



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**APTÁMEROS, SU APLICACIÓN EN
CIENCIAS DE LA SALUD**

Autora: Ana María Velasco Calle

Tutora: Beatriz López Ruiz

Convocatoria: Febrero 2018

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	4
2. OBJETIVOS	5
3. METODOLOGÍA	5
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4.1 Diferencias entre aptámeros y anticuerpos	6
4.2 Método SELEX.....	8
4.3 Biosensores. Descripción y funcionamiento.....	11
4.4 Campos de aplicación	13
4.4.1 Aptámeros en el diagnóstico clínico	13
4.4.2 Aptámeros como agentes terapéuticos.....	17
5. CONCLUSIONES	19
6. BIBLIOGRAFÍA.....	19

RESUMEN

Los aptámeros son un grupo de moléculas que presentan interesantes propiedades que les hacen muy atractivos como reactivos analíticos. Ofrecen ventajas frente a otros compuestos, también utilizados con estos fines, como son los anticuerpos o las enzimas, esto explica que su uso clínico y terapéutico esté en auge. Se trata de unas moléculas sencillas de ADN o ARN sintetizadas químicamente mediante el método Selex que interaccionan con la molécula diana formando complejos de alta afinidad y especificidad. Éstas son sólo algunas de las propiedades que tienen y con ello se explica el gran interés que hay en ellos, muchos aptámeros se encuentran en fases clínicas y otros ya en el mercado como es el Macugen para el tratamiento de la Degeneración Macular Asociada a la Edad, DMAE. Son útiles en el diagnóstico clínico, como el aptámero IgE, en el diagnóstico de alergias y en el análisis de alimentos, como el aptámero del bisfenol A, para su determinación en leches.

ABSTRACT

Aptamers are a group of molecules with interesting properties that make them very attractive as analytical reagents. They offer advantages over other compounds, also used for these purposes, such as antibodies or enzymes, which explains why their clinical and therapeutic use is booming. These are simple DNA or RNA molecules synthesized chemically by the Selex method, they interact with the target molecule, forming high affinity and specificity complexes. These are just some of the properties they have which explain the great interest in them, many aptamers are in clinical phases and others already on the market such as the Macugen for the treatment of Age-Related Macular Degeneration, DMAE. They are useful in clinical diagnosis, such as the IgE aptamer in the diagnosis of allergies and in the analysis of foods, such as the bisphenol A aptamer, for its determination in milks.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Desde que aparecieran los aptámeros en 1990 (1), se ha abierto un gran campo de posibilidades a su paso. Los aptámeros se definen como una secuencia sencilla de oligonucleótidos de ADN o ARN, de corta longitud que reconocen moléculas diana. Debido a su sencilla y corta estructura puede plegarse tridimensionalmente con facilidad de forma que su unión a la molécula diana, sea ésta pequeña o un complejo multimérico es muy estable.

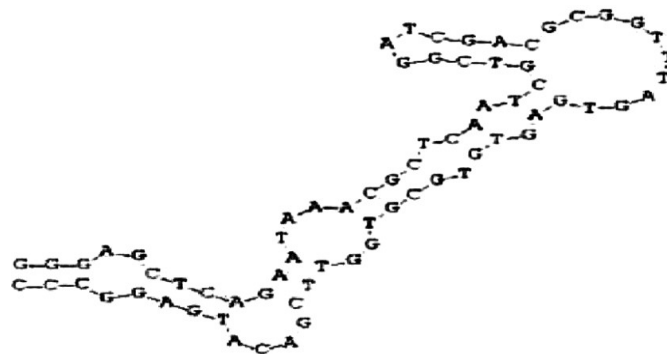


Figura 1. Aptámero. Secuencia de oligonucleótidos. (2)

Las propiedades que se conocen de los aptámeros son muchas, comparten algunas con otros elementos de reconocimiento como pueden ser los anticuerpos, y en otras difieren, como en su naturaleza química o en su método de síntesis, y son estas diferencias las que hacen al aptámero atractivo para la investigación.

Las características principales de los aptámeros son su elevada afinidad y especificidad. La estructura tridimensional que ofrece el aptámero permite que la interacción con la diana sea adecuada y precisa, aumentando así las posibilidades del aptámero. A medida que se avanza en las etapas del procedimiento Selex,- método del que hablaré más adelante- se consigue mejorar y optimizar la selección hasta llegar a un aptámero óptimo.

En la actualidad, los campos de aplicación (3) de los aptámeros son los siguientes:

- Diagnóstico clínico y análisis de alimentos: es un campo relativamente nuevo y los inicios van dirigidos al empleo de aptámeros como elemento de reconocimiento (bioreconocimiento) en diferentes tipos de biosensores. La gran ventaja de utilizar el

aptámero en un biosensor es la alta estabilidad que ofrece debido a su naturaleza química.

- Terapia: la interacción con la molécula diana permite la búsqueda continua de fármacos, aptámeros como fármacos para distintas patologías, en esta línea muchos aptámeros se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos, fase III y alguno ya está comercializado como el Macugen.

- Investigación y biotecnología: debido a la especificidad de la interacción aptámero-diana y a las buenas propiedades de reconocimiento que tienen, surgen diferentes líneas de investigación biotecnológica con aptámeros, cada vez más específicas y precisas, cualquier nueva molécula diana puede ser un objetivo perfecto para la investigación con un aptámero. Los fines, que a día de hoy, se persiguen en investigación con aptámeros son terapéuticos o clínicos en su mayoría pero también hay estudios sobre otros campos, como pueden ser la industria alimentaria- detección de gluten- o la industria agroalimentaria o química.

Todo esto hace que los aptámeros sean de gran interés en el ámbito sanitario, y así mismo explica la revolución que están teniendo, en menos de 30 años son muchos los avances que han generado y es una línea de trabajo cada vez mayor.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre los aptámeros, su procedimiento de selección y obtención y su aplicación en distintos campos, como son el diagnóstico clínico y terapéutica. También se pretende que esta revisión bibliográfica recoja el gran avance que han conseguido los aptámeros en estos años, ya que son secuencias con una vida menor de 30 años y que esto justifique, su situación actual en la analítica clínica.

3. METODOLOGÍA

Esta revisión bibliográfica se realizó mediante varias fuentes. En primer lugar se usó Scopus, una base de datos que recoge citas y revisiones de importantes revistas científicas. Teniendo esto como base, se revisaron diversos artículos de los aptámeros como agentes diagnósticos y terapéuticos.

Otra base de datos consultada fue Scielo (Scientific Electronic Library Online) y se revisaron artículos tanto en español como en inglés. Se realizó una búsqueda de información libre, de lo general a lo específico; aptámero, Selex, biomarcador, patologías...

Además se consultaron páginas como Aptus Biotech y el Laboratorio de Aptámeros del IRYC (Instituto Ramón y Cajal).

Por último se consultó la ficha técnica del Macugen, el único aptámero comercializado y cuya ficha se encuentra en la página web de la Agencia Española del Medicamento.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diferencias entre aptámeros y anticuerpos

A lo largo de la historia, los anticuerpos han permitido grandes avances en los ensayos de diagnóstico y hoy en día son indispensables en las pruebas diagnósticas. Con la llegada del Selex, procedimiento de enriquecimiento exponencial se hizo posible el aislamiento de secuencias de oligonucleótidos capaces de reconocer un amplísimo número de moléculas diana con alta especificidad y afinidad, a estas secuencias se les conoce como aptámeros.

Estas moléculas están empezando a sustituir o rivalizar en muchos procesos clínicos y terapéuticos. Así mismo los ensayos sobre enfermedades nuevas o emergentes están en auge, y los aptámeros, conjugados o no con Ac, puede ser una opción clave en el mercado farmacéutico.

Según Jayasena (4) es necesario realizar una comparativa crítica entre aptámeros y anticuerpos:

- La producción de anticuerpos se realiza en el interior de los animales o células, es decir es un proceso “*in vivo*” dependiente del animal, esto provoca ciertas dificultades. No es un proceso reproducible ya que se ve afectado por la variabilidad interindividual. Por esto, es habitual encontrar variación entre lotes.

Así mismo, la generación de anticuerpos para moléculas que no son bien toleradas en animales, como las toxinas, se hace difícil.

- La identificación y producción de anticuerpos monoclonales es un proceso muy laborioso y puede llegar a ser excesivamente caro en la búsqueda de anticuerpos raros que requieren el cribado de un gran número de colonias.
- La identificación de anticuerpos que podrían reconocer dianas bajo condiciones distintas de las condiciones fisiológicas es inviable. No se pueden modificar los parámetros in vivo, y esto restringe y limita mucho la identificación.
Además los parámetros cinéticos de las interacciones anticuerpo-diana tampoco se pueden cambiar a demanda, por todo esto ofrecen un estrecho margen de variabilidad.
- Los anticuerpos son sensibles a la temperatura y a la desnaturalización, siendo un proceso irreversible. Además tienen una vida útil limitada.

Para satisfacer estas limitaciones y de forma alternativa se pueden considerar los aptámeros. En esta línea, los aptámeros ofrecen las siguientes ventajas:

- La síntesis de aptámeros se realiza in vitro, no es un proceso dependiente de animales o células. Por tanto es un proceso sencillo y reproducible mostrando una alta pureza, se espera poca o ninguna variación entre lotes.
Al no ser un proceso dependiente, toxinas y moléculas que no ofrecen una buena respuesta inmune si pueden formar complejos estables con los aptámeros.
- Las condiciones de selección pueden ser manipuladas, es decir, se pueden obtener aptámeros con las propiedades deseadas para el diagnóstico in vitro. No se tiene que trabajar siempre bajo condiciones fisiológicas, lo mismo sucede con los parámetros cinéticos que se pueden cambiar según se requiera.

- Los aptámeros son sensibles a la desnaturalización, pero el proceso es reversible. Una vez desnaturalizado, la regeneración del aptámero puede ser cuestión de minutos. Son estables a temperatura ambiente y se pueden almacenar a largo plazo.

4.2 Método SELEX

Los aptámeros se obtienen por un método conocido como método SELEX (5), *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment* (Evolución Sistemática de ligandos por Enriquecimiento Exponencial) proceso que nació de la mano de Larry Gold alrededor del año 1990 con el objetivo de obtener oligonucleótidos de una sola cadena que se unan a moléculas diana con elevada especificidad y afinidad.

El punto de partida de este proceso es una biblioteca de oligonucleótidos, fragmentos de ADNss (10^{15} moléculas) que tiene secuencias conocidas fijas en los extremos 5' y 3' y una región central de secuencias al azar. Estas secuencias se sintetizan químicamente mediante métodos en fase sólida añadiendo una mezcla de los cuatro nucleótidos trifosfato de forma aleatoria.

El método SELEX genera una gran cantidad de aptámeros los cuales se pueden aplicar en muchos campos de estudio (industria alimentaria, analítica, clínica...), por tanto tener claro y definido el objetivo (molécula diana, blanco) optimiza el proceso. El siguiente paso en el proceso SELEX, es seleccionar, de esas secuencias aleatorias, cuales se unen de forma selectiva y específica a la molécula diana, X.

La unión aptámero-objetivo se realiza por complementariedad de forma, interacciones electrostáticas entre grupos con carga o enlaces de hidrógeno. Hay grupos que favorecen la interacción, ya sea por volumen, carga eléctrica u otro motivo; y en esta línea, la presencia de grupos amino primarios, donantes de hidrógeno o grupos aromáticos en la molécula diana facilitan la selección del aptámero. Por el contrario, dianas con grupos hidrófobos o cargados negativamente (por ejemplo, grupos fosfatos) dificultan la unión.

En esta etapa de selección del procedimiento SELEX se incluye la unión de las moléculas diana con las secuencias de la biblioteca de oligonucleótidos, la eliminación

de los oligonucleótidos no unidos, y finalmente la elución de los oligonucleótidos ligados. La selección está diseñada para encontrar esas moléculas de entre la gran variedad de secuencias presentes en la biblioteca de oligonucleótidos con la mayor afinidad y especificidad para la molécula diana de interés, por eso se realizan entre 6-10 ciclos. Por lo tanto, la biblioteca de oligonucleótidos está expuesta directamente a la diana y se incuba durante un determinado tiempo. La interacción entre la diana y los oligonucleótidos dependerá de muchos factores, y en particular de cuál sea el objetivo, es decir para el fin al que se destine ese aptámero.

La separación entre complejos unidos y secuencias libres tiene que ser muy eficaz, existen dos posibilidades; con inmovilización de la molécula diana, o sin inmovilización. En el primer caso, se pueden usar técnicas como la cromatografía de afinidad que incluye a la molécula diana en una matriz de agarosa o sefarosa en columna en grandes cantidades, o mejor, el uso de perlas magnéticas que necesita menos cantidad de diana y el manejo es más sencillo. Sin embargo, sin necesitar el inmovilizado de la diana existen procesos como: la ultrafiltración con filtros de nitrocelulosa, electroforesis capilar o citometría de flujo.

Un parámetro que mide la afinidad de la unión es la K_{re} (constante de disociación), cuanto más baja sea mayor afinidad por la diana muestra el aptámero.

El proceso continúa con la eliminación de las secuencias no unidas mediante lavados rigurosos y los complejos formados se eluyen de la molécula diana para repetir nuevamente el ciclo SELEX. La elución se puede llevar a cabo con procesos desnaturizantes como el tratamiento térmico o por la adición de sustancias especiales como urea, SDS o EDTA.

Finalmente hay una etapa de amplificación para tener suficientes secuencias para los fines a los que se destine. En esta línea, los procesos de SELEX para la generación de aptámeros de ARN y ADN difieren significativamente. En el caso de ARN es más complejo, los oligonucleótidos de ARN primero tienen que someterse a una PCR de transcripción inversa (RT-PCR). Como resultado, se obtiene el ADN complementario, cADN correspondiente, que posteriormente se amplifica en una PCR. Por el contrario, los aptámeros de ssDNA simplemente tienen que amplificarse mediante PCR, donde se pueden usar cebadores especiales para proporcionar a los aptámeros propiedades adicionales.

Se utiliza el sistema estreptavidina/ biotina de varias formas. Algunos analíticos añaden la biotina a la hebra no deseada y utilizan la diferencia de tamaños que surge en la electroforesis en gel para distinguir entre ambas hebras, y otros permiten al dsDNA (sólo una hebra biotinilada) que se añada a la estreptavidina (placas o perlas) y se separan tras la desnaturalización del DNA.

Con todo este proceso, la complejidad de la biblioteca inicial se reduce y los candidatos “target-binding” se enriquecen enormemente. El número de ciclos necesarios para el enriquecimiento óptimo es variable ya que depende de varios factores: el lugar al que se destina y su concentración, las condiciones de selección, la proporcionalidad de oligonucleótidos-molécula diana, la eficacia del paso de división... Cuando el enriquecimiento de la biblioteca no pueda ser mayor, generalmente- después de 6-20 rondas de selección- se determinan las secuencias de nucleótidos individuales, secuenciación y clonación.

Así mismo, se pueden realizar modificaciones Post-SELEX con el fin de aumentar la estabilidad de los aptámeros y optimizar los parámetros de unión a la diana.



Figura 2: Esquema del método Selex. (6)

4.3 Biosensores. Descripción y funcionamiento

Un biosensor se define según la IUPAC (7) como “dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico o biomimético, íntimamente asociado a un transductor fisicoquímico que en presencia del analito produce una señal eléctrica discreta o de carácter continuo, proporcional a la cantidad presente del mismo”. Las características de estos dispositivos que hacen que sean de gran interés analítico son: alta sensibilidad, especificidad y a su vez la capacidad de respuesta en corto tiempo, la posibilidad de automatización y el bajo coste del dispositivo.

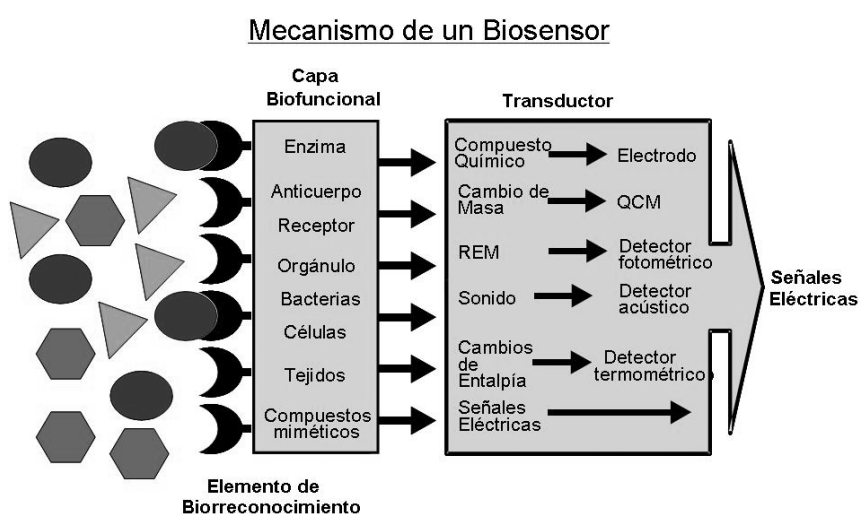


Figura 3. Mecanismo del funcionamiento un biosensor (7)

Para después entender la aplicación de los biosensores en el diagnóstico clínico, haremos una revisión general sobre los integrantes de un biosensor. En términos generales, los elementos integrantes de un biosensor son: el elemento de biorreconocimiento, el transductor y el sistema electrónico.

- Elemento de bioreconocimiento

Una gran cantidad de moléculas pueden ser utilizadas como elementos de bioreconocimiento (7); desde las más simples, las enzimas hasta los anticuerpos y secuencias de ADN, incluso las moléculas más novedosas en ingeniería genética como son los aptámeros, moléculas de reciente incorporación en el diagnóstico clínico y como agentes terapéuticos.

Son muchas las moléculas que se pueden utilizar como elemento de reconocimiento en un biosensor, pero todas tienen que cumplir unas características determinadas:

- **Selectividad**; tiene que ser discriminatorio, reconocer a la molécula diana en presencia de otros compuestos.
- Elevada **afinidad** por la molécula diana de reconocimiento.
- **Estable** a lo largo del tiempo.

-Inmovilización

El sistema de inmovilización (7) del elemento de biorreconocimiento sobre el transductor es un procedimiento necesario para estos dispositivos, el receptor tiene que estar en íntimo contacto con el transductor. La inmovilización del elemento biológico (biorreconocimiento) no puede modificar las características de reconocimiento del mismo, se tiene que preservar su integridad garantizando sus propiedades catalíticas si las tiene (si fuera por ejemplo una enzima) o bien, si fuera un biosensor de afinidad hay que proteger el sitio de interacción con el analito.

Al igual que los elementos de biorreconocimiento, el sistema de inmovilización puede variar desde métodos muy sencillos como la adsorción física sobre la superficie sensora, hasta procesos más complejos como el atrapamiento en el interior de matrices poliméricas o la unión covalente.

-Sistemas de transducción

Finalmente se necesita un dispositivo que transforme en señal eléctrica la reacción de biorreconocimiento entre analito-bioelemento. (8)

Existen muchos tipos de transductores que pueden emplearse en la fabricación de biosensores, como transductores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, térmicos, etc.

Teniendo claro lo anterior, el funcionamiento de un biosensor y el empleo de aptámeros en ellos está en auge. El avance en los últimos años es inmenso, tanto es así que hay aplicaciones en el diagnóstico clínico que están siendo de gran interés.

4.4 Campos de aplicación

4.4.1 Aptámeros en el diagnóstico clínico

En este campo aún falta mucho trabajo, se ha dado algún paso importante como la descripción de un sensor proteómico basado en aptámeros que a partir de una mínima muestra de sangre determina alrededor de 815 proteínas distintas(6). La importancia y efectividad clínica de ese sensor se demostró en la función e implicación clínica de esas proteínas en un fallo renal crónico y cáncer de pulmón. En el presente trabajo se describirá, a modo de ejemplo, un aptasensor de aplicación clínica para la detección del Anti-IgE.

Aptámero Anti-IgE

En los procesos alérgicos hay una inmunoglobulina muy implicada, la IgE; este tipo de anticuerpo se encuentra elevado en procesos alérgicos, es por ello que es un potente identificador de éstos. La determinación de los valores de IgE para diferenciar a las personas alérgicas de aquellas sanas se ha llevado a cabo durante mucho tiempo por técnicas convencionales como ELISA, o RIA (Radioinmunoanálisis), pero estas técnicas son muy caras y requieren mucho tiempo. Por tanto, bajo la intención de mejorar estos problemas, Yao y col. (9) propusieron un aptasensor que en 15 minutos mide los niveles de IgE, de forma muy específica y reproducible.

Este biosensor utiliza una microbalanza de cuarzo en la que se encuentra el aptámero anti-IgE, el cual ha tenido que ser inmovilizado previamente. El aptámero reconoce a la IgE en solución (suero), y el sistema de transducción del biosensor cuantifica esta unión.

Esta alternativa de identificación con aptámeros supone un gran cambio, ya que los anticuerpos siguen siendo las principales moléculas de bioreconocimiento; pero la capacidad de mejorar en tiempo y en coste se refleja en que cada vez hay más publicaciones sobre aptasensores en diferentes campos de interés.

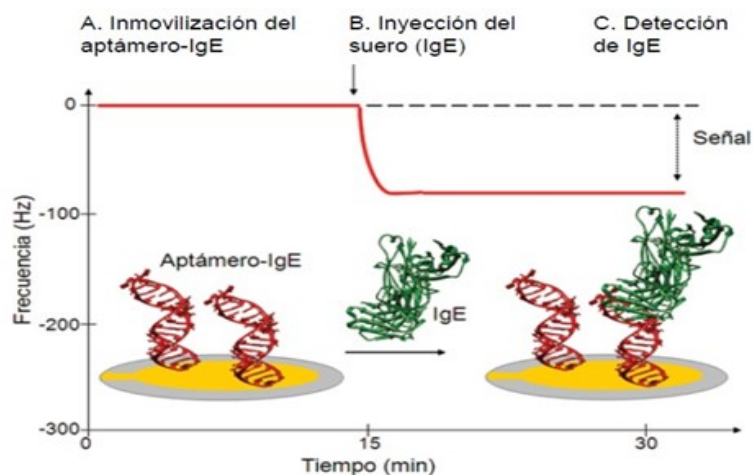


Figura 4. Mecanismo de acción del aptámero anti-IgE(6)

El funcionamiento de un biosensor basado en la microbalanza de cristal de cuarzo (10) se debe a la capacidad del último para variar su frecuencia de resonancia en consonancia con las variaciones de densidad superficial de masa depositada en la superficie del resonador. Por tanto, un cristal de cuarzo puede ser utilizado como un transductor en un sistema de afinidad, en este caso, como se observa en la Figura 4 se inmoviliza el aptámero en la película de oro y la microbalanza presenta una determinada frecuencia, cuando se añade la molécula diana (IgE) presente en la muestra, se forma el complejo aptámero-diana y la frecuencia disminuye, como se observa en la figura, la magnitud de este descenso de frecuencia está relacionada con la concentración de molécula diana en la muestra.

4.4.2. Aptámeros en el análisis de alimentos

Bisfenol A

El bisfenol A (BPA) es un compuesto orgánico muy utilizado en la industria del plástico; y los productos de plástico están ampliamente distribuidos y son de fácil acceso para la población, se le relaciona con una reducción de la función inmune así como un aumento en la tasa de cáncer y por ello surge la necesidad de cuantificar de forma sensible y precisa la cantidad de BPA en estos productos. Esta cuantificación se ha desarrollado por métodos convencionales (HPLC, LC, GC e inmunoensayo) pero son procesos caros y costosos, y la alternativa de usar sensores electroquímicos basados en aptámeros ofrece una excelente sensibilidad, rápida respuesta, simplicidad y bajo coste.

Se trata de un electrodo de carbón vitrificado basado en la medida de la oxidación/reducción del ferricianuro potásico (11). Cuando se añade el analito, se forma el complejo aptámero-analito y al ferricianuro le cuesta más llegar al electrodo para reducirse, hay mayor resistencia a la transferencia de carga (electrones) y cuanto más analito hay, más complejo se forma y más difícil resulta la transferencia de carga, es decir, la transferencia de electrones, que es necesaria para que se produzca el proceso redox del ferricianuro/ferrocianuro.

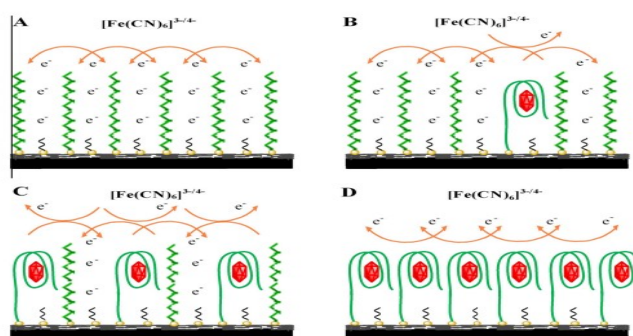
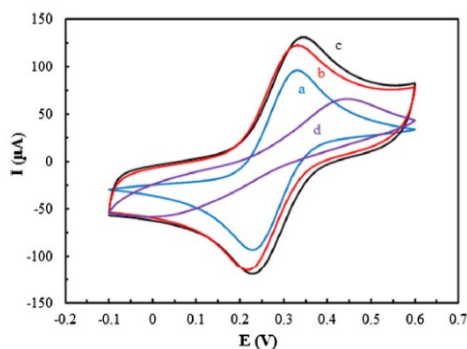


Figura 5. Esquema del diseño del aptasensor para la determinación de BPA. (A); en ausencia de BPA existen ‘camino abierto’ que permiten la transferencia de electrones, (B) la adición de bajas concentraciones de BPA hacen que algunos de estos caminos se cierren al formarse el conjugado aptámero-BPA y cambiar la conformación del aptámero, (C) al aumentar la cantidad de BPA se cierran más caminos y (D) a mayores concentraciones casi todos los caminos se cierran.(11)

Figura 6. Voltametrías cíclicas de disoluciones acuosas que contienen $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 5.0 mM y KCl 0.1 M. Velocidad de barrido 50 mV/s.(11)



Con el objetivo de mejorar la sensibilidad de los aptasensores electroquímicos, se utiliza una variedad de materiales para modificar el electrodo. El propósito es aumentar la superficie electrodo y así aumentar la señal. En el proceso redox del ferricianuro observado en la Figura 6, se muestra este aumento de superficie electrónica a medida que se va modificando el electrodo de carbón vitrificado (curva a). Cuando se modifica el electrodo con grafito reducido (GR), (curva b) la señal aumenta debido a su gran superficie específica, alta conductividad térmica y eléctrica, gran resistencia mecánica. Cuando se modifica con GR y nanopartículas de oro (PNB/GR), (curva c) para mejorar la detección ya que este tipo de material puede generar sinergia en propiedades

electroquímicas y de este modo mejorar la sensibilidad de los sensores. Y finalmente, cuando se inmoviliza el aptámero (curva d), el ferricianuro tiene más dificultad para llegar al electrodo y la corriente disminuye, en este caso no sólo por el impedimento estérico que produce el aptámero, sino también por la carga negativa de los grupos fosfato procedentes de las bases del aptámero, que dan lugar a una repulsión electrostática en el ferricianuro dificultando su acceso al electrodo. Si se realiza un barrido de voltametría cíclica una vez añadido el analito, bisfenol A, la intensidad de corriente sería aún menor, por la mayor dificultad del ferricianuro para acceder al electrodo.

Así, observamos en la Figura 7 como la corriente de oxidación y de reducción del ferricianuro disminuye a medida que aumenta la concentración de BPA (A). En dicha figura se muestran las curvas de voltametría de impulsos (Fig. 7.A) y la relación entre la señal y la concentración de BPA (Fig. 7.B). Por último se examina la especificidad del aptasensor, en la Figura 7.C se muestra la respuesta del mismo al analito BPA y a posibles interferentes como bisfenol B (BPB), 6F bisfenol A (6F-BPA) y 4,4'-bifenol (BP), solo el BPA dio una señal significativa, mientras que la señal de los interferentes fue semejante a la del blanco.

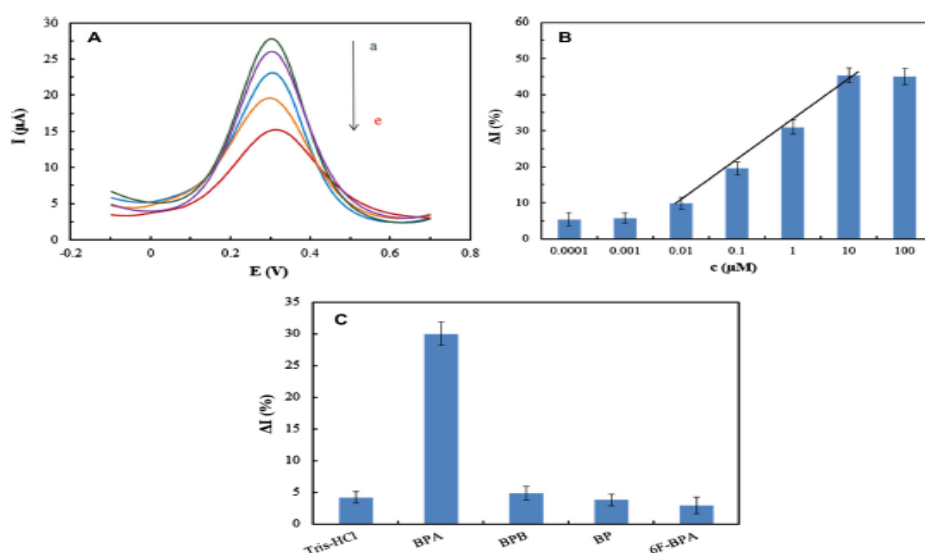


Figura 7. (A) Curvas de voltametría de impulsos del aptasensor incubado con cantidades crecientes de BPA (a-e: concentraciones de BPA de 0-0,01-0,1-1 y 10 µM). (B) Relación lineal entre el cambio de la corriente de pico (ΔI) y la concentración de BPA. (C) Especificidad del aptasensor para 1,0 µM de BPA, comparación con agentes interferentes que incluyen BPB, BP y 6F-BPA. Las

barras de error muestran la desviación estándar de las cinco medidas realizadas en cada caso.(11)

4.4.2. Aptámeros como agentes terapéuticos

Con el paso del tiempo, las aplicaciones de los aptámeros han sufrido grandes avances. En terapéutica (12), se persigue su aplicación en enfermedades hematológicas, cáncer y VIH, entre otras. Como se observa en la Tabla 1 muchos se encuentran todavía en fase clínica, y a día de hoy sólo uno se encuentra comercializado, el Macugen (Pegaptanib-sódico).

Aptámero	Molécula diana	Uso/Indicación	Fase clínica
Pegaptanib -sódico (Macugen*)	VEGF ₁₆₅	Degeneración macular asociada a la edad (DMAE) Retinopatía diabética Oclusión de la vena retiniana	Aprobado Fase III Fase II
ARC1779 (Archemix)	Factor von Willebrand	Microangiopatía trombótica	Fase II
E10030 (Ophthotech)	PDGF-B	DMAE	Fase II
AS1411 -AGRO001 (Antisoma - Archemix)	Nucleolin	Leucemia mielóide aguda	Fase II
REG-1 - RB006/RB007 (Regado Bioscience)	Factor IXa	Intervención coronaria percutánea	Fase II
NU172 (ARCA Biopharma)	Trombina	Cirugía de derivación de las arterias coronarias	Fase II
ARC1905 (Ophthotech)	C5	DMAE	Fase I
NOX-A12 (NOXXON Pharma)	SDF-1 α	Linfoma	Fase I
NOX-E36 (NOXXON Pharma)	CCL2	Diabetes tipo 2 y nefropatía diabética	Fase I

Figura 5. Tabla de los aptámeros en fase clínica (6)

Macugen

Pegaptanib sódico es el único aptámero comercializado para el tratamiento de la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE). La fisiopatología de esta enfermedad consiste en un deterioro de la mácula, la cual es una capa de tejido sensible que se encuentra en el centro de la retina y que es sensible a la luz. Es esta mácula la que aporta la agudeza, precisión y nitidez ocular, por tanto un daño en ella deteriora la visión.

Esta degeneración (13) puede ser en uno o ambos ojos y es un deterioro irreversible. Se asocia con la vejez, a partir de los 65 años y existen 2 formas de presentarse: seca o húmeda. La forma seca o atrófica es más común y menos peligrosa y se desarrolla con una pérdida de visión lenta; sin embargo, la forma húmeda o exudativa es poco común pero mucho más agresiva. Cursa con un proceso de angiogénesis, en el que se generan

nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes, y provocan una grave afectación de la retina.

En este entorno aparece Pegaptanib, para el tratamiento de la DMAE en forma exudativa, la opción más agresiva. Anterior a este aptámero se realizaba cirugía láser o fármacos antiangiogénicos (14) para evitar este crecimiento anormal de nuevos vasos, como por ejemplo el Ranibizumab, que es un fragmento de anticuerpo monoclonal recombinante humanizado dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) humano.

La llegada de este aptámero supuso un nuevo campo de investigación, ya que el mecanismo de acción es diferente a los anteriores. El Pegaptanib actúa sobre el VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) en su isoforma 165, es decir en una forma de presentación de esta proteína. EL VEGF es una proteína que interviene en la angiogénesis así como en la permeabilidad capilar. Con una mayor comprensión de la patología y el papel del VEGF en ella es más fácil entender que el Pegaptanib, un aptámero de ARN de 28 oligonucleótidos unido covalentemente a dos brazos ramificados 20 kD de PEG (Polietilenglicol) se une y bloquea la actividad de VEGF extracelular, en concreto de VEGF 165 (13). La unión se basa en la adopción del aptámero de una conformación lo suficientemente plegada para una interacción con alta afinidad, así mismo para aumentar la vida media del aptámero en la retina se añade los restos de polietilenglicol al esqueleto de Pegaptanib y con esta modificación se proporciona mayor resistencia al ataque de endonucleasas endógenas y exógenas (13). De esta forma se paraliza la angiogénesis provocada por el VEGF y con ello se evita la pérdida de agudeza visual.

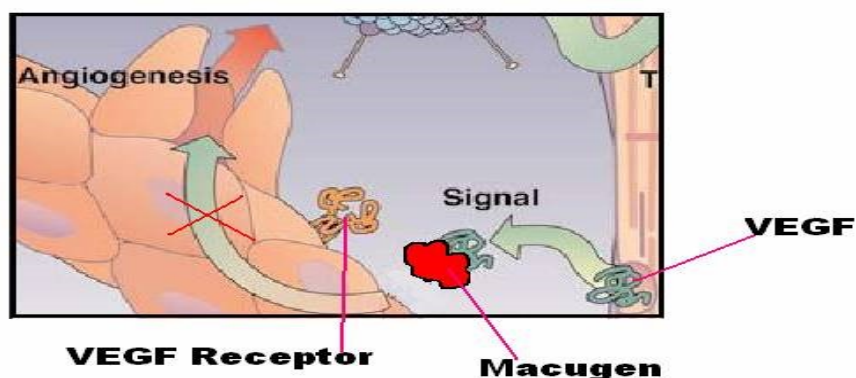


Figura 6. Mecanismo de acción del Macugen

5. CONCLUSIONES

- Los aptámeros son reactivos biológicos de afinidad, que ofrece grandes posibilidades en las ciencias de la Salud como la Química clínica, Farmacología, etc.
- Presentan numerosas ventajas frente a los anticuerpos como son: su naturaleza química, la capacidad de manipulación que ofrecen, la desnaturalización reversible y su estabilidad a temperatura ambiente.
- Su método de obtención, el Método Selex, es un procedimiento de alta selectividad y especificidad. Es un proceso preciso y específico con un balance coste/efectividad favorable.
- El cambio del anticuerpo por el aptámero como elemento de bioreconocimiento en los biosensores ofrece grandes ventajas entre las que destacan: su estabilidad a largo plazo, su especificidad y el poder discriminatorio de reconocer la diana en presencia de otras moléculas. El avance se observa también en el diagnóstico clínico; como la detección de IgE en procesos alérgicos o en el análisis de alimentos, con el uso del aptasensor de bisfenol A.
- Son muchos los aptámeros que se encuentran en estudio, en distintas fases del ensayo clínico para diferentes patologías; y uno, el Macugen, ya se encuentra comercializado para el tratamiento de la DMAE con muy buenos resultados y una alta eficacia.
- Cada día hay más información, más artículos, más aplicaciones sobre ellos, actualmente también existen aptámeros en otros campos como puedan ser el agroalimentario o la industria química. Cada vez son más las empresas o industrias interesadas en ellos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Ellington A, Szostak J. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature. 1990; 346(6287):818–822
2. Aptámeros - IBIAN Technologies [Internet]. IBIAN Technologies. 2017 [consultado 17 de Diciembre 2017]. Disponible en: <https://www.ibiantech.com/aptameros/>
3. ¿Qué son los aptámeros?- AptusBiotech [Internet]. Aptusbiotech.com.2017 [consultado 15 de Enero 2018]. Disponible en: <https://aptusbiotech.com/tecnologia>

4. Jayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical Chemistry*. 1999;45(9):1628–1650
5. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—A(r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*. 2007; 24(4):381–403
6. Hernández FJ, Botero JA. Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. *Iatreia* 2012. 2:159-168
7. Ortega F. Biosensores y biochips: herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. *Real Academia Española de Farmacia* 2006: 8-148
8. Mairal T, Ozalp VC, Lozano Sánchez P, Mir M, Katakis I, O'Sullivan CK. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008;390(4):989–1007.
9. Yao C, Qi Y, Zhao Y, Xiang Y, Chen Q, Fu W. Aptamerbased piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009;24(8):2499–2503.
10. Montagut Y, García J, Jimenez Y, March C, Montoya A, Torres R, Arnau A. Oscillator for Biosensors based on Quartz Crystal Microbalance (QCM). *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* 2011. N° 61 pp: 160-168
11. Zhou L, Wang J, Li D, Li Y. An electrochemical aptasensor based on gold nanoparticles dotted grapheme modified glassy carbon electrode for label-free detection of bisphenol A in milk samples. *Food Chemistry*. 2014;162: 34-40
12. Keefe A, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010; 9(7):537–550
13. Ng E, Shima D, Calias P, Cunningham E, Guyer D, Adamis A. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006;5(2):123–132
14. Yuan A, Kaiser P. Emerging therapies for the treatment of neovascular age related macular degeneration. *Seminars in Ophthalmology*. 2011; 26(3):149–155