las rondas de selección LGCS con los anticuerpos Trastuzumab y Pertuzumab por separado. A la derecha se observa las referencias de dichas moléculas, como ser el receptor HER2 de interés, anticuerpo Trastuzumab y Pertuzumab, aptámeros y receptores. Esquema realizado en BioRender.



3.3 Amplificación por PCR

Una vez obtenidos los aptámeros en cada ronda de selección, tanto para la ronda Cell-SELEX, como para la ronda LGCS, se sesteó los parámetros del termociclador (**Tabla 2**) y se preparó un Mix PCR (**Tabla 3**) de volumen final 50 μL , para realizar una amplificación inicial.

Tabla 2. Condiciones del termociclador

	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	95	60
Desnaturalización	95	15
Alineamiento	56,3	15
Extensión	72	15
Extensión Final	4	∞

Posteriormente, en el caso de las rondas Cell-SELEX además, se realizó una amplificación final, en la que se preparó un Mix PCR de volumen final 250 μL que consistió en cinco tubos de PCR con un volumen final de 50 μL , para ser amplificados siguiendo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Una vez finalizada la amplificación, se agregó a su nomenclatura el término P1 (**Tabla 1**). En cambio, en las rondas LGCS, como solo se realizó una amplificación inicial, dicho término no fue agregado.

Tabla 3. Condiciones del Mix PCR

	MIX
Primer Reverse (100 μM)	0,8 μL
Primer Forward (100 μM)	0,8 μL
MiFy Mix	18 μL
ADN molde	1 μg
Agua	Hasta 50 μL

3.4 Purificación de aptámeros

Una vez obtenidas las poblaciones de Aptámero R6T+ y R6P+, se realizó la purificación de 1000 μg de los mismos utilizando el kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up, siguiendo el protocolo del fabricante. Dichas secuencias purificadas se mandaron a secuenciar al Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid-España, con quienes colaboramos en forma estrecha.



4. Caracterización de la población de aptámeros

4.1 Marcación de la población de aptámeros R6T+P1, R6P+P1 y R1P2 con Primer FITC

En colaboración con un estudiante de ciencias biológicas, se realizó la marcación con FITC del primer reverse conjugado a un grupo aminohexilo en el extremo 5'. Una vez realizada dicha marcación, se realizó la comprobación mediante RP-HPLC (equipo marca Agilent Technologies serie 1200). Posteriormente, se realizó la purificación del primer R marcado con FITC (Primer R-FITC), mediante una columna de desalinización PD-10 (marca Cytiva serie 17-0851-01), para eliminar el FITC en exceso (**Figura 29**).

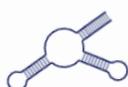


Figura 29. Fracciones (500 μ L) eluidas de la PD-10 con agua miliQ.

Luego de realizada la purificación, se llevó a cabo la cuantificación de los tubos 6, 7 y 8. Después, se hizo una amplificación final de las rondas R1, R6 y se procedió con el marcado de la población de aptámeros R1P2, R6T+P1 y R6P+P1, para su posterior caracterización por citometría de flujo. Para esto, se realizó una hibridación entre el primer R-FITC 50 μ M y la ronda R1P2, R6T+P1 o R6P+P1 utilizando una relación de 1:1 (aptámero: Primer R-FITC) con concentración de 400 nM de la población de aptámero y 5 nM de Primer R-FITC, en un volumen final de 100 μ L, pero dado que la citometría se realizó por duplicado, la hibridación se realizó para un volumen final de 500 μ L. Posteriormente, se cubrió las muestras R1P2, R6T+P1 y R6P+P1 con papel aluminio, se calentó en termobloque durante 3 minutos a 100°C, luego se dejó en el bloque por 20 minutos a temperatura ambiente (con el bloque fuera del termobloque) y finalmente se incubó en hielo para producir el shock térmico.

4.2 Citometría de población de aptámeros

Para la realización de la citometría de población de aptámeros, se partió de las líneas celulares BT-474 y MDA-MB-231 en 80% de confluencia (**Figura 30**), incubadas en estufa a 37°C en un frasco T25. Se descartó el medio de cultivo RPMI SFB 10%, se lavó con PBS 1X a 37°C y se agregó 500 μ L de PBS sin Ca^{2+} Mg^{2+} a 4°C para despegar las células con rastrillo.



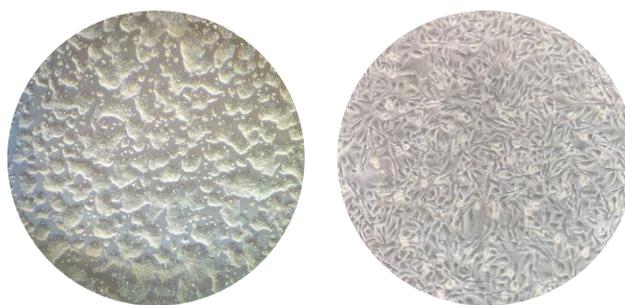


Figura 30. Células BT-474 y MDA-MB-231 en un 80% de confluencia, observadas en un microscopio de campo claro a 4X para las BT-474 y 20X para las MDA-MB-231, crecidas en un frasco T25 en medio de cultivo RPMI SFB 10% a 37°C.

Posteriormente, se realizó una dilución al 1/2 tomando 10 μL de células BT-474 o MDA-MB-231 y 10 μL de *Trypan Blue* para colocar por capilaridad en cámara de Neubauer y realizar en microscopio de campo claro (equipo marca LABOMED® serie TCM 400) el conteo de las mismas de manera de determinar el número de células que pasarán por el citómetro. Una vez determinado el número de células, se preparó por duplicado las distintas muestras (**Tabla 4**) para un volumen final de 160 μL , usando 100 μL de población de aptámero R1P2, R6T+P1 o R6P+P1 de concentración 400 nM, marcados con el primer R-FITC 5 nM y 1 μL de anticuerpo comercial Alexa fluor 647 anti-human CD340 (anticuerpo anti-HER2), en el caso del control positivo. El volumen restante se completó con BB a 37°C.

Tabla 4. Condiciones finales de las distintas muestras para la citometría

	BT-474	MDA-MB-231
C -	60 μL células; 100 μL BB a 37°C	27 μL células; 133 μL BB a 37°C
R1P2	60 μL células; 100 μL R1P2	27 μL células; 100 μL R1P2; 33 μL BB a 37°C
R6T+P1	60 μL células; 100 μL R6T+P1	27 μL células; 100 μL R6T+P1; 33 μL BB a 37°C
R6P+P1	60 μL células; 100 μL R6P+P1	27 μL células; 100 μL R6P+P1; 33 μL BB a 37°C
C +	60 μL células; 99 μL BB a 37°C; 1 μL Ac	27 μL células; 132 μL BB a 37°C; 1 μL Ac

C-: Control negativo; C+: Control positivo; Ac: anticuerpo anti-HER2; BB: Binding Buffer; R1P2, R6T+P1 y R6P+P1 población de aptámeros de concentración 400 nM marcados con el primer R-FITC

Posteriormente, se cubrió las muestras preparadas con papel aluminio y se incubó la población de aptámeros R1P1, R6T+P1 y R6P+P1 marcados con el Primer R-FITC, así como el control negativo y positivo, en estufa a 37°C durante 15 minutos para desencadenar la unión al receptor HER2 expresado en la línea BT-474 y MDA-MB-231. Luego se centrifugó a 1500 rpm (marca Thermo Scientific serie Sorvall ST 8), 5 minutos a 4°C para descartar el sobrenadante con exceso de aptámero no unido y se resuspendió en BB a 4°C para ser analizadas en el citómetro. Para esto último, se utilizó un equipo

Attune™ NxT, del Institut Pasteur de Montevideo, donde se setearon los voltajes de los canales APC y FITC para ver el comportamiento del anticuerpo anti-HER2 y la población de aptámeros marcada con el primer R FITC, respectivamente. Una vez seteados los mismos, se procedió con la estrategia de gating en el equipo para las líneas BT-474 y MDA-MB-231.

4.3 Estrategia de Gating

Una vez que se realizó la citometría de flujo en el equipo Attune™ NxT para la adquisición de los datos, se procedió con la caracterización de los aptámeros, mediante su análisis en el programa Flowjo para las líneas BT-474 y MDA-MB-231 (**Figura 31**). Dentro del Forward scatter (FSC) vs Side scatter (SSC), se tomó los datos de las muestras sin teñir de cada línea celular (correspondientes al control negativo), y se determinó la población de células que corresponden a la línea celular BT-474 o MDA-MB-231. Posteriormente dentro de ese gate, se determinó la población *single cells* a partir del gráfico de área vs alto de la señal de FSC, de manera de eliminar dobletes que puedan dar lugar a falsos positivos en la intensidad de fluorescencia. Luego, se realizaron dos histogramas, uno para FITC y otro para APC, para ver el comportamiento del anticuerpo anti-HER2 y la población de aptámeros marcada con el primer R-FITC respectivamente, estableciendo como 1% (de la población negativa), el umbral a partir del cual la población de aptámeros o el anticuerpo anti-HER2 es positiva para el receptor HER2. Finalmente, dichos parámetros fueron replicados a las diferentes muestras indicadas en la **Tabla 4**, para determinar la intensidad de fluorescencia mediana geométrica (MFI) en dichos canales.

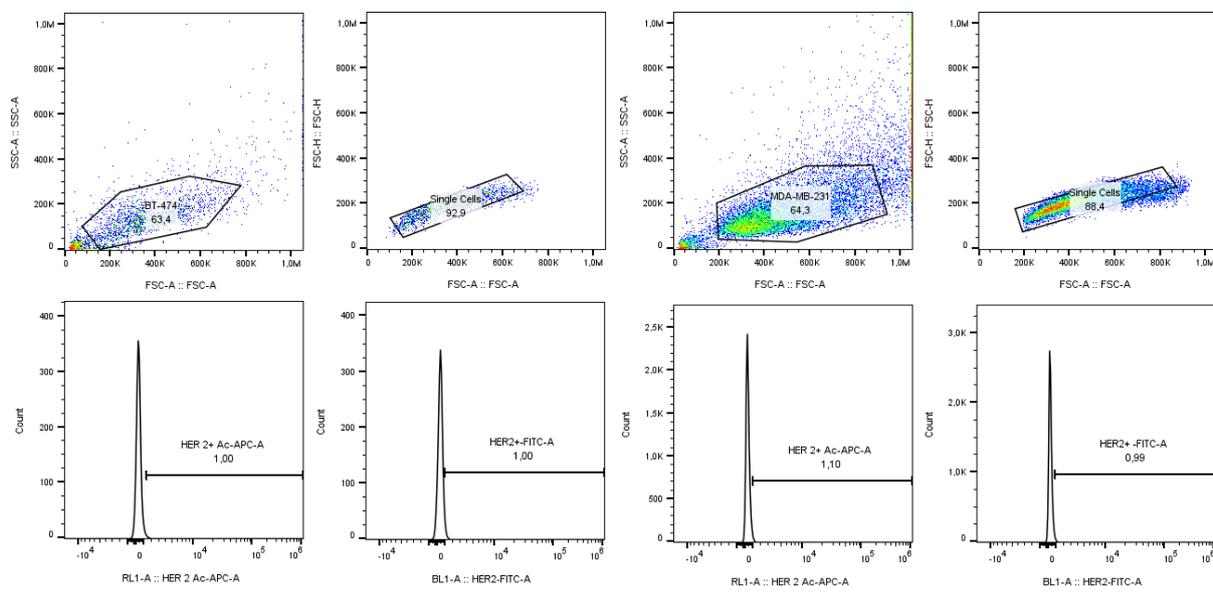
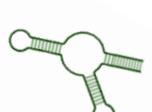
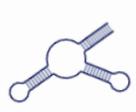


Figura 31. Estrategia de Gating de las líneas celulares BT-474 y MDA-MB-231. Se observa el gate de la población de cada línea celular, seguido del gate de single cells y umbrales para canales FITC y APC.



IV. Resultados y Discusión

1.1 Enriquecimiento de aptámeros anti-HER2 en las sucesivas rondas de selección por Cell-SELEX

Para obtener un enriquecimiento de aptámeros en las sucesivas rondas de selección, se realizaron rondas en paralelo, dirigidas a subdominios distintos del receptor HER2, con selección sin anticuerpo y selección con anticuerpo (**Figura 25**). La selección sin anticuerpos se realizó con el fin de unir aptámeros a los receptores HER2 y a otras moléculas y receptores presentes en la célula, mientras que la selección con anticuerpo se realizó con el fin de desplazar y aislar aquellos aptámeros que se unan a los subdominios II y IV. Para ello se partió siempre de una pequeña porción de la masa de aptámeros obtenida en la ronda anterior y se bloqueó los receptores HER2 de la línea celular BT-474 con los anticuerpos Trastuzumab o Pertuzumab. De modo que luego mediante los lavados, se recojan aptámeros potenciales específicos contra dichos subdominios, dejando aquellos aptámeros inespecíficos unidos a la célula. Asimismo, durante las rondas de selección se disminuyó la k_D (la cual depende de las constantes cinéticas k_{on} y k_{off}), disminuyendo la concentración del blanco, el tiempo de incubación (afecta directamente la k_{on}) y aumentando la cantidad de lavados (afecta directamente a k_{off}) a efectos de aumentar la afinidad y especificidad de los aptámeros.

A medida que se avanzó en cada ronda de selección, modificando los tiempos de incubación (de aptámero y anticuerpo) y la concentración del blanco (cantidad de receptores), se observó un enriquecimiento en aumento para las rondas de selección con anticuerpo (**Figura 32**), siendo cercano al 100% en la ronda 6 tanto para R6T+ (131%) como para R6P+ (133%). Esto último, dió la pauta de no realizar más rondas de selección, puesto que siempre se recuperará la misma cantidad de aptámero desplazado. Por otra parte, el hecho de que en la ronda 6 se haya recuperado el 100% de los aptámeros, es lo esperado para un enriquecimiento total de la población. En la ronda 5, a diferencia del resto de las rondas, se realizó una selección en la cual se combinó las estrategias aplicadas anteriormente, pero incubando con el anticuerpo contrario (en la selección de aptámeros utilizando Trastuzumab se incubó con Pertuzumab). Esto se hizo con la intención de que los aptámeros obtenidos sean específicos solamente contra uno de los subdominios del receptor HER2, eliminando el entrecruzamiento de los mismos. En este sentido, era esperable que al momento de realizar la ronda 6, el porcentaje de aptámero recogido durante la etapa de lavado, fuera cercano al 100%.



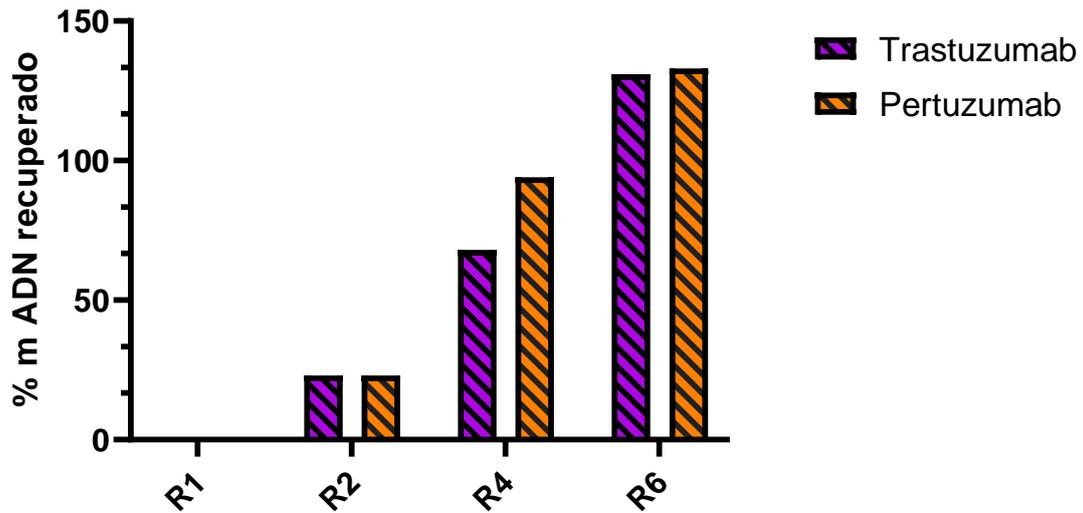


Figura 32. Porcentaje de masa de ADN recuperado, durante las sucesivas rondas de selección LGCS, en el que los aptámeros fueron dirigidos hacia sitios específicos de unión bloqueando con anticuerpos Trastuzumab o Pertuzumab.

Luego de cada ronda, se realizaron gels de electroforesis de forma de verificar si se obtuvo aptámero. Se observó una banda de mayor peso molecular de 40824 kDa correspondiente a aptámero amplificado (doble hebra), una banda de menor peso molecular de 20412 kDa correspondiente a aptámero no amplificado o simple hebra y unas bandas de aproximadamente 5000 kDa correspondiente a primers (**Figura 33**). El hecho de que se observó primers sin utilizar, puede deberse a que no había suficientes dNTPs (afectando la amplificación de aptámero) para la polimerasa, o que hubiera un exceso del mismo.

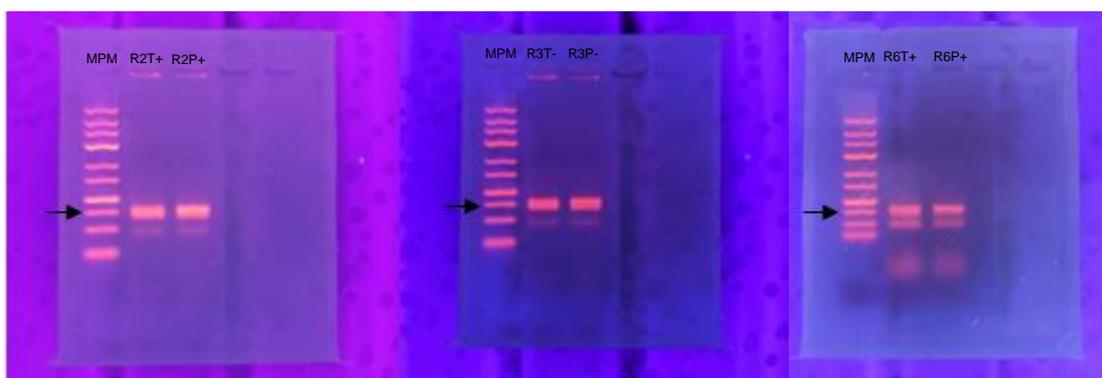
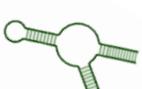
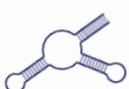


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa 0,6% de algunas de las rondas de Cell-SELEX. La flecha indica a esa altura aptámero amplificado de 40824 kDa.

A pesar de esto, no podemos determinar qué tan enriquecida se encuentra la población de aptámero obtenida, dado que, en cada ronda de selección, la masa de ADN cuantificada fue la total



(aptámero, ADN nuclear, etc) y no solamente la de masa de ADN de aptámeros. Además, no se descarta la opción de que en dicho enriquecimiento haya quedado algún aptámero que sea específico contra el subdominio II, IV o ambos, o incluso algún aptámero inespecífico en menor cantidad. Una forma de mejorar esto, es que al momento de realizar la amplificación se hiciera por Real time PCR (qPCR), dado que de esta manera se podría realizar una curva de calibración en cada una de las rondas, a efectos de que luego de amplificar, mediante el C_t y la ecuación de la recta obtenida para la ronda en específico, se determine la masa del aptámero de forma mucho más precisa.

Otra forma de mejorar el enriquecimiento de aptámeros específicos, es realizando una contraselección negativa, sin embargo, dicho procedimiento es costoso, dado que implica realizar un *knock-out* de la célula contra el gen que expresa el receptor HER2, ya que todas las células en condiciones normales expresan un nivel basal de HER2.

1.2 Evaluación de las poblaciones de aptámeros dirigida a los subdominios II y IV.

A efectos de determinar qué tan específicos son estos aptámeros contra el receptor HER2, se realizaron ensayos de citometría para las células BT-474 y MDA-MB-231 (**Figura 31**).

En los histogramas correspondientes a BT-474 (**Figura 34**) que sobreexpresa el receptor HER2, se observó que en canal FITC, la población R1P2 presenta un menor corrimiento hacia mayores niveles de intensidad de fluorescencia, en comparación a R6T+P1 y R6P+P1. Esto puede deberse a que R1P2 corresponde a la ronda de partida, indicando que R6T+P1 y R6P+P1 ya se encuentran enriquecidas con aptámeros específicos contra el receptor HER2.

Dado que se tiene una población de aptámeros entre los cuales hay muchas secuencias, es importante considerar que allí habrá aptámeros con alta afinidad y especificidad y otros que no presentan dichas características, siendo entonces la señal la sumatoria de todos los aptámeros, los buenos y los malos. No se tiene forma de saber que tan afines son dichos aptámeros contra los subdominios IV y II, al tenerlos en una población. Asimismo, como en cada ronda se realizó una amplificación, existirán aptámeros que se encuentran en mayor cantidad que otros, generando una diferencia de afinidades por el receptor HER2, así como probablemente algún aptámero inespecífico. Por otra parte, los aptámeros adoptan diferentes estructuras en su conformación nativa y debido a que para marcarlos por hibridación se utiliza un primer R-FITC, puede ser que los mismos presenten distintas temperaturas de alineamiento, provocando por un lado, que haya aptámeros que se marquen más fácilmente con el primer R-FITC y por el otro, que en cuyo caso la temperatura de alineamiento sea baja, puede dificultar el shock térmico para reestructurar dichos aptámeros, haciendo que algunos de los mismos no queden bien reestructurados, dificultando su unión al receptor. Además, cómo dichos aptámeros son marcados por hibridación mediante un primer R-derivado con FITC, la presencia del



mismo sin marcar, podría estar compitiendo por la unión al aptámero. En efecto, habrá muchos aptámeros que no se marcarán y la señal observada en el citómetro estará subestimada. En consecuencia, dado que estamos analizando una población de aptámeros y que además la marcación de los aptámeros no es completa, la señal final se subestima en gran medida. Sin embargo, observar un corrimiento de la señal para R6T+P1 y R6P+P1 es un gran hallazgo, indicando que en dicha población existen buenos candidatos.

Respecto al canal APC, se observa un corrimiento bastante pronunciado, indicando que el control positivo funcionó, y que las células BT-474 tiene una alta expresión del receptor HER2, que es reconocido por el anticuerpo comercial.

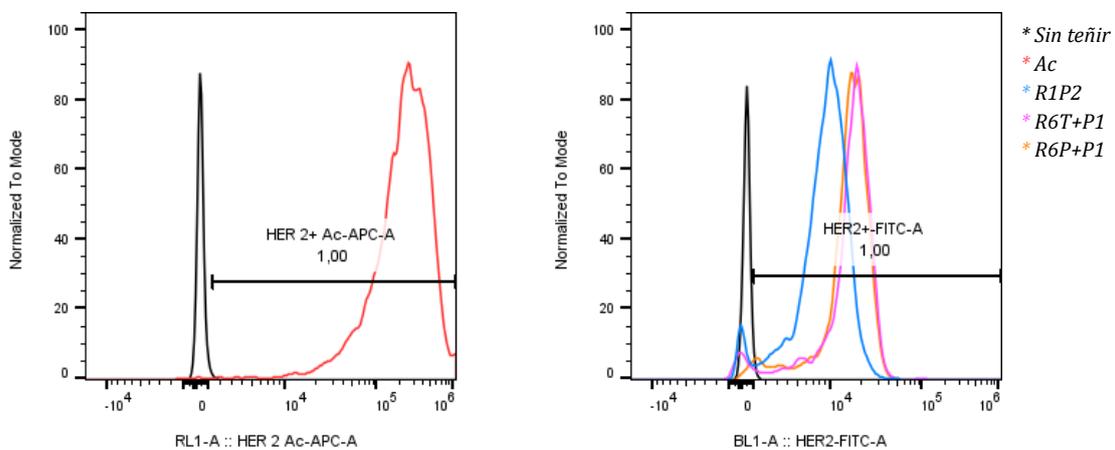
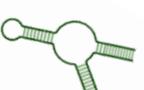
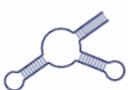


Figura 34. Histogramas normalizados de la línea celular BT-474, realizados en los canales de APC y FITC respectivamente. Ac: Anticuerpo-anti HER2; Sin teñir: Control negativo.

En relación a las células MDA-MB-231 (**Figura 35**) que presentan baja expresión del receptor HER2, para el canal FITC, se observó que en todas las poblaciones de aptámero, no hay corrimiento o no es muy pronunciado como en las BT-474, lo cual indica que estamos en presencia de una población específica. Por lo tanto, los aptámeros específicos se unirán en mayor medida a las células BT-474 que tienen sobreexpresión del receptor y en menor medida a las células MDA-MB-231 que tienen baja expresión. Si estuviéramos en presencia de una población con gran cantidad de aptámeros inespecíficos también veríamos corrimiento hacia mayores niveles de fluorescencia en las células MDA-MB-231, lo cuál no ocurre.

En el caso del anticuerpo, si bien se observa un corrimiento, es mínimo en comparación con las células BT-474, esto puede explicarse debido a que estas células tienen menor expresión del receptor HER2. Esto también es válido para los aptámeros, sin embargo, el corrimiento de la población es mínimo. No obstante, dado que los datos son obtenidos de canales de fluorescencia distintos, con seteos de voltaje diferentes, no se pueden comparar.



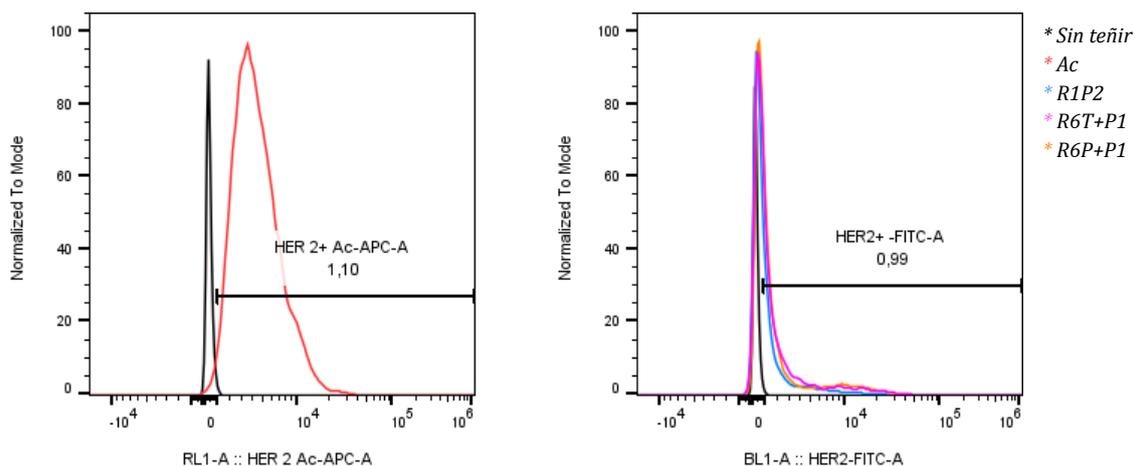


Figura 35. Histogramas normalizados de la línea celular MDA-MB-231, realizados en los canales de APC y FITC respectivamente. Ac: Anticuerpo-anti HER2; Sin teñir: Control negativo.

Estos resultados obtenidos también pueden ser vistos en tablas de intensidad de fluorescencia media o MFI (**Tabla 5, 6**). En el caso de FITC, para las BT-474, la fluorescencia respecto al control negativo para R6T+P1 aumentó 35 veces, mientras que R6P+P1 aumentó 34 veces. En cambio, la fluorescencia para R1P2 aumentó solamente 20 veces respecto al control. Por otra parte, para el canal APC, la intensidad de fluorescencia aumentó 725 respecto al control. Estas diferencias, implican que ocurrió un enriquecimiento de dichas rondas. Por otra parte, en el caso de las MDA-MB-231, el MFI de FITC para todas las poblaciones, solo aumentó 3 veces respecto al control y para APC solo aumentó 11 veces respecto al control, pero dado que los MFI para la población y para el anticuerpo, fueron obtenidos de medianas geométricas distintas, por estar marcados con fluoróforos distintos, dichos resultados, no pueden ser comparables. Por otra parte, se observó que el desvío estándar de las BT-474 fue mayor, respecto al de las MDA, esto es debido a que, durante la realización del ensayo, no se obtuvieron eventos equitativos en los ensayos realizados por duplicado.

Tabla 5. Valores estadísticos de la línea BT-474 para los canales FITC y APC

	FITC			APC		
	MFI	SD	R	MFI	SD	R
C-	507	62	-	377	21	-
R1P2	10219	1152	20	-	-	-
R6T+P1	17905	1732	35	-	-	-
R6P+P1	17101	1812	34	-	-	-
Ac	-	-	-	262443	45872	725

MFI: Intensidad de fluorescencia mediana geométrica; SD: Desvío estándar; R: relación MFI muestra/MFI control

Tabla 6. Valores estadísticos de la línea MDA-MB-231 para los canales FITC y APC

	FITC			APC		
	MFI	SD	R	MFI	SD	R
C-	311	10	-	366	5	-
R1P2	823	222	3	-	-	-
R6T+P1	947	109	3	-	-	-
R6P+P1	856	41	3	-	-	-
Ac	-	-	-	4233	182	12

MFI: Intensidad de fluorescencia mediana geométrica; SD: Desvío estándar; R: relación MFI muestra/MFI control

Los MFI, para cada población, también están representados en un gráfico de barras, en el que se ve que tanto R6T+P1 como R6P+P1 se encuentran enriquecidos respecto a R1P2 (**Figura 36**).

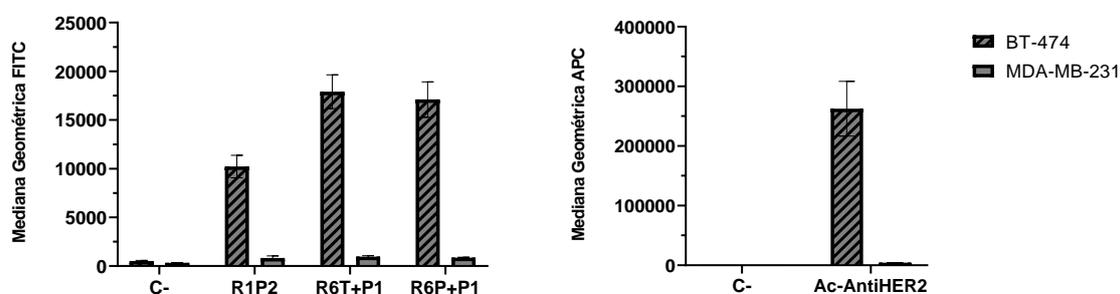
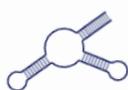


Figura 36. Mediana geométrica de fluorescencia de las líneas celulares BT-474 y MDA-MB-231 en los canales FITC y APC respectivamente, para el control negativo, control positivo Ac-AntiHER2 y las distintas poblaciones de aptámero R1P2, R6T+P1 y R6P+P1, con sus respectivas desviaciones estándar. Dichos valores de mediana geométrica, son expresados en valor promedio de medianas.

Estos ensayos son una forma de estimar el enriquecimiento que se va generando a través de las rondas. Este ensayo fue repetido obteniendo resultados similares. Otra forma de hacerlo es mediante un *melt assay* realizado mediante qPCR. Sin embargo, tanto lo observado en la **Figura 32**, como en la citometría, indicaría que en la ronda 6 ya hay suficiente enriquecimiento. Por ello, se espera realizar secuenciación por *Next Generation Sequencing* (NGS) de dichas rondas de manera de poder determinar posteriormente mediante análisis bioinformáticos, cuáles de la población de aptámero obtenida se encuentran más enriquecidos. El análisis de dicha secuenciación está pendiente de ser realizado, y no ha sido incluido para esta tesina. A futuro se espera realizar más rondas de selección, mejorando los perfiles de cuantificación, haciendo qPCR y volviendo a secuenciar.



V. Conclusiones

Este trabajo logró a través de la metodología de Cell-SELEX propuesta, enriquecer una población de aptámeros específicos contra el receptor HER2, dado que se observó que los aptámeros R6T+P1 y R6P+P1 presentaron mayor unión a las células BT-474, que los aptámeros R1P2. Sin embargo, a pesar de esto, no es posible clasificar poblacionalmente, cuales aptámeros son más afines que otros. Pese a que las medianas geométricas mostraron que a nivel poblacional existe una parte de la misma que se encuentra más enriquecida, pudiendo ser más específica contra el receptor HER2. También a través de dicha metodología, se logró obtener aptámeros que discriminan entre las células utilizadas en la selección y entre las células utilizadas en el ensayo por citometría.

A pesar de obtener una herramienta que cumple con los objetivos planteados, aún queda mucho por hacer. Esta es una primera aproximación, pero es necesario que dichos aptámeros sean caracterizados en forma aislada para continuar con su evaluación y desarrollo, con el objetivo de que a futuro funcionen con su fin propuesto, el cual es ser utilizados como tratamiento y/o diagnóstico del cáncer de mama, pues la implementación de esta metodología denominada Cell-SELEX abre muchas posibilidades en relación a la investigación aplicada a la biomedicina.

Obtener aptámeros contra HER2 que tengan alta afinidad y especificidad sería un gran logro. Dada la amplia versatilidad que los aptámeros presentan se pueden generar novedosas estrategias que se potencien con los abordajes actuales en diagnóstico y terapia del cáncer.

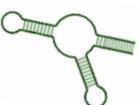
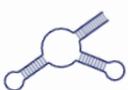
Perspectivas a Futuro

Teniendo una mirada optimista en este campo, se espera seguir caracterizando dichos aptámeros computacionalmente, y posteriormente, realizar ensayos de unión al blanco de los aptámeros aislados para determinar su K_D y especificidad, citotoxicidad, así como ensayos *in vivo*, a efectos de ver si los aptámeros obtenidos, funcionan en esas condiciones para ser utilizados a futuro como biofármacos o para estudios de imagenología molecular.



VI. Bibliografía

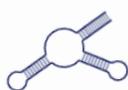
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U.** (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*, *50*(1), 33. doi:10.1186/s40659-017-0140-9
- Alcalá-Corona, S. A., Espinal-Enríquez, J., de Anda-Jáuregui, G., & Hernández-Lemus, E.** (2018). The Hierarchical Modular Structure of HER2+ Breast Cancer Network. *Front Physiol*, *9*, 1423. doi:10.3389/fphys.2018.01423
- Bai, X., Sun, P., Wang, X., Long, C., Liao, S., Dang, S., . . . Zhang, Z.** (2023). Structure and dynamics of the EGFR/HER2 heterodimer. *Cell Discov*, *9*(1), 18. doi:10.1038/s41421-023-00523-5
- Ballinger, T. J., Sanders, M. E., & Abramson, V. G.** (2015). Current HER2 Testing Recommendations and Clinical Relevance as a Predictor of Response to Targeted Therapy. *Clin Breast Cancer*, *15*(3), 171-180. doi:10.1016/j.clbc.2014.11.009
- Bayat, P., Nosrati, R., Alibolandi, M., Rafatpanah, H., Abnous, K., Khedri, M., & Ramezani, M.** (2018). SELEX methods on the road to protein targeting with nucleic acid aptamers. *Biochimie*, *154*, 132-155. doi:10.1016/j.biochi.2018.09.001
- Biri-Kovács, B., Adorján, A., Szabó, I., Szeder, B., Bősze, S., & Mező, G.** (2020). Structure-Activity Relationship of HER2 Receptor Targeting Peptide and Its Derivatives in Targeted Tumor Therapy. *Biomolecules*, *10*(2). doi:10.3390/biom10020183
- Bloom, H. J., & Richardson, W. W.** (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*, *11*(3), 359-377. doi:10.1038/bjc.1957.43
- Calzada, V.** (2020). Aptamers in Diagnostic and Molecular Imaging Applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, *174*, 141-160. doi:10.1007/10_2019_115
- Calzada, V., Garcia, F., Fernández, M., Porcal, W., Quinn, T., Alonso, O., . . . Cabral, P.** (2013). Labeling and Biological Evaluation of (99m)Tc-HYNIC-Trastuzumab as a Potential Radiopharmaceutical for In Vivo Evaluation of HER2 Expression in Breast Cancer. *World J Nucl Med*, *12*(1), 27-32. doi:10.4103/1450-1147.113953
- CHLCC.** (2022). Situación epidemiológica del Uruguay en relación al cáncer
- CHLCC.** (2023). CHLCC. Resumen Estadístico – MAMA. Incidencia y Mortalidad periodo 2015-2019. Tendencia de la Mortalidad hasta 2020. <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/RESUMENES-ESTADISTICOS-para-los-canceres-masfrecuentes--uc264> 26/07/2023
- Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr., & Leahy, D. J.** (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, *421*(6924), 756-760. doi:10.1038/nature01392



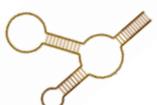
- Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H., & Ruml, T.** (2015). Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv*, 33(6 Pt 2), 1141-1161. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.008
- Eigenbrot, C., Ultsch, M., Dubnovitsky, A., Abrahmsén, L., & Härd, T.** (2010). Structural basis for high-affinity HER2 receptor binding by an engineered protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(34), 15039-15044. doi:10.1073/pnas.1005025107
- Ellington, A. D., & Szostak, J. W.** (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818-822. doi:10.1038/346818a0
- Elston, C. W., & Ellis, I. O.** (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5), 403-410. doi:10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
- Fritzsche, F. R., Kristiansen, G., Boesl, A., Burkhardt, M., Pahl, S., Dankof, A., . . . Dahl, E.** (2006). Tissue pretreatment with formic acid might lower HercepTest scores in breast cancer. *Diagn Mol Pathol*, 15(4), 237-242. doi:10.1097/01.pdm.0000213466.83516.5b
- Gholikhani, T., Kumar, S., Valizadeh, H., Mahdinloo, S., Adibkia, K., Zakeri-Milani, P., . . . Jimenez, B.** (2022). Advances in Aptamers-Based Applications in Breast Cancer: Drug Delivery, Therapeutics, and Diagnostics. *Int J Mol Sci*, 23(22). doi:10.3390/ijms232214475
- Gupta, P., Rai, N. N., Agarwal, L., & Namdev, S.** (2018). Comparison of Molecular Subtypes of Carcinoma of the Breast in Two Different Age Groups: A Single Institution Experience. *Cureus*, 10(6), e2834. doi:10.7759/cureus.2834
- Hammond, M. E., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., . . . Wolff, A. C.** (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med*, 134(7), e48-72. doi:10.5858/134.7.e48
- Hanker, A. B., Brown, B. P., Meiler, J., Marín, A., Jayanthan, H. S., Ye, D., . . . Arteaga, C. L.** (2021). Co-occurring gain-of-function mutations in HER2 and HER3 modulate HER2/HER3 activation, oncogenesis, and HER2 inhibitor sensitivity. *Cancer Cell*, 39(8), 1099-1114.e1098. doi:10.1016/j.ccell.2021.06.001
- Hausman, D. M.** (2019). What Is Cancer? *Perspect Biol Med*, 62(4), 778-784. doi:10.1353/pbm.2019.0046
- Inic, Z., Zegarac, M., Inic, M., Markovic, I., Kozomara, Z., Djuriscic, I., . . . Jancic, S.** (2014). Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clin Med Insights Oncol*, 8, 107-111. doi:10.4137/cmo.S18006
- Ishii, K., Morii, N., & Yamashiro, H.** (2019). Pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: an evidence-based review of its safety, efficacy, and place in therapy. *Core Evid*, 14, 51-70. doi:10.2147/ce.S217848



- Jayasena, S. D.** (1999). Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem*, 45(9), 1628-1650.
- Jesinger, R. A.** (2014). Breast anatomy for the interventionalist. *Tech Vasc Interv Radiol*, 17(1), 3-9. doi:10.1053/j.tvir.2013.12.002
- Kalra, P., Dhiman, A., Cho, W. C., Bruno, J. G., & Sharma, T. K.** (2018). Simple Methods and Rational Design for Enhancing Aptamer Sensitivity and Specificity. *Front Mol Biosci*, 5, 41. doi:10.3389/fmolb.2018.00041
- Kashyap, D., Pal, D., Sharma, R., Garg, V. K., Goel, N., Koundal, D., . . . Belay, A.** (2022). Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *Biomed Res Int*, 2022, 9605439. doi:10.1155/2022/9605439
- Kohlberger, M., & Gadermaier, G.** (2022). SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. *Biotechnol Appl Biochem*, 69(5), 1771-1792. doi:10.1002/bab.2244
- Komarova, N., & Kuznetsov, A.** (2019). Inside the Black Box: What Makes SELEX Better? *Molecules*, 24(19). doi:10.3390/molecules24193598
- Krishnamurti, U., & Silverman, J. F.** (2014). HER2 in breast cancer: a review and update. *Adv Anat Pathol*, 21(2), 100-107. doi:10.1097/pap.0000000000000015
- Kumar, P., & Aggarwal, R.** (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*, 293(2), 247-269. doi:10.1007/s00404-015-3859-y
- Li, L., Wan, J., Wen, X., Guo, Q., Jiang, H., Wang, J., . . . Wang, K.** (2021). Identification of a New DNA Aptamer by Tissue-SELEX for Cancer Recognition and Imaging. *Anal Chem*, 93(19), 7369-7377. doi:10.1021/acs.analchem.1c01445
- Liu, Z., Duan, J. H., Song, Y. M., Ma, J., Wang, F. D., Lu, X., & Yang, X. D.** (2012). Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells in vitro. *J Transl Med*, 10, 148. doi:10.1186/1479-5876-10-148
- Mamidi, S., Cinci, M., Hasmann, M., Fehring, V., & Kirschfink, M.** (2013). Lipoplex mediated silencing of membrane regulators (CD46, CD55 and CD59) enhances complement-dependent anti-tumor activity of trastuzumab and pertuzumab. *Mol Oncol*, 7(3), 580-594. doi:10.1016/j.molonc.2013.02.011
- Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., . . . Ardizzoni, A.** (2008). Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 26(11), 1789-1796. doi:10.1200/jco.2007.14.8957
- Nahta, R., & Esteva, F. J.** (2006). Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett*, 232(2), 123-138. doi:10.1016/j.canlet.2005.01.041
- Nahta, R., Hung, M. C., & Esteva, F. J.** (2004). The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. *Cancer Res*, 64(7), 2343-2346. doi:10.1158/0008-5472.can-03-3856



- Nordstrom, J. L., Gorlatov, S., Zhang, W., Yang, Y., Huang, L., Burke, S., . . . Bonvini, E.** (2011). Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fcγ receptor binding properties. *Breast Cancer Res*, *13*(6), R123. doi:10.1186/bcr3069
- Onsum, M. D., Geretti, E., Paragas, V., Kudla, A. J., Moulis, S. P., Luus, L., . . . Hendriks, B. S.** (2013). Single-cell quantitative HER2 measurement identifies heterogeneity and distinct subgroups within traditionally defined HER2-positive patients. *Am J Pathol*, *183*(5), 1446-1460. doi:10.1016/j.ajpath.2013.07.015
- Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., & Ramírez-Valdespino, C. A.** (2022). Subtypes of Breast Cancer. In H. N. Mayrovitz (Ed.), *Breast Cancer*. Brisbane (AU): Exon Publications Copyright: The Authors.; The authors confirm that the materials included in this chapter do not violate copyright laws. Where relevant, appropriate permissions have been obtained from the original copyright holder(s), and all original sources have been appropriately acknowledged or referenced.
- Press, M. F., Sauter, G., Bernstein, L., Villalobos, I. E., Mirlacher, M., Zhou, J. Y., . . . Slamon, D. J.** (2005). Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res*, *11*(18), 6598-6607. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-05-0636
- Provenzano, E., Ulaner, G. A., & Chin, S. F.** (2018). Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin*, *13*(3), 325-338. doi:10.1016/j.cpet.2018.02.004
- Ross, J. S., Slodkowska, E. A., Symmans, W. F., Pusztai, L., Ravdin, P. M., & Hortobagyi, G. N.** (2009). The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*, *14*(4), 320-368. doi:10.1634/theoncologist.2008-0230
- Roxo, C., Kotkowiak, W., & Pasternak, A.** (2019). G-Quadruplex-Forming Aptamers- Characteristics, Applications, and Perspectives. *Molecules*, *24*(20). doi:10.3390/molecules24203781
- Schechter, A. L., Stern, D. F., Vaidyanathan, L., Decker, S. J., Drebin, J. A., Greene, M. I., & Weinberg, R. A.** (1984). The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, *312*(5994), 513-516. doi:10.1038/312513a0
- Scheuer, W., Friess, T., Burtscher, H., Bossenmaier, B., Endl, J., & Hasmann, M.** (2009). Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res*, *69*(24), 9330-9336. doi:10.1158/0008-5472.Can-08-4597
- Schnitt, S. J., & Jacobs, T. W.** (2001). Current status of HER2 testing: caught between a rock and a hard place. *Am J Clin Pathol*, *116*(6), 806-810. doi:10.1309/wmn8-vtr5-dugf-x121
- Sicco, E., Mónaco, A., Fernandez, M., Moreno, M., Calzada, V., & Cerecetto, H.** (2021). Metastatic and non-metastatic melanoma imaging using Sgc8-c aptamer PTK7-recognizer. *Sci Rep*, *11*(1), 19942. doi:10.1038/s41598-021-98828-6
- Siddiqui, S., & Rimm, D. L.** (2010). Pre-analytic variables and phospho-specific antibodies: the Achilles heel of immunohistochemistry. *Breast Cancer Res*, *12*(6), 113. doi:10.1186/bcr2782



- Smolarz, B., Nowak, A. Z., & Romanowicz, H.** (2022). Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers (Basel)*, *14*(10). doi:10.3390/cancers14102569
- Sola, M., Menon, A. P., Moreno, B., Meraviglia-Crivelli, D., Soldevilla, M. M., Cartón-García, F., & Pastor, F.** (2020). Aptamers Against Live Targets: Is In Vivo SELEX Finally Coming to the Edge? *Mol Ther Nucleic Acids*, *21*, 192-204. doi:10.1016/j.omtn.2020.05.025
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F.** (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, *71*(3), 209-249. doi:10.3322/caac.21660
- Swain, S. M., Shastry, M., & Hamilton, E.** (2023). Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nat Rev Drug Discov*, *22*(2), 101-126. doi:10.1038/s41573-022-00579-0
- Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M.** (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*, *27*(1), 27-35. doi:10.1097/pap.0000000000000232
- Tse, C. H., Hwang, H. C., Goldstein, L. C., Kandalaft, P. L., Wiley, J. C., Kussick, S. J., & Gown, A. M.** (2011). Determining true HER2 gene status in breast cancers with polysomy by using alternative chromosome 17 reference genes: implications for anti-HER2 targeted therapy. *J Clin Oncol*, *29*(31), 4168-4174. doi:10.1200/jco.2011.36.0107
- Tuerk, C., & Gold, L.** (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, *249*(4968), 505-510. doi:10.1126/science.2200121
- Vanderhoeven, F., Redondo, A. L., Martinez, A. L., Vargas-Roig, L. M., Sanchez, A. M., & Flamini, M. I.** (2018). Synergistic antitumor activity by combining trastuzumab with retinoic acid in HER2 positive human breast cancer cells. *Oncotarget*, *9*(41), 26527-26542. doi:10.18632/oncotarget.25480
- Vineis, P., & Wild, C. P.** (2014). Global cancer patterns: causes and prevention. *Lancet*, *383*(9916), 549-557. doi:10.1016/s0140-6736(13)62224-2
- Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R.** (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*, *465*(1), 1-14. doi:10.1007/s00428-014-1593-7
- Wang, H., Zhang, Y., Yang, H., Qin, M., Ding, X., Liu, R., & Jiang, Y.** (2018). In Vivo SELEX of an Inhibitory NSCLC-Specific RNA Aptamer from PEGylated RNA Library. *Mol Ther Nucleic Acids*, *10*, 187-198. doi:10.1016/j.omtn.2017.12.003
- Wang, J., Rudzinski, J. F., Gong, Q., Soh, H. T., & Atzberger, P. J.** (2012). Influence of target concentration and background binding on in vitro selection of affinity reagents. *PLoS One*, *7*(8), e43940. doi:10.1371/journal.pone.0043940
- Yeh, I. T., Martin, M. A., Robetorye, R. S., Bolla, A. R., McCaskill, C., Shah, R. K., . . . Gunn, S. R.** (2009). Clinical validation of an array CGH test for HER2 status in breast cancer reveals that polysomy 17 is a rare event. *Mod Pathol*, *22*(9), 1169-1175. doi:10.1038/modpathol.2009.78



Yeoh, T. S., Anna, A., Tang, T. H., & Citartan, M. (2022). Development of an optimization pipeline of asymmetric PCR towards the generation of DNA aptamers: a guide for beginners. *World J Microbiol Biotechnol*, 38(2), 31. doi:10.1007/s11274-021-03209-w

Zhou, J., & Rossi, J. (2017). Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 16(3), 181-202. doi:10.1038/nrd.2016.199

