



APTÁMEROS, SU APLICACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD

Autora: Ana María Velasco Calle

Universidad Complutense de Madrid, Febrero 2018

INTRODUCCIÓN

En 1990 aparecieron los aptámeros, secuencias sencillas de oligonucleótidos de ADN o ARN, de corta longitud que reconocen moléculas diana.

Los aptámeros se caracterizan principalmente por su elevada afinidad y especificidad. Estas propiedades les convierten en reactivos de afinidad muy útiles en el diseño de biosensores y bioensayos y en el diseño de nuevos fármacos.

Aplicaciones:

Diagnóstico clínico

Terapia e investigación

Biocología

OBJETIVOS

1. Revisión bibliográfica sobre los aptámeros, su procedimiento de selección y obtención
2. Estudio sobre las aplicaciones de los aptámeros, en el diagnóstico clínico y en terapéutica.

METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda bibliográfica (Nov/17-Ene/18) a partir de:

- Las bases de datos SCOPUS, SCIELO usando como palabras clave: aptámero, Selex, biomarcador, patologías
- Diversos artículos científicos sobre los aptámeros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DIFERENCIAS ENTRE APTÁMEROS Y ANTICUERPOS

	APTÁMEROS	ANTICUERPOS
VENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> - Producción sencilla y reproducible - Pueden ser modificados para incrementar su estabilidad frente a nucleasas (ácidos nucleicos modificados) y también para aumentar su tamaño (pegilación) y evitar la rápida filtración renal - Pueden ser desnaturalizados y utilizados repetidamente - Pueden ser seleccionados en condiciones fisiológicas y no fisiológicas - No son inmunogénicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Son las moléculas más ampliamente usadas en terapia y diagnóstico clínico - Su tamaño (~150 Kda) reduce su eliminación mediante filtración renal, y generalmente su vida media es suficiente para la acción terapéutica - Son muy estables en condiciones fisiológicas, no presentan degradación por nucleasas - Pueden producirse sin pago de propiedad intelectual
DESVENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> - Su aplicación clínica está en los primeros pasos - Por su tamaño (5-20 Kda) son eliminados rápidamente por filtración renal, generalmente se requieren modificaciones para alcanzar niveles terapéuticos - Son degradados por nucleasas en ambientes fisiológicos, generalmente deben ser modificados para uso clínico - SELEX es un método patentado que requiere pago de propiedad intelectual para uso comercial 	<ul style="list-style-type: none"> - Producción dependiente de animales o células (variabilidad en cada lote) - Su modificación genera en muchos casos reducción o pérdida de su capacidad de reconocimiento - Cualquier episodio de desnaturalización generalmente reduce o anula su capacidad de reconocimiento - Solo pueden ser seleccionados en condiciones fisiológicas - La inmunogenicidad es un problema asociado al uso de anticuerpos

MÉTODO SELEX

La unión puede ser por complementariedad de forma, interacciones electrostáticas entre grupos con carga o enlaces de hidrógeno

Grupos que favorecen la unión	Grupos que dificultan la unión
Grupos aminos primarios	Grupos hidrófobos
Donantes de hidrógeno	Grupos con carga negativa

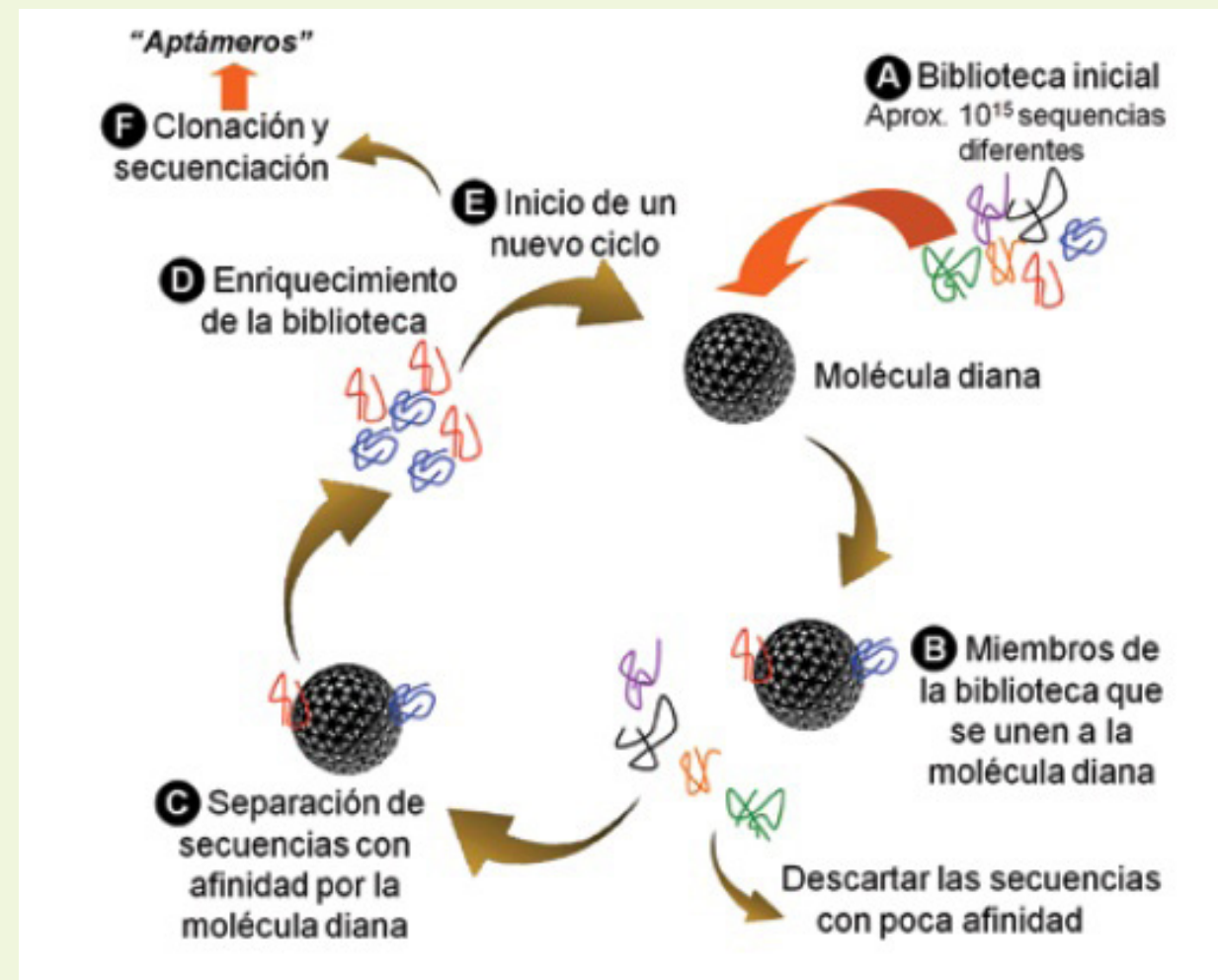
La separación puede ser con o sin inmovilización de la molécula

▼ Kre* ▲ Afinidad por la diana

6-20 ciclos de selección

La amplificación es diferente si se trata de un aptámero ADN o ARN.

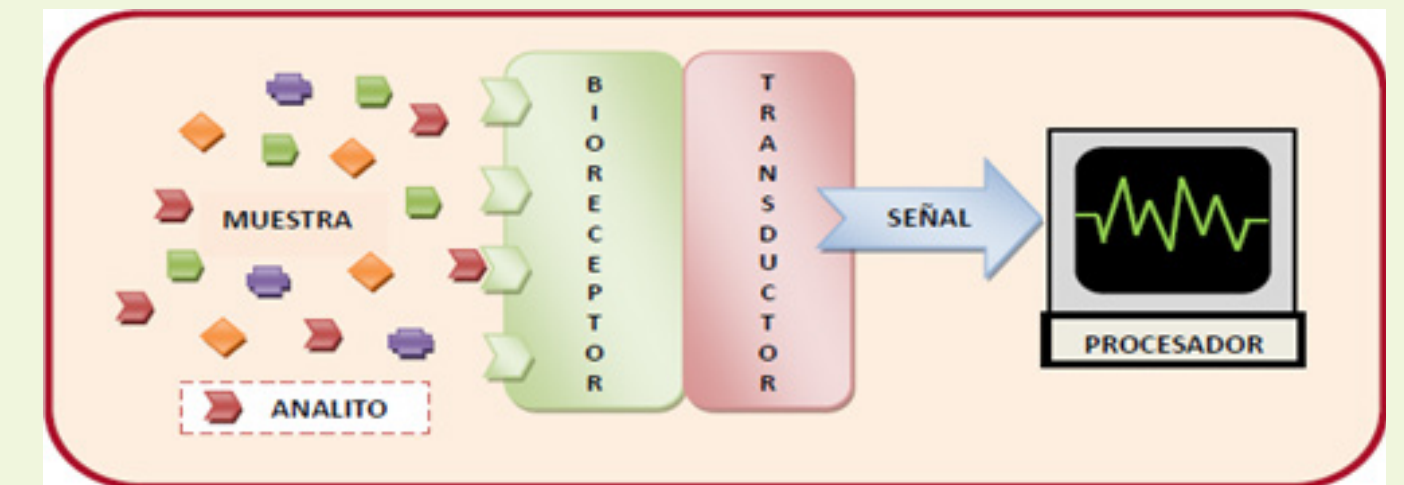
*Kre - Constante de disociación del complejo



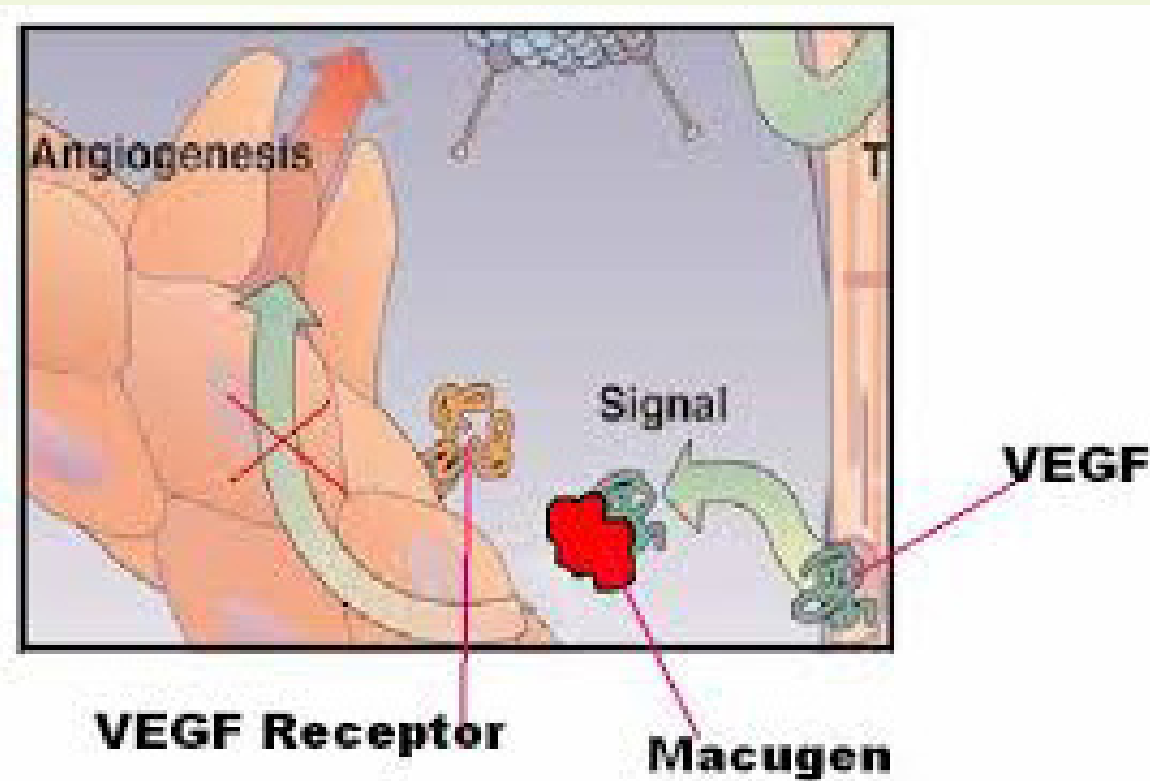
BIOSENSORES

Son dispositivos analíticos que constan de un transductor y elemento biológico de reconocimiento, en íntimo contacto. El analito interacciona con el bioreceptor y el transductor transforma el resultado de esa interacción en una señal. Esta señal está relacionada con la concentración del analito en la muestra. El elemento de bioreconocimiento se inmoviliza sobre el transductor. La estrategia de inmovilización debe ser cuidadosamente elegida para:

- Preservar la integridad del bioreceptor
- No modificar las características del mismo
- Permitir la interacción con el analito



Aptámeros en terapéutica

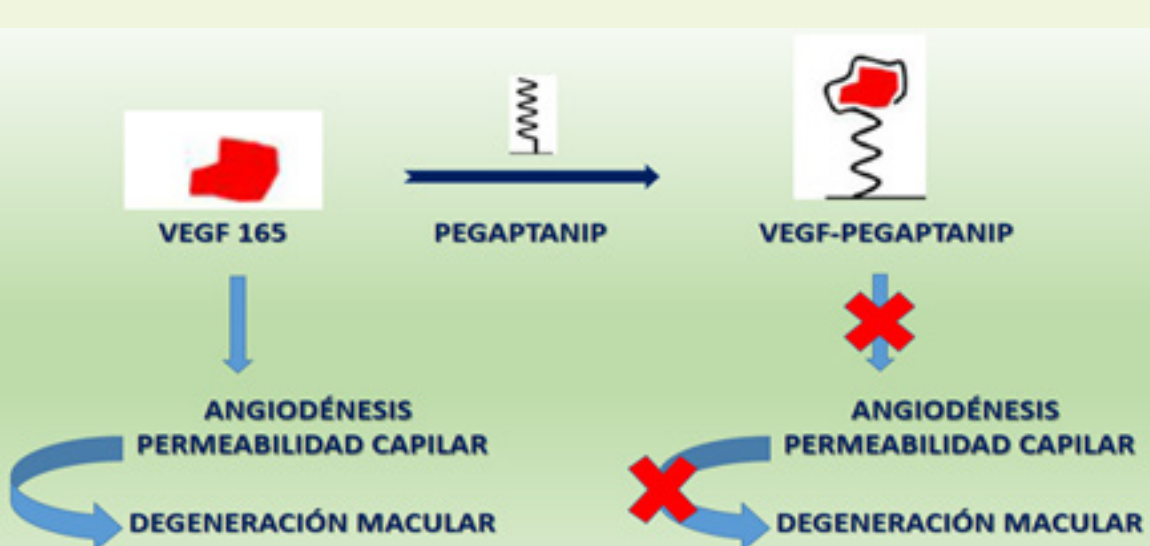


Macugen

- Pegaptanib: aptámero de ARN de 28 oligonucleótidos
- Unido de forma covalente a 2 brazos ramificados 20kD de PEG

- Comercializado para el tratamiento de la DMAE

Mecanismo de acción:



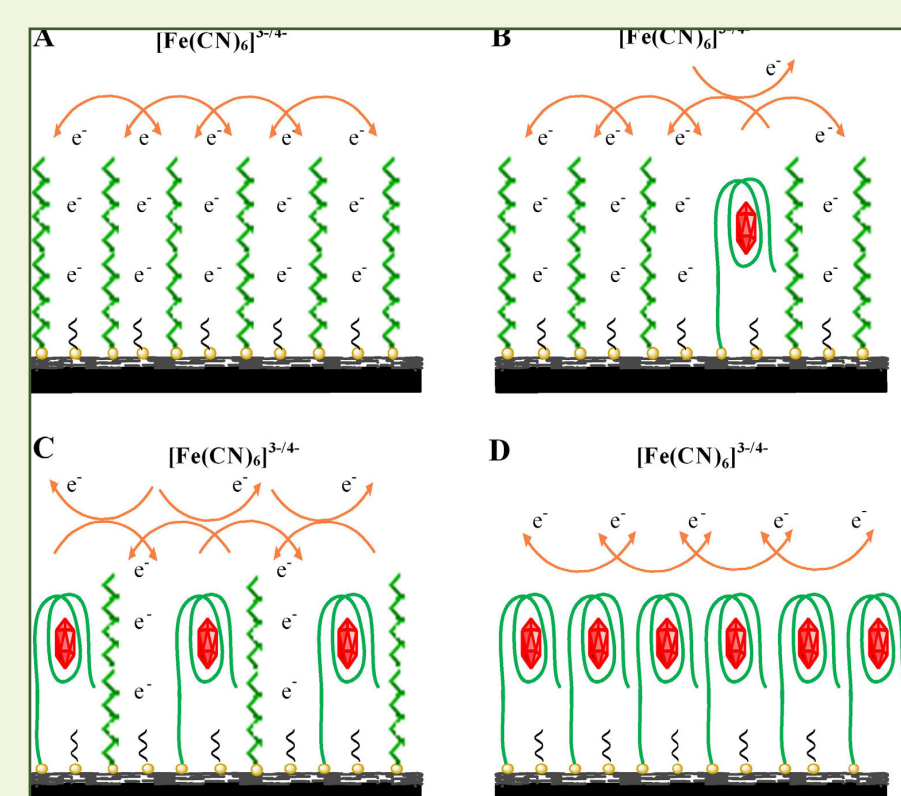
Aptámeros en el diagnóstico clínico

Aptámero Anti IgE

- Situaciones alérgicas: ▲ IgE → Potente detector
- Método de detección: aptasensor piezoeléctrico, con microbalanza de cuarzo, y el aptámero-IgE inmovilizado. El aptámero interacciona con la IgE presente en la disolución (suero) y se observa un cambio en la frecuencia de la microbalanza proporcional a la concentración de IgE.

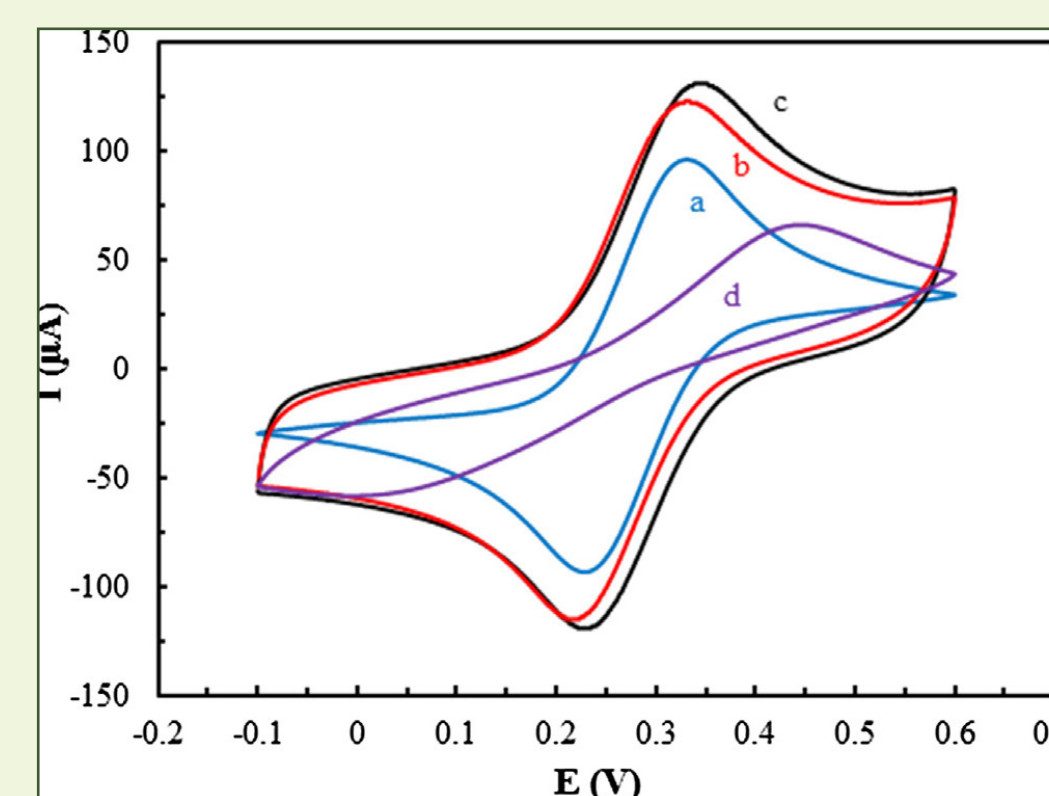
Bisfenol A

- Compuesto orgánico muy utilizado en la industria del plástico
- Posibles consecuencias: ▲ Tasa de cáncer y ▼ función inmune
- Necesidad de cuantificar la cantidad de BPA



Diseño del aptasensor para la determinación de BPA.

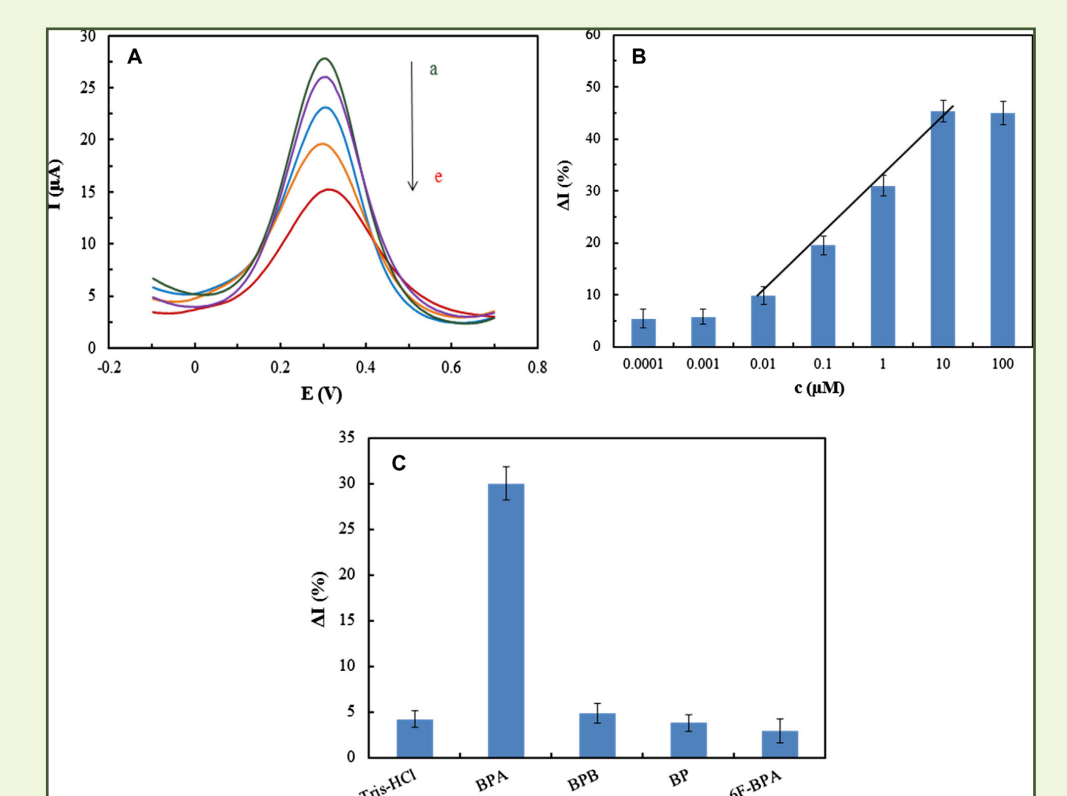
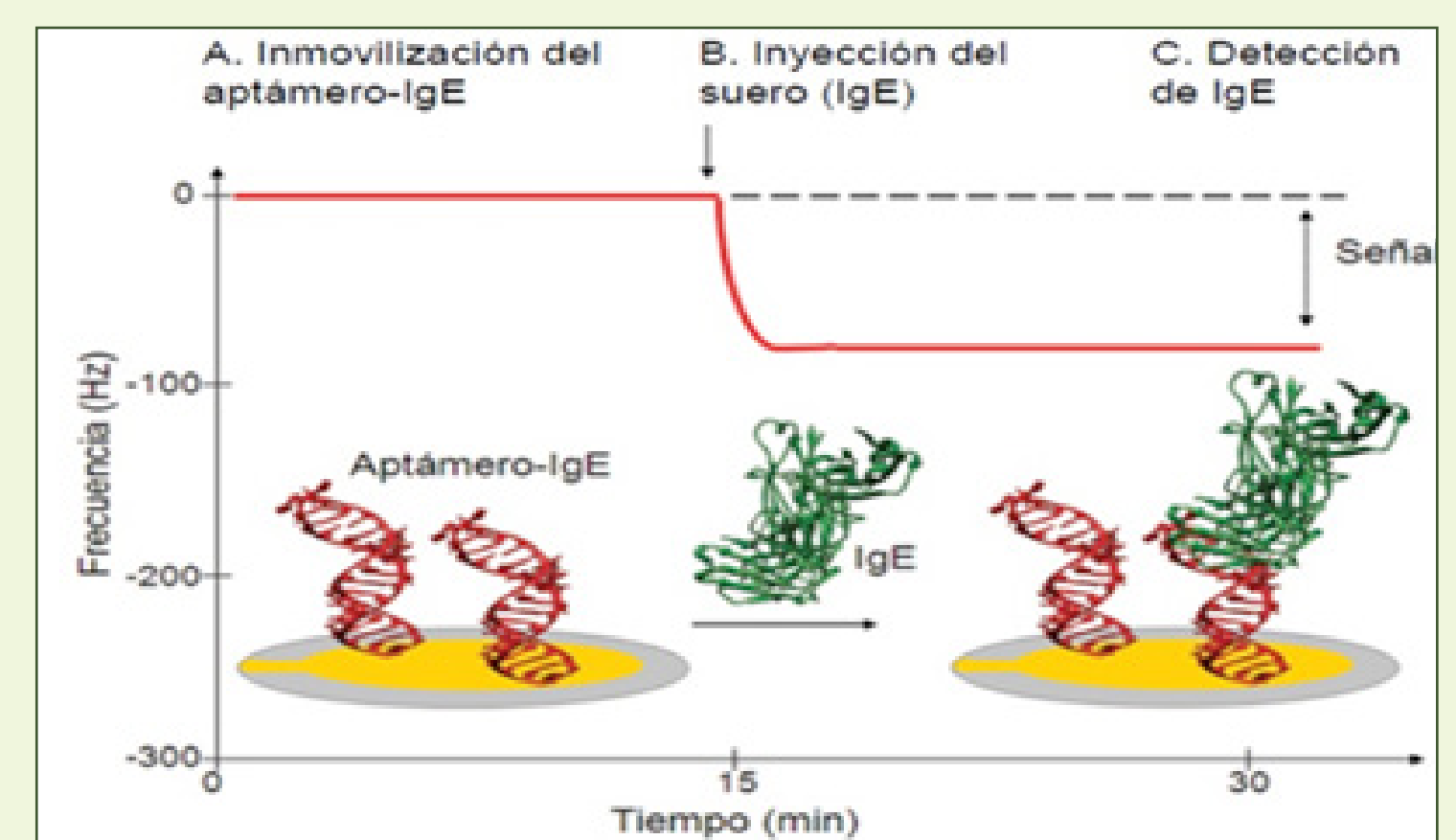
Seguimiento de la oxidoreducción del ferricianuro desde la ausencia de BPA(A) en el biosensor hasta concentraciones altas de BPA (D).



Voltametrías cíclicas registradas en las distintas etapas de modificación del electrodo de carbón vitrificado para mejorar la sensibilidad del mismo en la detección de bisfenol A

- Curva a: electrodo de carbono vitrificado (ECV)
- Curva b: ECV con grafeno reducido (GR)
- Curva c: GR-EUV con nanopartículas de oro (AuNP)
- Curva d: AuNP-GR-EUV con el aptámero inmovilizado

CAMPOS DE APLICACIÓN



▲ La concentración de BPA ▼ la corriente de oxidación y de reducción del ferricianuro (A). Ya que la transferencia de carga se ve reducida al formarse el complejo aptámero-bisfenol A

Medida de la especificidad del aptasensor (C):

- Respuesta al analito BPA - SIGNIFICATIVA
- Respuesta a interferentes: Bisfenol B (BPB), 6F bisfenol A (6F-BPA), 4,4'-bifenol (BP) - NO SIGNIFICATIVA
- Dispositivo de gran sensibilidad y selectividad

CONCLUSIONES

1. Los aptámeros son reactivos biológicos de gran afinidad, ofrecen grandes posibilidades en las Química Analítica, Química Clínica, Farmacología, etc...
2. Presentan numerosas ventajas frente a los anticuerpos: su naturaleza química, la capacidad de manipulación, la desnaturalización es reversible y su estabilidad a largo plazo.
3. Se obtienen mediante el Método Selex, altamente específico, con balance coste/efectividad favorable.
4. Los aptasensores presentan ventajas sobre los inmunosensores en estabilidad y especificidad y ejemplos en diagnóstico clínico son el Anti-IgE y el Bisfenol A.
5. Son muchos los aptámeros que se encuentran en estudio, en distintas fases del ensayo clínico para diferentes patologías.
6. El Macugen es el primer aptámero comercializado, para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, DMAE con muy buenos resultados y una alta eficacia.
7. Su campo de aplicación se va ampliando al campo agroalimentario y a la industria química.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jayasena S. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. Clinical Chemistry. 1999;45(9):1628-1650
2. 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
3. Hernández F, Botero J. Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. Iatreia 2012. 2:159-168
4. Keefe A, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. Nature Reviews Drug Discovery. 2010; 9(7):537-550
5. Zhou L, Wang J, Li D, Li Y. An electrochemical aptasensor based on gold nanoparticles dotted graphene modified glassy carbon electrode for label-free detection of bisphenol A in milk samples. Food chemistry. 2014;162: 34-40
6. Yuan A, Kaiser P. Emerging therapies for the treatment of neovascular age related macular degeneration. Seminars in Ophthalmology. 2011; 26(3):149-155