



Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia

Biosensores basados en aptámeros:
tipos y aplicaciones en biomedicina

Miguel Sevidanes Quincy



Facultad de Farmacia



Universidad de Sevilla

TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN FARMACIA

Biosensores basados en aptámeros:
tipos y aplicaciones en biomedicina

Revisión bibliográfica

Miguel Sevidanes Quincy

Tutora: Montserrat Argandoña Bertrán
Departamento: Microbiología y Parasitología

Sevilla, 4 de Julio de 2022

Resumen

Los biosensores son instrumentos analíticos constituidos por un componente biológico y otro fisicoquímico, capaces de detectar un evento de biorreconocimiento producido por la interacción con un analito de interés, y junto a un sistema transductor adecuado, convertir dicho evento en una señal medible. Su acoplamiento con distintas biomoléculas de alta afinidad permite la detección sensible y selectiva de una gran variedad de analitos. El uso conjunto de diferentes tecnologías y estrategias de biodetección, señalización y optimización permiten el diseño, a conveniencia, de una gran variedad de biosensores con aplicaciones muy versátiles y útiles en diferentes campos. Están presentes en una variedad muy amplia de áreas de trabajo; como el diagnóstico clínico, la supervisión ambiental, el control de alimentos, el descubrimiento de fármacos, la investigación forense y biomédica.

Tradicionalmente, los biosensores basados en anticuerpos, también conocidos como inmunosensores, han tenido mayor protagonismo en el ámbito clínico, debido a sus buenas propiedades de afinidad y sensibilidad. Sin embargo, la detección limitada sólo a sustancias inmunogénicas y la necesidad de desarrollar dispositivos de diagnóstico más baratos, sencillos, específicos y sensibles, junto a la posibilidad de ampliar el rango de detección para otro tipo de analitos, han dado pie a la investigación de múltiples variedades de biosensores. Entre ellos, los aptasensores.

En este trabajo bibliográfico, se profundiza sobre las ventajas que proporcionan los biosensores basados en aptámeros, sus métodos de producción y clasificación; exponiendo a su vez el enorme potencial que tienen los aptámeros, por sus características únicas, como moléculas de biorreconocimiento en biosensores. A su vez, también se hace una breve comparación con el uso de los anticuerpos en biosensores.

Palabras clave: biosensor, aptamer, SELEX, Cell- SELEX, aptasensor.

Índice

1	Introducción	1
1.1	Concepto y características de un biosensor.....	1
1.2	Concepto de aptámero	4
2	Objetivos de la revisión	5
3	Metodología	6
4	Resultados y discusión	6
4.1	Principales diferencias entre aptámeros y anticuerpos.....	6
4.2	Métodos de producción de aptámeros.....	10
4.2.1	<i>Método SELEX</i>	10
4.2.2	<i>Método SELEX para la detección de células completas: Cell-SELEX</i>	12
4.3	Tipos de aptasensores.....	14
4.3.1	<i>Aptasensores electroquímicos</i>	15
4.3.2	<i>Aptasensores piezoeléctricos</i>	16
4.3.3	<i>Aptasensores colorimétricos</i>	18
4.3.4	<i>Aptasensores fluorométricos</i>	20
4.4	Aplicaciones de los aptasensores.....	22
4.4.1	<i>Diagnóstico de cáncer</i>	22
4.4.2	<i>Diagnóstico de enfermedades infecciosas bacterianas</i>	23
4.4.3	<i>Diagnóstico en enfermedades parasitarias</i>	26
4.4.4	<i>Diagnóstico de enfermedades víricas</i>	28
5	Conclusiones	30
6	Bibliografía	31

1 Introducción

1.1 Concepto y características de un biosensor

Un biosensor es un dispositivo que mide reacciones biológicas o químicas generando señales medibles y proporcionales a la concentración de un analito en la reacción. Los biosensores se pueden emplear en la monitorización de enfermedades, investigación de fármacos y para detectar contaminantes, microorganismos causantes de enfermedades y diferentes marcadores de enfermedad en los fluidos corporales (sangre, orina, saliva, sudor). Un biosensor convencional consta de los siguientes componentes (Abid et al., 2021; Bhalla et al., 2016; Damborský et al., 2016):

- **Analito:** Es la sustancia de interés que necesita ser detectada. Por ejemplo: la glucosa sería el analito a detectar y medir en un glucómetro.
- **Biorreceptor:** Es una molécula que reconoce específicamente el analito y una vez se une a él genera una señal. Éstas pueden ser enzimas, células enteras, aptámeros, ácido desoxirribonucleico (ADN) y anticuerpos, entre otros. El proceso de generación de señales (en forma de luz, calor, pH, carga o cambio de masa) tras la interacción del biorreceptor con el analito se denomina biorreconocimiento.
- **Transductor:** Es un elemento que convierte un tipo de señal en otra, con el objetivo de convertir el evento de biorreconocimiento en una señal medible. Este proceso de conversión de energía se conoce como señalización. La mayoría de los transductores producen señales ópticas o eléctricas que suelen ser proporcionales a la cantidad de interacciones analito-biorreceptor.
- **Electrónica:** es la parte de un biosensor que procesa la señal transducida y la prepara para su visualización. Consiste en un circuito electrónico complejo que realiza el acondicionamiento de señales, como la amplificación y conversión de señales de forma analógica a digital. Las señales procesadas son luego cuantificadas por la unidad de visualización del biosensor.
- **Pantalla:** Sistema de interpretación del usuario como la pantalla de cristal líquido de una computadora o una impresora directa que genera números o curvas comprensibles para el usuario. Esta parte a menudo consiste en una combinación de hardware y software que genera resultados del biosensor de una manera fácil de usar. La señal de salida en

la pantalla puede ser numérica, gráfica, tabular o una imagen, según los requisitos del usuario final.

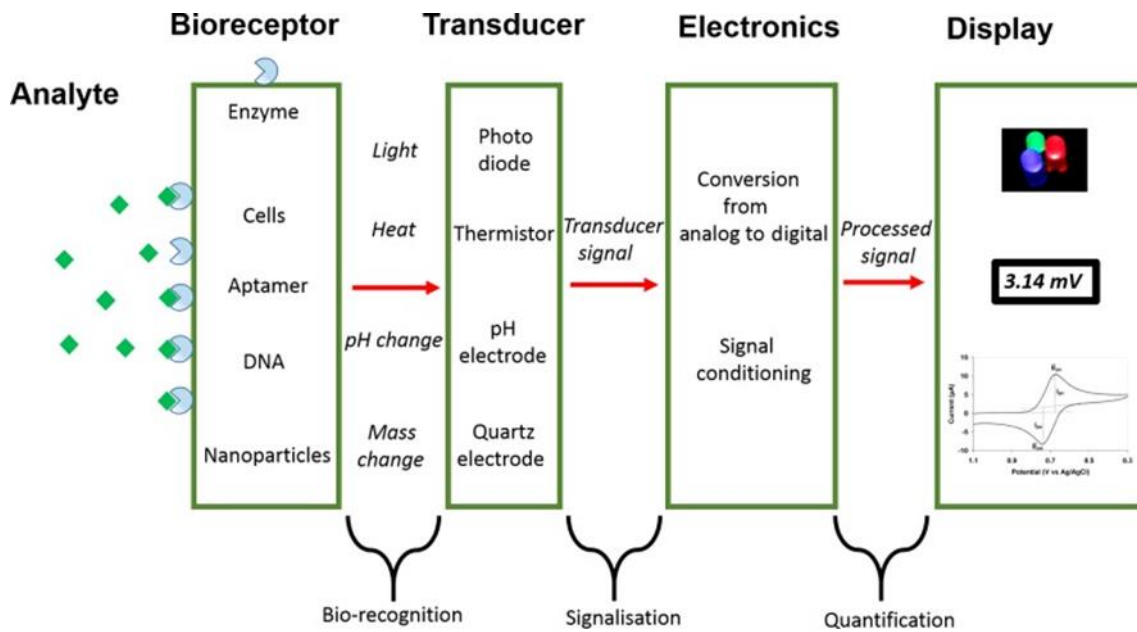


Figura 1. Esquema general de los componentes de un biosensor (Bhalla et al., 2016).

Características intrínsecas de un biosensor

Existen ciertos atributos estáticos y dinámicos que debe poseer todo biosensor y que determinan la fiabilidad, efectividad y seguridad de estos. Entre ellos se encuentran la selectividad, reproducibilidad, estabilidad, sensibilidad y linealidad. La optimización de estas propiedades se refleja en el rendimiento del biosensor (Bhalla et al., 2016; Bucur et al., 2021; Costa et al., 2022).

- **Selectividad**

La selectividad es seguramente la característica más importante de un biosensor. La selectividad es la capacidad de un biorreceptor para detectar y unirse a un analito específico en una muestra que contiene otros aditivos y contaminantes, sin interactuar con estos últimos (Bucur et al., 2021; Costa et al., 2022). El mejor ejemplo de selectividad de un biorreceptor es la que tradicionalmente se representa por la interacción de un antígeno con el anticuerpo, debido a su alta especificidad. De forma clásica, los anticuerpos se han utilizado mucho como biorreceptores, normalmente inmovilizados en la superficie del transductor de señal, uniéndose de forma efectiva a los antígenos para su detección. A la

hora de elegir o diseñar un biosensor, la selectividad es la principal característica a considerar para la mayoría de las funciones que desempeñan los biosensores (Bhalla et al., 2016).

- **Reproducibilidad**

La reproducibilidad es la capacidad del biosensor para generar las mismas respuestas para unas condiciones experimentales idénticas. La reproducibilidad se caracteriza por la precisión y exactitud del transductor y la electrónica de un biosensor. La precisión es la capacidad del sensor para proporcionar resultados similares cada vez que se mide una misma muestra y la exactitud indica la capacidad del sensor para proporcionar un valor medio cercano al valor real cuando se mide una muestra más de una vez. Las señales reproducibles proporcionan alta confiabilidad y robustez a las conclusiones extraídas de las respuestas de un biosensor (Bhalla et al., 2016).

- **Estabilidad**

La estabilidad es el grado de susceptibilidad a las perturbaciones ambientales dentro y fuera del sistema de biodetección a lo largo del tiempo. Estas perturbaciones pueden provocar una desviación en las señales de salida de un biosensor bajo medición. Esto puede causar un error en la concentración medida y puede afectar la precisión y exactitud del biosensor. La estabilidad es la característica más crucial en aplicaciones donde se requieren largas etapas de incubación o monitorización continua. La respuesta de los transductores y la electrónica puede ser sensible a la temperatura, lo que puede influir en la estabilidad de un biosensor. Otro factor que puede influir en la estabilidad es la afinidad del biorreceptor, que puede degradarse durante un periodo de tiempo determinado, produciendo errores en la medición debido a falta de interacción con el analito (Bhalla et al., 2016).

- **Sensibilidad**

La sensibilidad es la cantidad mínima de analito que puede detectar un biosensor, y esto define su límite de detección (LOD). También se puede definir como la medida de cuán bruscamente cambia la señal emitida con variaciones en la concentración del analito objetivo. Esto se ve reflejado en la ecuación de la recta de calibrado ($y = mc$), donde la pendiente representa la sensibilidad del biosensor a diferentes concentraciones (Costa et al., 2022). En muchas aplicaciones de monitorización, tanto médicas como ambientales, es necesario detectar concentraciones de analito muy bajas, del orden de ng/ml o fg/ml (femtogramo), o para confirmar la presencia de trazas. Por ejemplo, una concentración de

antígeno prostático específico (PSA) de 4 ng / ml en sangre se asocia con el cáncer de próstata para el que los médicos sugieren pruebas de biopsia. Por tanto, la sensibilidad se considera una propiedad de vital importancia en un biosensor (Bhalla et al., 2016).

- **Linealidad**

La linealidad es el atributo que correlaciona las respuestas medidas de un conjunto de mediciones tomadas a diferentes concentraciones de analito de forma proporcional; asemejando los resultados a una línea recta, representada matemáticamente por la recta de calibrado como $y = mc$, donde “ c ” es la concentración del analito, “ y ” es la señal de salida, y “ m ” (la pendiente de la recta) es la sensibilidad del biosensor. En otras palabras, es la proporcionalidad de la respuesta con respecto a la concentración del analito (Bhalla et al., 2016; Costa et al., 2022), especialmente importante en biosensores que no solo detectan la presencia de un analito sino también la cuantifican. La linealidad del biosensor se puede asociar con la resolución del biosensor y el rango de concentraciones de analito a determinar. La resolución del biosensor se define como el cambio más pequeño en la concentración de un analito que se requiere para producir un cambio en la respuesta del biosensor. Dependiendo de la aplicación, se requiere una buena resolución, sobre todo en aquellos biosensores que necesiten medir en un amplio margen de concentraciones. Otro término asociado con la linealidad es el rango lineal, que se define como el rango de concentraciones de analito para las cuales la respuesta del biosensor cambia linealmente con la concentración (Bhalla et al., 2016).

1.2 Concepto de aptámero

Los aptámeros son pequeñas moléculas de oligonucleótidos de ADN o ARN monocatenarios, que suelen oscilar entre 20 y 80 nucleótidos, y que actúan como receptores sintéticos para el reconocimiento de analitos, exhibiendo una alta selectividad y afinidad por dichas dianas. Son capaces de autoplegarse estructuralmente en conformaciones tridimensionales al unirse con sus respectivas dianas objetivo debido a sus estructuras secundarias y terciarias (Elskens et al., 2020). Con estas conformaciones específicas, los aptámeros exhiben una muy alta complementariedad molecular con sus ligandos diana y pueden unirse a ellos mediante enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, efectos hidrófobos, apilamiento π - π o fuerzas de van der Waals (Wan et al., 2021), lo que les confiere una gran capacidad de especificidad, afinidad y sensibilidad. La fuerza de afinidad con la que se unen a sus dianas se mide

cuantitativamente y se pone de manifiesto mediante la constante de disociación (K_d), que suele rondar desde el rango picomolar hasta el nanomolar. Pueden unirse a una gran variedad de dianas; desde moléculas pequeñas, como iones, hasta células enteras, pasando por proteínas, ácidos nucleicos, toxinas, y sustancias antigénicas entre otras; lo que genera un gran interés en el campo de la biomedicina para la detección, diagnóstico e incluso terapia de muchas enfermedades. Además son estables en una gran variedad de condiciones iónicas, de pH y temperatura (Kulabhusan et al., 2020).

Actualmente, el pegaptanib (Macugen) es el primer y único aptámero aprobado para uso comercial por la *Food and Drug Administration* (FDA), para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). Otros aptámeros para el tratamiento de enfermedades están aún en la fase clínica de desarrollo (Hernández y Hincapié, 2012; Ospina, 2020). Especial mención merecen los aptámeros de ADN como terapia en el campo de la oncología, ya que han demostrado experimentalmente que pueden usarse para el direccionamiento específico hacia la superficie celular tumoral y, en algunos casos, provocar una respuesta intracelular funcional tras la unión e internalización a través de moléculas diana su superficie, lo que finalmente daría como resultado la muerte celular tumoral (Marshall y Wagstaff, 2020).

El uso de aptámeros en la actualidad está aún muy restringido, con poco protagonismo en el campo de la salud, siendo los principales métodos de biosensores y bioensayos de diagnóstico hoy en día basados en el uso de anticuerpos como moléculas de biodetección (Elskens et al., 2020; Kulabhusan et al., 2020).

Pese a la poca presencia actual de los aptámeros en el ámbito clínico, todas estas características moleculares descritas han impulsado la investigación y desarrollo de aptámeros como molécula biorreceptora que, junto a diversas metodologías de detección en el campo de los biosensores, han dado lugar al concepto de biosensores basados en aptámeros o aptasensores. En las últimas décadas ha habido prometedores avances científicos que se han hecho patentes a través de los resultados obtenidos en numerosos estudios.

2 Objetivos de la revisión

En esta revisión se intentarán esclarecer las diferentes ventajas que presentan los biosensores basados en aptámeros y poner de manifiesto el potencial que presentan estas moléculas de oligonucleótidos en el campo de la biomedicina, con especial hincapié en el diagnóstico de enfermedades. También se revisarán los principales métodos de producción de los

aptámeros, destacando las ventajas intrínsecas que presentan estos procesos para el diseño posterior del aptasensor.

3 Metodología

Las fuentes de información fundamentalmente utilizadas para la revisión bibliográfica de este trabajo fueron predominantemente artículos científicos pertenecientes a la base de datos de Medline a través del motor de búsqueda de PubMed, ofrecidos online de forma gratuita por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos (NLM). También se utilizaron, aunque en mucho menor grado, y con fines meramente orientativos, las bases de datos de Scopus y Scielo. Los artículos científicos revisados datan en su mayoría de los últimos 10 años, usándose puntualmente artículos más antiguos.

Primero se realizó una extensa lectura bibliográfica para poder adquirir una visión general y una comprensión mínima del tema de biosensores, sus componentes y aplicaciones más usadas. Durante esta primera búsqueda, utilizando la palabra clave “biosensor”, se encontraron 59000 entradas bibliográficas en PubMed Central. La segunda búsqueda, con la palabra “aptamer” dió con 24000. Y la tercera, con la palabra “aptasensor”, dió con 3200 entradas. Las siguientes búsquedas se enfocaron en cuestiones más detalladas.

Las palabras clave utilizadas en la búsqueda de información fueron “biosensor”, “aptamer”, “SELEX”, “Cell- SELEX” y “aptasensor”. Se utilizó también un programa de administración de referencias y bibliografías denominado Mendeley para facilitar la citación de referencias en el presente trabajo y la presentación de la bibliografía utilizando las normas de Vancouver.

4 Resultados y discusión

4.1 Principales diferencias entre aptámeros y anticuerpos

A la hora de diseñar un biosensor, es necesario seleccionar cuidadosamente el tipo de elemento biorreceptor que se quiera utilizar. Para ello se deben tener en cuenta las propiedades específicas de dichos elementos para elegir al que presente las características más adecuadas según el objetivo del estudio que se quiera realizar. Estas características deben repercutir positivamente en los valores de selectividad, sensibilidad y estabilidad del biosensor, ya que la

elección del tipo de biorreceptor repercute enormemente en el rendimiento y fiabilidad del biosensor. En este apartado se discuten las principales diferencias entre aptámeros y anticuerpos, listados de forma resumida en la tabla 1.

Desde el punto de vista de la producción de anticuerpos monoclonales humanizados, son necesarios líneas celulares de mamíferos modificadas genéticamente para evitar el rechazo en el cuerpo humano. A nivel industrial se cultivan en biorreactores de grandes dimensiones, en condiciones adecuadas de pH, temperatura, oxígeno y en medios de cultivo con los nutrientes necesarios. Una vez obtenidos, son necesarios sucesivos pasos de aislamiento, filtración, purificación y control de calidad. En definitiva, son necesarios muchos medios de producción y procesos laboriosos, lo que se traduce en mayores costes (Villaescusa, 2017). En el caso de anticuerpos policlonales, además, pueden producirse variaciones entre un lote y otro. Esto contrasta fuertemente con la producción de aptámeros, que es bastante sencilla y ofrece una calidad constante, ya que se basa en una síntesis enzimática o en fase sólida reproducible. Esto da como resultado un proceso de producción más eficiente, lo que conduce a pruebas de diagnóstico más baratas (Elskens et al., 2020).

Otra principal diferencia es el rango de moléculas objetivo a las que pueden unirse. Los aptámeros pueden unirse a proteínas inmunogénicas y no inmunogénicas, toxinas, ADN, virus, pequeños iones, hasta células enteras (Romero López y Berzal Herranz, 2017), como pueden ser las bacterias o células tumorales, por lo que tienen mucho potencial en la detección eficaz de infecciones y en la detección precoz de diferentes tipos de cáncer. Mientras que los anticuerpos monoclonales sólo pueden detectar sustancias inmunogénicas. Además de que, por su tamaño, no pueden penetrar dentro de las células, opción que sí tiene un aptámero, pudiendo de esta manera servir como vector de transporte para otros fármacos hacia el sitio de acción.

Otra ventaja importante de los aptámeros sobre los anticuerpos es la posibilidad de modificación química selectiva. La introducción de grupos funcionales en los nucleótidos proporciona mayor variabilidad y diversidad combinatoria en la formación de oligonucleótidos en comparación a si sólo utilizamos los 4 nucleótidos naturales, cuya mezcla resultaría en una combinación más restringida y una variabilidad de aptámeros más limitada. Las estrategias de dichas modificaciones químicas son muy numerosas; y según el objetivo deseado, pueden aumentar la afinidad de unión de los aptámeros, mejorar su diversidad química, mejorar su estabilidad, ampliar sus posibles aplicaciones en diagnóstico y terapia, e incluso utilizarse para su conjugación con fármacos y nanopartículas (Odeh et al., 2020). También se puede fomentar el estado de plegamiento competente del aptámero (estado competente para la unión con la

diana) en comparación con el estado desplegado no competente, mediante la manipulación de las condiciones del medio como el pH, la temperatura y la concentración de sal; así como de la introducción química de diversos grupos funcionales (Elskens et al., 2020).

Los aptámeros presentan una mayor estabilidad física y térmica, y tienen una vida útil más prolongada en comparación con los anticuerpos, dando como resultado una herramienta analítica más robusta. Incluso después de la desnaturalización, dada la reversibilidad y previsibilidad del emparejamiento de las bases de nucleótidos, los aptámeros pueden replegarse a temperaturas más bajas, lo que restaura sus propiedades y aumenta su vida útil (Thiviyathan y Gorenstein, 2012). Por el contrario, los anticuerpos son inestables en la mayoría de las condiciones que se desvían de las fisiológicas y el replegamiento después de la desnaturalización puede resultar ser más difícil de lograr, sufriendo en la mayoría de los casos, una degradación permanente. Los problemas de estabilidad de los aptámeros en el organismo vienen dados principalmente por la degradación por endonucleasas, y su pequeño tamaño los hace susceptibles a la filtración renal. Para mejorar dicha estabilidad se requieren modificaciones químicas que, en algunos casos, también aumentan su afinidad y especificidad por las dianas (Odeh et al., 2020). Estas modificaciones pueden ser Pre o Post-SELEX.

Por último, los aptámeros son conocidos por su mayor capacidad de discriminación entre moléculas estrechamente relacionadas y requieren solo una pequeña región para unirse, en comparación con un anticuerpo (Gopinath et al., 2006). Por ejemplo, el aptámero que se une a la teofilina discrimina la cafeína en más de 14 000 veces, aunque la molécula de cafeína se diferencia de la teofilina solo por la presencia de un grupo metilo en la posición N7 (Jenison et al., 1994).

Tabla 1. Comparativa entre aptámeros y anticuerpos (Odeh et al., 2020).

	Aptámeros	Anticuerpos
Síntesis	Sintetizado químicamente y fácil de producir.	Alto costo y complejidad de producción.
Tamaño	Pequeño en comparación con los anticuerpos	Grande
Estabilidad	Propenso a la degradación por nucleasas	Vida media biológica corta

	Aptámeros	Anticuerpos
Objetivos	Amplia gama de objetivos, desde iones hasta células vivas completas	Producido solo contra moléculas inmunogénicas, lo que limita el rango de objetivos
Toxicidad e inmunogenicidad	Baja toxicidad y no inmunogénica.	Inmunogénico
Especificidad de unión	Alta especificidad de unión	Alta especificidad de unión
Afinidad de unión	Alta afinidad de unión	Alta afinidad de unión
Tasa de aclaramiento renal	Eliminación rápida	Tasa de aclaramiento baja
Conjugación química	Fácil de conjugar a nanopartículas y fármacos.	Más difícil de conjugar
Modificación química	Tolerante a modificaciones químicas para mejorar las propiedades estructurales y funcionales.	Las modificaciones a menudo conducen a una actividad reducida

Todas estas propiedades tan prometedoras indicadas en la tabla 1, convierten a los aptámeros en candidatos ideales para ser estudiados como moléculas de biorreconocimiento en biosensores para la detección eficaz de diferentes tipos de dianas. De aquí nace el concepto de biosensores basados en aptámeros: los aptasensores. Dichos biosensores pueden ser empleados en numerosas aplicaciones en el ámbito clínico como pueden ser el diagnóstico de enfermedades infecciosas y oncológicas y en la detección de sustancias en el organismo como fármacos, drogas de abuso y otros biomarcadores. Además de su empleo en biosensores, las moléculas de aptámeros también tienen potencial para ser empleados en terapia y vehiculización de fármacos a su diana farmacológica.

4.2 Métodos de producción de aptámeros

Los aptámeros se desarrollan generalmente mediante un proceso iterativo bien establecido y completamente *in vitro* conocido como evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX), un método desarrollado en 1990 por 2 grupos de investigación independientes (Ellington y Szostak, 1990; Tuerk y Gold, 1990). Este método consiste en la incubación de reiterativa de una biblioteca inicial de oligonucleótidos con la sustancia que se desee detectar, para que, al cabo de un cierto número de rondas, se dé con el aptámero que tenga mayor afinidad con el analito. La evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) ha tenido muchas variaciones y modificaciones a lo largo de los años para mejorar, optimizar o especializar la función del aptámero que se quiera obtener, según la diana objetivo que tenga que reconocer y la adecuación al ensayo en sí. De entre todos los analitos a los que pueden unirse, las proteínas son la diana más frecuente de los aptámeros desarrollados por SELEX, por lo que se desarrolló una mejora técnica basada en la purificación de la proteína objetivo, de forma que facilitase el proceso. A este método se le conoce como SELEX basado en proteínas. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, los aptámeros pueden unirse de forma específica a todo tipo de dianas, incluyendo células completas como pueden ser bacterias y células tumorales. Para la detección de células completas vivas inalteradas se suele utilizar un método de SELEX de células completas o Cell-SELEX; un método derivado del SELEX en el que se incuba la biblioteca de nucleótidos con las células diana enteras durante sucesivas rondas.

4.2.1 Método SELEX

Se pueden esquematizar los diferentes pasos que tradicionalmente se han usado en el SELEX convencional en los siguientes apartados (Komarova y Kuznetsov, 2019; Ospina, 2020; Sola et al., 2020):

- a) **Preparación inicial de la biblioteca:** Se parte de una gran biblioteca de oligonucleótidos aleatorizada (10^5 moléculas), cuyos extremos 5' y 3' tienen una composición fija conocida para la unión posterior de cebadores; mientras que la región central es variable (secuencias aleatorias). Esta biblioteca se sintetiza previamente mediante síntesis química de fase sólida.
- b) **Incubación:** Éstas secuencias de oligonucleótidos se ponen en contacto con una suspensión de nuestra muestra diana (que contiene el analito objetivo de interés).

Durante este contacto, algunos oligonucleótidos se unen a la diana con mayor o menor afinidad mientras que otros quedan separados en la suspensión.

- c) **Selección:** Tras la exposición de la biblioteca a la diana, se procede a hacer varios lavados con el fin de separar las secuencias unidas de las que no. Este proceso puede variar según esté la muestra diana anclada a una superficie o bien en suspensión. En un caso o en otro, se procede a lavados o bien centrifugación para la separación, respectivamente.
- d) **Amplificación:** Posteriormente se procede a amplificar las secuencias unidas a la diana mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para enriquecer la biblioteca de oligonucleótidos con las cadenas que son capaces de reconocer al objetivo. Seguidamente, se puede volver a exponer la biblioteca a nuevas rondas de incubación, selección y amplificación para conseguir el grado de afinidad y especificidad que se desee. Normalmente se necesitan unas 12 rondas para conseguir un nivel de afinidad adecuado.
- e) **Clonación y secuenciación:** Una vez obtenidas las secuencias definitivas se procede a clonar y secuenciar para conocer la composición de las cadenas.

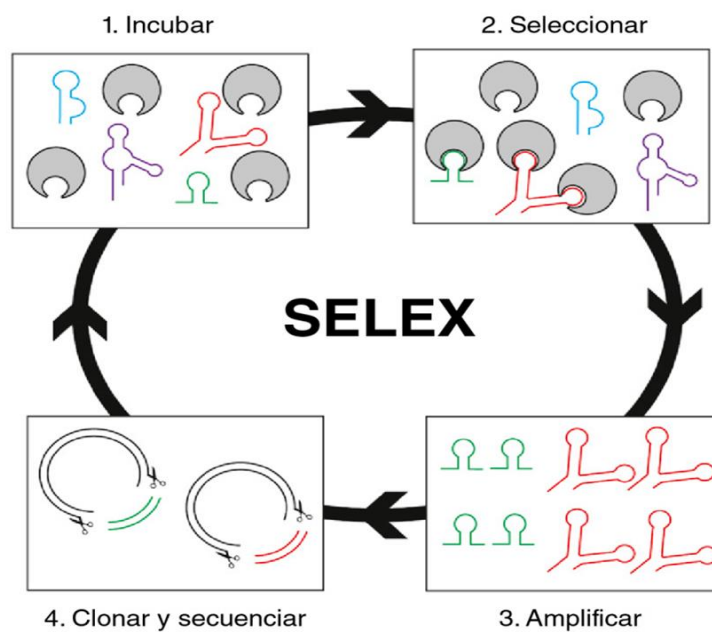


Figura 2. Esquema básico del método SELEX (Ospina, 2020).

4.2.2 Método SELEX para la detección de células completas: Cell-SELEX

El proceso es muy parecido al del SELEX tradicional, que también incluye las fases de incubación, separación o elución, amplificación y secuenciación. La principal diferencia durante el proceso de Cell-SELEX es que hay una selección positiva y otra negativa. El paso de selección negativa es necesario para eliminar secuencias que se unen a otras células no dianas (células control) y así mejorar la especificidad de los aptámeros candidatos.

El proceso de Cell-SELEX viene detallado en la figura 3. A modo de resumen: primero se diseña y sintetiza una biblioteca de oligonucleótidos monocatenarios de secuencias aleatorias de gran diversidad y se incuban con las células diana. Las secuencias unidas a las células diana se eluyen de las no unidas y posteriormente se procede a separar dichas secuencias unidas a las células mediante un método óptimo. Este conjunto de secuencias se vuelve a incubar con las células de control negativo, desechando la fracción que se haya unido a ellas. Las secuencias que no se unen se amplifican por PCR y se preparan para una nueva ronda. Por último, una vez obtenido el nivel de especificidad requerido, se secuencian los grupos enriquecidos y se eligen para su caracterización (Chen et al., 2017). Se puede observar un aumento constante en la afinidad de unión de los candidatos a aptámero a medida que aumenta el número de rondas de selección. El enriquecimiento de las agrupaciones seleccionadas durante las sucesivas rondas se puede controlar mediante ensayos de unión por citometría de flujo (Chen et al., 2016; El-Husseini et al., 2022), técnica basada en el recuento y clasificación de las células según su dispersión con un rayo láser.

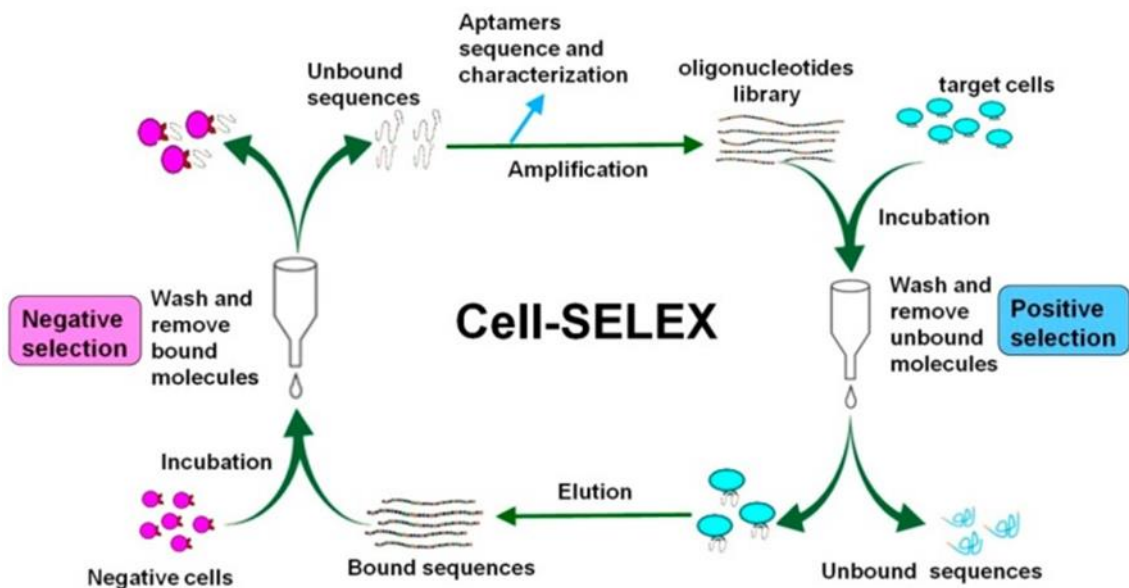


Figura 3. Esquema básico del método Cell-SELEX (Chen et al., 2016).

Para la detección de células completas, la técnica Cell-SELEX ha demostrado ser superior al SELEX de proteínas por diversos motivos. Para desarrollar aptámeros de proteínas de membrana para detectar células vivas completas utilizando la proteína-SELEX tradicional, es necesario, en primer lugar, tener un conocimiento previo de las proteínas dianas que se quieran detectar, y en segundo lugar, disponer de suficientes proteínas de membrana recombinantes de elevada pureza para las sucesivas rondas de SELEX (en ocasiones difíciles de obtener por las modificaciones postraduccionales que en ciertos casos llevan a un plegamiento incorrecto de la proteína recombinante que difieren de las proteínas naturales de la superficie celular) (Chen et al., 2016). Además, las proteínas purificadas pueden existir en diferentes conformaciones con respecto a las proteínas nativas en la superficie celular. Por lo tanto, los aptámeros específicos de la diana aislados por SELEX basado en proteínas purificadas pueden no reconocer sus proteínas diana en la superficie celular (Hori et al., 2018). En Cell-SELEX, los aptámeros se desarrollan para detectar y unirse específicamente a las moléculas en la superficie celular sin necesidad de un conocimiento previo de los objetivos moleculares (Guo et al., 2008). Por lo tanto, la purificación de proteínas tampoco es necesaria antes de la selección.

En Cell-SELEX, todas las moléculas en la superficie celular diana están en sus estados nativos y, por lo tanto, representan sus estructuras de plegamiento y distribución naturales. Todas las modificaciones postraduccionales están intactas en las proteínas de la membrana celular, por lo que los aptámeros se unirán a la conformación plegada real (Sefah et al., 2010). Por lo tanto, Cell-SELEX elimina el riesgo de que los aptámeros solo se unan a las proteínas purificadas, pero no puedan reconocer la forma nativa de las proteínas en las células vivas.

La tecnología Cell-SELEX está resultando ser muy prometedora en la biología del cáncer. Para la mayoría de las células cancerosas, siempre hay una escasez de marcadores de superficie altamente específicos que puedan ser empleados para el diagnóstico y la terapia. Los aptámeros generados a partir de células vivas completas suponen una sonda molecular óptima para caracterizar las células tumorales diana a nivel molecular. (Guo et al., 2008)

En definitiva; los aptámeros basados en Cell-SELEX facilitan el desarrollo y simplifican la búsqueda de sondas moleculares para el reconocimiento de células enfermas (Shangguan et al., 2007).

A pesar de las ventajas ofrecidas por Cell-SELEX para detectar células vivas enteras con respecto al SELEX de proteínas, este método también presenta algunas limitaciones inherentes que, en ocasiones, pueden complicar o entorpecer el proceso de selección de aptámeros.

Así, la presencia de células muertas conduce a una unión no específica de los oligonucleótidos, ya que éstos se pueden unir a componentes internos de la célula que se haya podido romper. Por tanto, es muy importante el acondicionamiento y cuidado de los cultivos de forma óptima, como también lo es acoplar métodos de separación apropiados como la centrifugación para reducir al máximo la presencia de células muertas (Bakhtiari et al., 2021).

Por otro lado, las contraselecciones o selecciones negativas son esenciales en el procedimiento de Cell-SELEX para mejorar la especificidad de los aptámeros y rechazar los que tienen una unión no específica hacia otras células no dianas (células control). Esto hace que el proceso de selección sea más complejo, con las consecuentes desventajas de costo, tiempo y esfuerzo (Bakhtiari et al., 2021).

Una de las principales diferencias con el SELEX de proteínas dianas es que las células enteras son dianas mucho más complejas, por lo que conseguir identificar con éxito los objetivos de los aptámeros en su superficie para su posterior aislamiento y secuenciación puede ser más complicado (Bakhtiari et al., 2021).

Finalmente, durante el procedimiento de Cell-SELEX, se debe evitar fijar las células en algún tipo de soporte durante la fase de incubación ya que se pueden tapar las proteínas de membrana que sean de unión específica con los aptámeros, reduciendo la afinidad real que puedan tener por las células. Otro problema es la carga neta negativa de la superficie celular, que produciría en principio una repulsión entre el polianión de ADN de los aptámeros y la superficie celular, obstaculizando la unión (Chen et al., 2016).

Actualmente aún se están investigando posibles soluciones para estos problemas.

4.3 Tipos de aptasensores

Podemos clasificar los tipos de aptasensores según el tipo de señal generada por la interacción del biorreceptor con el analito y el mecanismo por el cuál transduce esta señal de manera que se puedan interpretar los datos. Estos mecanismos de señalización son comunes a los biosensores tradicionales. En este aspecto, los principales tipos de biosensores/aptasensores, según el mecanismo de señalización; son los electroquímicos, piezoeléctricos y ópticos; dentro de los cuales, podemos encontrar los colorimétricos y fluorométricos.

4.3.1 Aptasensores electroquímicos

Es uno de los aptasensores más comunes. El mecanismo de señalización se fundamenta en el cambio de corriente, impedancia o potencial eléctrico en respuesta al evento de reconocimiento del analito por parte del biorreceptor en el transductor del sensor (Xu et al., 2005) que en este caso corresponde al electrodo. Generalmente estos biosensores generan una señal proporcional a los electrones que se liberan al medio tras una reacción bioquímica de interés que ocurre en la muestra, como por ejemplo en el caso de los glucómetros. Las ventajas de la detección electroquímica son esencialmente el análisis de analitos múltiples, de forma rápida y con un bajo costo. Estos dispositivos son fáciles de miniaturizar, además de ser robustos y compatibles con nuevas tecnologías de microfabricación y detección en tiempo real. Las ventajas que ofrecen estos biosensores son idóneas para realizar pruebas de laboratorio en el lugar de asistencia sanitaria [en inglés: Point Of Care Testing (POCT)], al paciente para la monitorización de analitos clínicos (Radi y Abd-Ellatief, 2021), de manera rápida y sencilla.

En este tipo de dispositivos, el transductor es capaz de convertir la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento en una señal medible y el aptámero de reconocimiento generalmente está inmovilizado por un enlace covalente a la superficie del electrodo. El transductor electroquímico está relacionado con la reacción que implica la transferencia de electrones. Por lo tanto, las mediciones electroquímicas solo se pueden lograr con etiquetas o sondas redox que se pueden unir al elemento de reconocimiento o puedan difundirse por la superficie del electrodo para reducirse u oxidarse mediante transferencia de electrones heterogéneos. Estas sondas redox incluyen enzimas redox, catalizadores inorgánicos o nanopartículas. La cinética de difusión del mediador redox al electrodo está influenciada por la cantidad de aptámeros que tenga fijadas en su superficie. Por tanto, la unión del analito a estos afecta la eficacia de la difusión, la transferencia de electrones y, finalmente, la señal detectada. (Radi y Abd-Ellatief, 2021).

Un ejemplo de sistema simple de detección usando un aptasensor electroquímico es el de sándwich de aptámeros que se compone de dos aptámeros y una superficie de electrodo (Figura 4). Este dispositivo está formado por un aptámero de captura conjugado con la superficie del electrodo, que captura e inmoviliza el analito; y un aptámero secundario, que reconoce una parte diferente de la superficie del analito, y se une para formar un sándwich aptámero-analito-aptámero. El aptámero secundario contiene una etiqueta electroactiva, como glucosa deshidrogenasa o nanopartículas de oro (AuNP), que actúan como sondas redox, catalizando una reacción de transferencia de electrones que sí es captada por el electrodo (Hori et al., 2018).

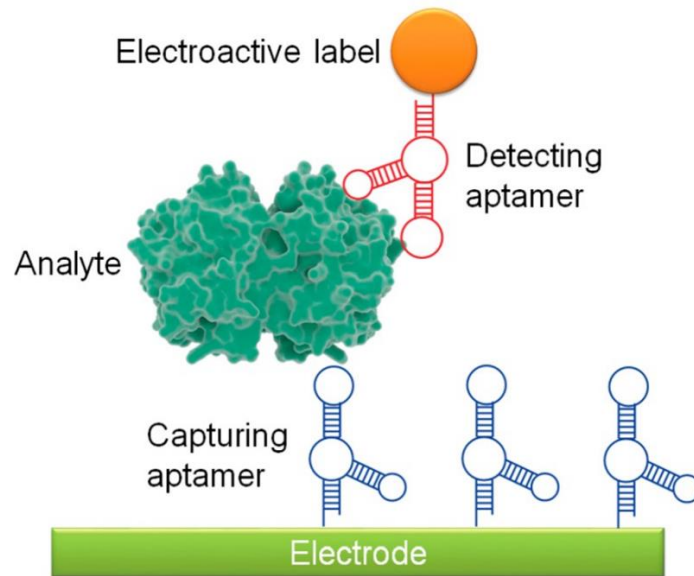


Figura 4. Esquema de un aptasensor electroquímico tipo sandwich (Hori et al., 2018).

4.3.2 Aptasensores piezoeléctricos

Los sistemas de transducción piezoeléctricos basan su funcionamiento en la propiedad que presentan determinados materiales de polarizarse eléctricamente cuando son deformados por la acción de una fuerza externa. Esta polarización genera un campo eléctrico en la superficie que puede usarse para transformar la energía mecánica en energía eléctrica. A su vez, el efecto puede revertirse, de tal forma que aplicando un campo eléctrico a un material piezoeléctrico este se deforme (Manganiello y De Sousa, 2018).

Este último efecto permite que estos materiales vibren por la aplicación de un campo eléctrico externo, generando ondas acústicas que se propagan e interactúan con el medio que les rodea, de tal forma que, el grado de interacción o las propiedades del medio pueden ser medidas a partir de las características del campo eléctrico del propio sensor. Estos sensores se comportan como guía de ondas acústicas y pueden responder a la variación de un amplio abanico de propiedades físicas como la presión, temperatura, masa adherida en la superficie, densidad o viscosidad de los fluidos en los que se encuentren sumergidos. Además, al aplicar en su superficie un recubrimiento que actúa como receptor selectivo de determinadas sustancias (como los aptámeros), permite su amplia utilización como biosensores, en los que suele aprovecharse su sensibilidad a los cambios de masa o de densidad–viscosidad en líquidos (Manganiello y De Sousa, 2018).

Los sensores piezoeléctricos son comúnmente llamados microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM, por sus siglas en inglés), por ser éste el material más ampliamente utilizado en este tipo de sensores debido a sus excelentes propiedades piezoeléctricas. Estos sensores, integrados junto a electrodos de oro, son usados para el estudio de interacciones moleculares y el desarrollo de sistemas de sensores para multitud de aplicaciones en diferentes áreas de investigación, como la alimenticia, ambiental y clínica. La operación de una QCM se basa en el efecto piezoeléctrico, en el cual un sensor de cristal de cuarzo es inducido a vibrar mecánicamente a una frecuencia de resonancia específica, a través de la aplicación de un campo eléctrico alternado a los electrodos metálicos. Según la ecuación de Sauerbrey (el cual describe este fenómeno), el cambio de frecuencia es linealmente proporcional al cambio de masa superficial (Δm) en el cristal. Al aplicar en su superficie diversas moléculas biorreceptoras específicas, como pueden ser los aptámeros, estos sensores pueden dar información de las concentraciones de las especies con las cuales están en contacto y tienen la ventaja de poseer una alta sensibilidad y bajos costes de instrumentación (Maglio et al., 2017).

Un ejemplo de este tipo de aptasensor piezoeléctrico lo podemos encontrar en el ensayo realizado recientemente en 2022, por Yang y colaboradores. En este experimento se fabricó una novedosa plataforma de aptadetección de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), sin necesidad de etiquetas, y basada en estructuras organometálicas (MOF) y nanopartículas de oro (AuNP), para la detección de tetraciclinas en muestras de alimentos.

El cambio de masa causado por la absorción de analitos en la interfaz de detección da como resultado un cambio de frecuencia del sensor QCM, lo que permite la detección en tiempo real y sin etiquetas de dichas sustancias. Dado que los cambios de masa generan señales extremadamente débiles y que la capacidad de adsorción del sensor QCM hacia su objetivo afecta directamente el rendimiento de detección, se utilizaron varios materiales funcionales emergentes para modificar la interfaz de detección. En este caso se emplearon las nanopartículas de oro (AuNP) y las estructuras organometálicas (MOF); ambos con grandes áreas de superficie específica y capacidad de amplificación de la señal, que junto a la conjugación con aptámeros específicos de tetraciclinas aumentan la sensibilidad y estabilidad del aptasensor. El aptasensor QCM exhibió un amplio rango lineal de detección de concentraciones de tetraciclinas (entre 1×10^{-10} g/mL y 1×10^{-5} g/mL), y con un límite de detección (LOD) de $0,8 \times 10^{-11}$ g/mL en condiciones experimentales óptimas (Yang et al., 2022).

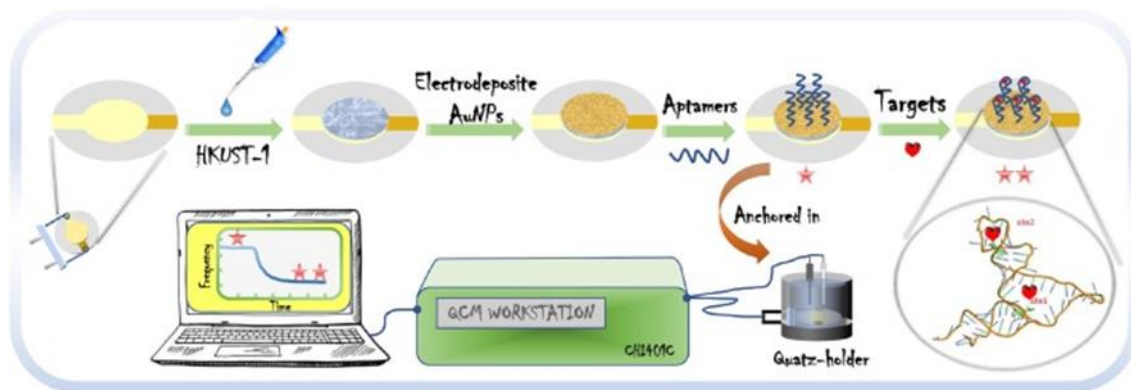


Figura 5. Esquema del proceso de preparación y detección del aptasensor QCM basado en AuNP y MOF (Yang et al., 2022). HKUST-1: denominación del organometal empleado.

4.3.3 Aptasensores colorimétricos

Las estrategias colorimétricas básicas implican la detección de la molécula objetivo mediante un cambio de color a simple vista y una sencilla instrumentación. Los métodos colorimétricos se consideran simples y eficientes con un gran potencial para el diagnóstico en el lugar de asistencia sanitaria (POCT). Muy demandados en aplicaciones médicas y farmacéuticas que requieran de una rápida detección de resultados y un manejo simple, ya que los resultados se pueden discernir visualmente a simple vista utilizando técnicas instrumentales sencillas, de bajo costo y efectivas (Shaban y Kim, 2021). Los biosensores colorimétricos son idóneos para pruebas clínicas *in situ* donde se prioriza la fiabilidad, reproducibilidad y selectividad del biosensor por el analito objetivo en muestras clínicas complejas, como la sangre o el suero, donde abundan diferentes tipos de moléculas.

Los biosensores colorimétricos basados en aptámeros han demostrado su sensibilidad y selectividad, además de su potencial efectivo para el diagnóstico rápido *in situ* sin instrumentación complicada. Sin embargo, el aptasensor colorimétrico tiene algunas limitaciones como el color de las muestras, que en ocasiones puede dificultar su correcta observación; la naturaleza lenta del proceso de fabricación; la dificultad de emplearlo en ensayos con múltiples dianas (característica muy demandada en el diagnóstico clínico multiplexado); y la pequeña gama de soluciones de pH optimizadas (Shaban y Kim, 2021).

Los transductores más empleados en este caso suelen ser nanopartículas de oro y plata (AuNP y AgNP respectivamente) que son excelentes transductores de señal para el análisis colorimétrico debido a sus importantes propiedades ópticas asociadas a su tamaño de partícula, distribución de tamaño y forma (Zhuang et al., 2019). Las propiedades intrínsecas de resonancia

de plasmón de superficie (SPR) de AuNP y AgNP contribuyen significativamente a la generación de señales colorimétricas (Chang et al., 2016). El método SPR es el más conocido y empleado en biosensores ópticos, debido fundamentalmente a su combinación entre sensibilidad y simplicidad.

SPR es el mecanismo por el cual los AuNPs puede producir luz visible en respuesta a un campo electromagnético. Cuando se exponen a la luz, la longitud de onda resonante es absorbida por los AuNP para inducir la oscilación de sus electrones superficiales. Estos electrones oscilantes producirán radiación electromagnética que se puede observar a simple vista. Esta característica unida a diferentes técnicas de agregación y dispersión de estas nanopartículas han dado como resultado numerosos métodos de detección colorimétricos utilizando los AuNP como elemento de contraste. De aquí surge el concepto de AuNP coloidales, que están estabilizados por dos fuerzas que se contrarrestan entre sí: las fuerzas de van der Waals y las electrostáticas. Cuando una de estas fuerzas es débil o está ausente, el sistema coloidal se desestabilizará y las AuNP se agregarán, lo que dará como resultado un cambio de color de rojo a azul (Chang et al., 2016).

Los AuNP muestran una excelente biocompatibilidad en comparación con los AgNP, que son conocidos por su toxicidad. Además, la gran superficie específica facilita numerosas adsorciones de biomacromoléculas en las superficies de AuNP a través de la interacción electrostática, protegiéndolas contra la agregación y convirtiéndolas en un buen transductor de señal para la construcción de aptasensores (Shaban y Kim, 2021).

La interacción de unión induce un cambio en el índice de refracción alrededor de la superficie del AuNP que modula su ángulo de resonancia produciendo un cambio de color. Por lo tanto, el SPR se ha utilizado en una estrategia colorimétrica basada en aptámeros para el ensayo de numerosos objetivos (Zhou et al., 2014).

Una plataforma prototipo de este tipo de aptasensores colorimétricos fue propuesta por Gupta y colaboradores (2021), para la detección a simple vista de *Escherichia coli* utilizando la agregación de AuNP para el viraje de color (figura 6). En este ensayo, las AuNP se cubrieron con óxido de grafeno (GO), y a continuación, se adhirieron aptámeros específicos para *E. coli* en su superficie, estableciendo una capa estabilizadora alrededor de las AuNP. Esta nanosonda aptasensora, en presencia de *E. coli*, produce la interacción competitiva del aptámero con la superficie bacteriana, que induce la agregación de AuNP, con un cambio de color distintivo de rojo a azul que se observa a simple vista y con un límite bajo de detección (LOD) de 10^2 células/mL. Los aptámeros específicos se obtuvieron previamente mediante el procedimiento de Cell-SELEX, incubándose en una solución de *E. coli* y seleccionando la fracción

unida a la membrana bacteriana. Esta plataforma es aplicable en capilares de vidrio, lo cual brinda oportunidades para fabricar dispositivos de detección en el punto de asistencia sanitaria (POCT).

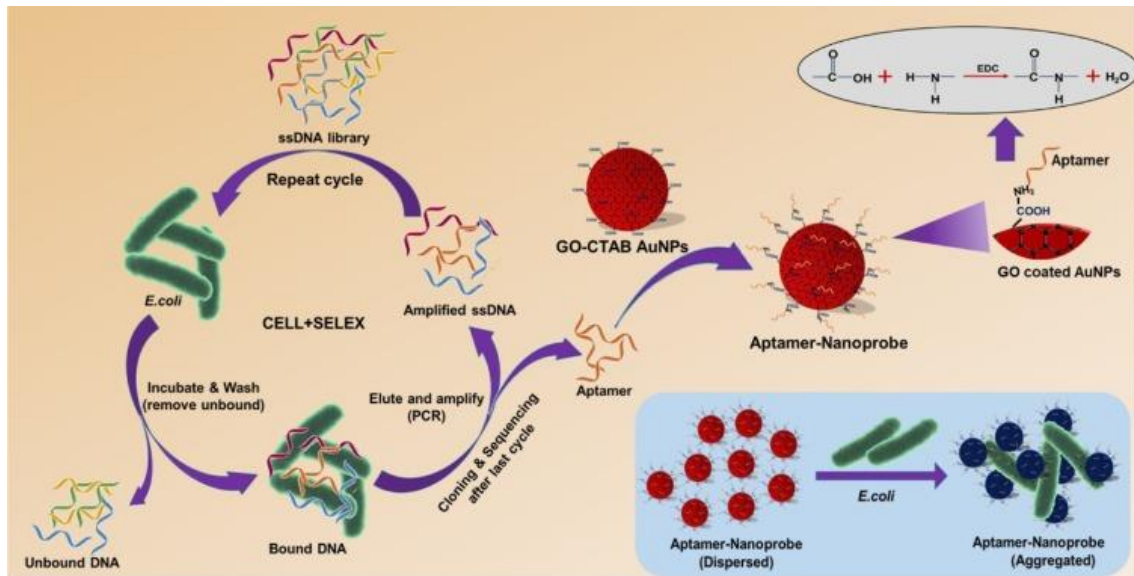


Figura 6. Esquema del procedimiento aptasensor colorimétrico basado en nanopartículas de oro (Gupta et al., 2021).

4.3.4 Aptasensores fluorométricos

Los aptasensores basados en fluorescencia se caracterizan por una alta sensibilidad, grandes rangos de detección, capacidad de multiplexación (capacidad para analizar múltiples datos extraídos de una misma muestra, facilitando el manejo de éstos y agilizando así las conclusiones obtenidas de ellas), análisis rápidos y el reconocimiento altamente selectivo de aptámeros para varios objetivos, que se pueden distinguir bajo luz ultravioleta, en comparación con las señales del sensor colorimétrico que se distinguen utilizando luz visible (Shaban y Kim, 2021).

El mecanismo fundamental en el que se basan ampliamente muchos bioensayos con aptasensores fluorométricos es la transferencia de energía por resonancia de Forster (FRET). Este es un proceso en el que la energía se transfiere de un grupo donante excitado a una molécula aceptora, lo que conduce a una reducción en la emisión de fluorescencia del donante y un aumento en las intensidades de emisión de fluorescencia del aceptor. Dado que la eficiencia de transferencia de energía depende de la distancia, solo puede ocurrir en distancias menores que un radio crítico, conocido como radio de Förster. Por lo tanto, FRET es adecuado para estudiar la distancia entre dos moléculas o dos sitios vecinos en una macromolécula específica,

como pueden ser el cambio conformacional de proteínas, la interacción de proteínas y la actividad enzimática (Chen et al., 2012).

Los materiales fluorescentes que se suelen emplear son colorantes fluoróforos y/o nanopartículas fluorescentes como los puntos cuánticos (QD), las nanopartículas de oro (AuNP) y las nanopartículas de conversión ascendente (UCNP); ya que poseen propiedades ópticas inusuales y pueden actuar como donantes o extintores (Chen et al., 2012; Shaban y Kim, 2021). El reconocimiento entre aptámeros y analitos induce cambios conformacionales en el aptámero que puede desencadenar cambios en las propiedades de emisión fluorescente de los materiales fluorescentes. A través de estas conformaciones se pueden plantear diversas estrategias de activación y desactivación de la señal fluorescente (Shaban y Kim, 2021).

Deben existir una serie de requisitos entre un fluoróforo donador excitado y otro fluoróforo aceptor para que tenga lugar el proceso FRET, estos son: mantenerse a una distancia muy corta (10-100 Å), establecer una orientación espacial dipolo-dipolo para la transmisión de energía, tener un solapamiento entre los espectros de absorción del aceptor y emisión del donador, y además; deben tener una vida media relativamente larga para que el evento pueda ser medible (Liu et al., 2020).

Un ejemplo de este tipo de aptasensores lo tenemos en el estudio realizado por Wang y colaboradores (2020), representado en la figura 7, donde se diseñó un nuevo biosensor para *Escherichia coli*, basado en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre nanopartículas de conversión ascendente unidas a aptámeros (UCNP) como donantes y nanohojas de disulfuro de tungsteno (WS_2) en capas como aceptor efectivo. La superposición espectral entre la emisión de fluorescencia de UCNP y la absorción de WS_2 permite la aparición de FRET, lo que da como resultado la extinción de la fluorescencia de conversión ascendente. En presencia de *E. coli*, el aptámero específico se une preferentemente a *E. coli*, provocando cambios en la conformación del aptámero, un fenómeno que disocia las UCNP lejos de la superficie de las nanohojas WS_2 y, por lo tanto, recuperándose partes de la fluorescencia apagada de las UCNP. La señal fluorescente era proporcional a la concentración de *E. coli* y el aptasensor demostró tener una gran correlación lineal ($R^2 = 0,9929$). Esto fue determinado mediante la preparación de diluciones seriadas de concentraciones de *E. coli* desde las 85 a las 85×10^7 UFC mL⁻¹, con un límite inferior de detección (LOD) de 17 UFC/mL.

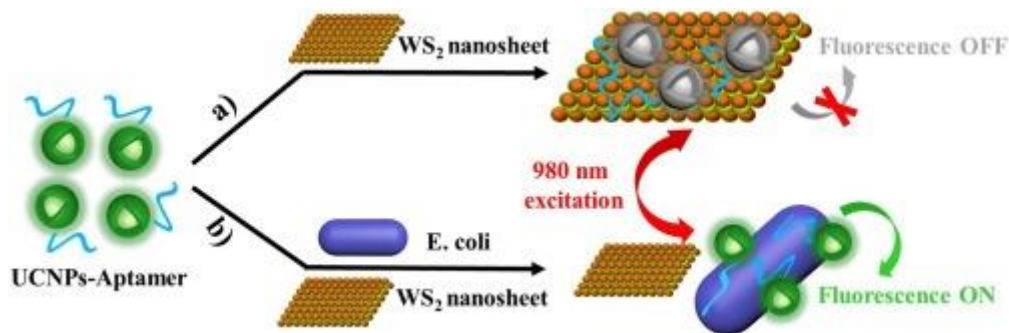


Figura 7. Aptasensor basado en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (Wang et al., 2020).

4.4 Aplicaciones de los aptasensores

4.4.1 Diagnóstico de cáncer

El diagnóstico precoz del cáncer es fundamental para el tratamiento de la enfermedad. La tomografía computerizada (CT), la resonancia magnética (MRI), la inmunohistoquímica, los análisis de biomarcadores de cáncer en suero (por ejemplo, utilizando un ensayo basado en anticuerpos como ELISA) y la citometría de flujo se emplean comúnmente para el diagnóstico de cáncer. Sin embargo, las bajas concentraciones de biomarcadores del cáncer en suero o plasma, mezclados con otras proteínas, hacen que el diagnóstico temprano del cáncer sea bastante complicado. Además, estos métodos podrían requerir mucho tiempo y mano de obra (Kulabhusan et al., 2020). En este contexto, los aptámeros surgen como una herramienta alternativa, emergente y prometedora para el diagnóstico y la obtención de información del cáncer. Esto se debe a la mayor sensibilidad que tienen estas moléculas por sus dianas, o lo que es lo mismo; su capacidad para detectar concentraciones más bajas del analito (Kulabhusan et al., 2020), además del abaratamiento de los costes y la sencillez de su uso.

Como ejemplo de la sensibilidad de éstos métodos, podemos mencionar el trabajo realizado por Borghei y colaboradores, donde se desarrolló un aptasensor colorimétrico simple basado en la agregación de nanopartículas de oro (AuNP), capaz de detectar células cancerígenas con un límite de detección de 10 células (Borghei et al., 2016).

Otro ejemplo de especificidad y afinidad de unión lo podemos encontrar en el estudio realizado por Shangguan y colaboradores, donde se logró encontrar experimentalmente, mediante técnicas fluorométricas, varios aptámeros que podría reconocer específicamente células leucémicas en aspirados de médula ósea humana en muestras clínicas reales y unirse a ellas con

una Kd en el rango de nanomolar a picomolar. Para la obtención de dichos aptámeros aplicaron el método de Cell-SELEX, eligiendo dos líneas de células tumorales hematopoyéticas como sistema modelo para la selección de aptámeros porque están bien estudiadas y consisten en células tumorales relativamente homogéneas. Una de ellas era una línea celular de leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células T precursoras cultivadas, como diana para la selección de aptámeros; y la otra una línea celular AB del linfoma de Burkitt humano, como control negativo para reducir el número de secuencias de ADN que podrían unirse a moléculas de superficie comunes presentes en ambos tipos de células (Shangguan et al., 2006).

4.4.2 Diagnóstico de enfermedades infecciosas bacterianas

Aunque los métodos para la detección y el control de bacterias patógenas están bien establecidos y estandarizados en entornos hospitalarios, estos métodos convencionales conllevan en muchas ocasiones varias desventajas. Por ejemplo, los métodos basados en el cultivo bacteriano y las pruebas metabólicas, ampliamente utilizados, pueden tardar varios días para la identificación de la bacteria patógena, un retraso inaceptable en situaciones de emergencia y de algunas infecciones como la sepsis (Chang et al., 2013). Además de que estas técnicas consumen mucho tiempo o requieren equipo sofisticado y personal altamente capacitado, lo que aumenta el costo del análisis (Torres-Chavolla y Alcocilja, 2009).

Por otro lado, los métodos de detección basados en la amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR, aunque puedan parecer idóneas por su gran sensibilidad y llevarse a cabo en cuestión de horas, estos métodos requieren de instrumentación costosa y procedimientos complejos que limitan el uso generalizado de estas tecnologías para el diagnóstico clínico (Chang et al., 2013). El uso de biosensores basados en anticuerpos también es una opción válida, pero a consecuencia de las desventajas que presentan, anteriormente mencionados, se ha probado el estudio de aptasensores para el diagnóstico de bacterias patógenas (Moon et al., 2015).

Por lo general, para la detección directa de bacterias, se suele utilizar el método Cell-SELEX para la obtención de aptámeros que puedan unirse mejor a las proteínas nativas inalteradas de la superficie celular. Mientras que, por otro lado, se utiliza el SELEX de proteínas para encontrar aptámeros que puedan unirse a intermediarios o metabolitos secundarios excretados en la sangre por dichas bacterias, en el caso que se requiera un diagnóstico indirecto de la enfermedad.

En un estudio de 2013, Chang y colaboradores, lograron desarrollar un método rápido, ultrasensible, de bajo costo y no basado en PCR, para detectar células individuales de *Staphylococcus aureus* utilizando nanopartículas de oro conjugados con aptámeros y un sistema de detección de dispersión de luz de resonancia. Como se comentó anteriormente, las nanopartículas de oro (AuNP) poseen fuertes propiedades de dispersión de luz que dependen de su tamaño de partícula, por lo que les convierte en un agente de contraste idóneo, y en una herramienta útil para la detección molecular ultrasensible. Además, los AuNP se pueden conjugar fácilmente con proteínas o moléculas de ADN modificadas a través de enlaces sulfhidrilo. Los aptámeros dirigidos a *S. aureus* se obtuvieron mediante SELEX basado en células, incubándose con *S. aureus* como selección positiva y con *S. epidermidis* como contraselección negativa, para evitar reacciones cruzadas con una bacteria del mismo género, además, ambos forman parte de la flora común de la piel. Las constantes de disociación (K_d s) que se determinaron para los aptámeros dirigidos a *S. aureus* rondaban la escala nanomolar, lo que indica su alta afinidad por la bacteria.

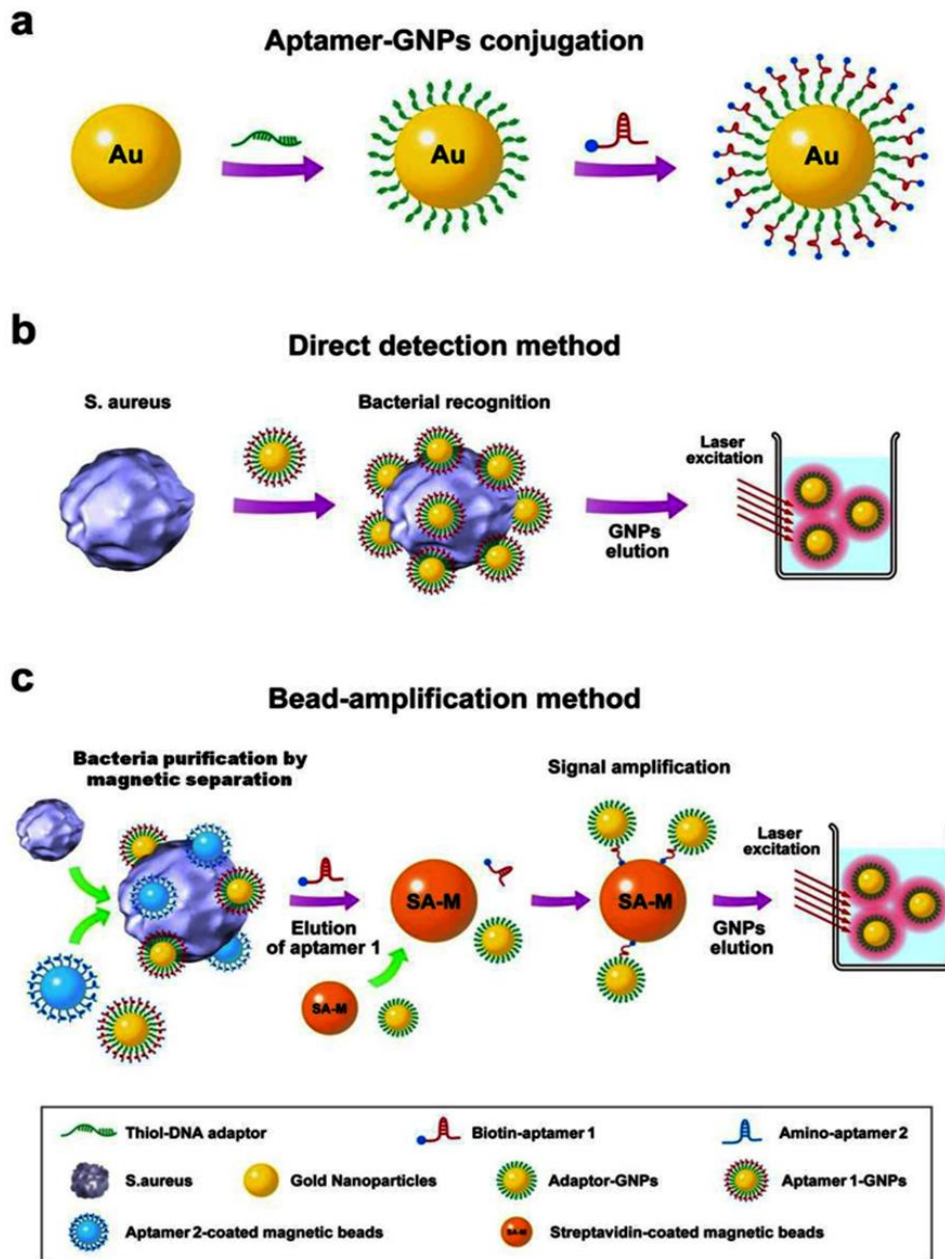


Figura 8. Esquema del aptasensor fluorométrico basado en nanopartículas de oro. a) Conjugación de las AuNP con los aptámeros mediante un adaptador de tiol. b) Método directo de detección. c) Método basado en la amplificación de la señal mediante el uso de perlas magnéticas, mejorando la señal de detección significativamente (Chang et al., 2013).

En ambos métodos, tras la unión del conjugado aptámero-AuNP a la bacteria, primero se eluyeron la fracción no unida y después se analizaron sus señales de dispersión de luz utilizando un lector de fluorescencia.

La detección de células individuales se logró en 1,5 horas sin necesidad de equipos costosos. Estas ventajas hacen de esta tecnología una opción atractiva para el desarrollo futuro de

pruebas de diagnóstico en el punto de asistencia sanitaria (*Point-of-Care Testing* - POCT) de patógenos y para el desarrollo de un posible sistema de detección multiplex rápido y sensible para patógenos comunes en entornos clínicos como las unidades de cuidados intensivos (Chang et al., 2013).

4.4.3 Diagnóstico en enfermedades parasitarias

Los recursos para el diagnóstico, tratamiento, seguimiento, prevención e investigación de las infestaciones parasitarias son insuficientes, por lo que la mayoría se catalogan como enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas. A ello se añade que, hasta el momento, no existe ninguna vacuna para su control y los medicamentos antiparasitarios producen graves efectos secundarios. Es urgente, entonces, buscar alternativas diagnósticas y terapéuticas de bajo costo, gran sensibilidad, especificidad, y fácil acceso. La obtención de aptámeros permitiría mejorar el diagnóstico y el tratamiento de infestaciones parasitarias como una alternativa de bajo costo, y fácil producción para su uso en regiones apartadas, ya que no requieren refrigeración, son de larga duración y no se degradan tan fácilmente como los anticuerpos (Ospina, 2020).

Actualmente, se investiga la obtención de aptámeros específicos contra diferentes dianas en parásitos como *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Leishmania infantum*, *Cryptosporidium parvum*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* (Ospina, 2020).

A modo de ejemplo mencionamos el estudio para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas realizado por Nagarkatti, y colaboradores, en 2012, donde adquirieron aptámeros de ARN estables en suero que se unen a tripomastigotes vivos de *Trypanosoma cruzi* (la forma extracelular del parásito infectiva en mamíferos) con una afinidad de unión de la constante de disociación (Kd) en un rango de 8 a 30 nM. Uno de estos aptámeros obtenidos (concretamente el Apt68); podía reconocer con gran especificidad los tripomastigotes de *T. cruzi*, diferenciándolos de otros tripomastigotes de parásitos relacionados, como *L. donovani* y *T. brucei* (Nagarkatti et al., 2012). Estos aptámeros específicos se obtuvieron incubándose con tripomastigotes vivos enteros de *T. cruzi*, incluyendo rondas de selección negativa para descartar las secuencias que se unían a componentes no específicos de los tripomastigotes. Los aptámeros pueden entonces utilizarse en estrategias de concentración de tripomastigotes en sangre para aquellos casos en los que el paciente tenga una baja concentración en sangre, y sea dificultoso su diagnóstico mediante otras técnicas.

Otro estudio realizado por el mismo grupo en 2014 obtuvo aptámeros de ARN contra antígenos excretados de tripomastigote (TESA), que son liberados en la sangre del huésped y se han estudiado como potenciales biomarcadores de la enfermedad. Los aptámeros se incubaron con una preparación concentrada de los antígenos TESA durante el procedimiento SELEX. Se utilizaron hasta un total de 10 rondas de SELEX, incluyendo rondas positivas y negativas para aumentar su afinidad específica por los TESA en sangre de ratón. Se determinó el aumento gradual de la afinidad de unión de los aptámeros por los TESA mediante un ensayo tipo ELISA, pero en lugar de utilizar anticuerpos, se utilizaron grupos de aptámeros biotinizados (ELA: aptámeros unidos a enzimas) procedentes de distintas rondas del proceso SELEX, a diferentes concentraciones. Estas concentraciones fueron 31, 125 y 500 nM, de las rondas 1, 2, 4, 6, 8 y 10; respectivamente, como se muestra en la figura 9 (Nagarkatti et al., 2014). Dichos resultados hacen palpable el aumento de afinidad de unión de los aptámeros a los TESA a medida que aumenta el número de rondas de selección SELEX.

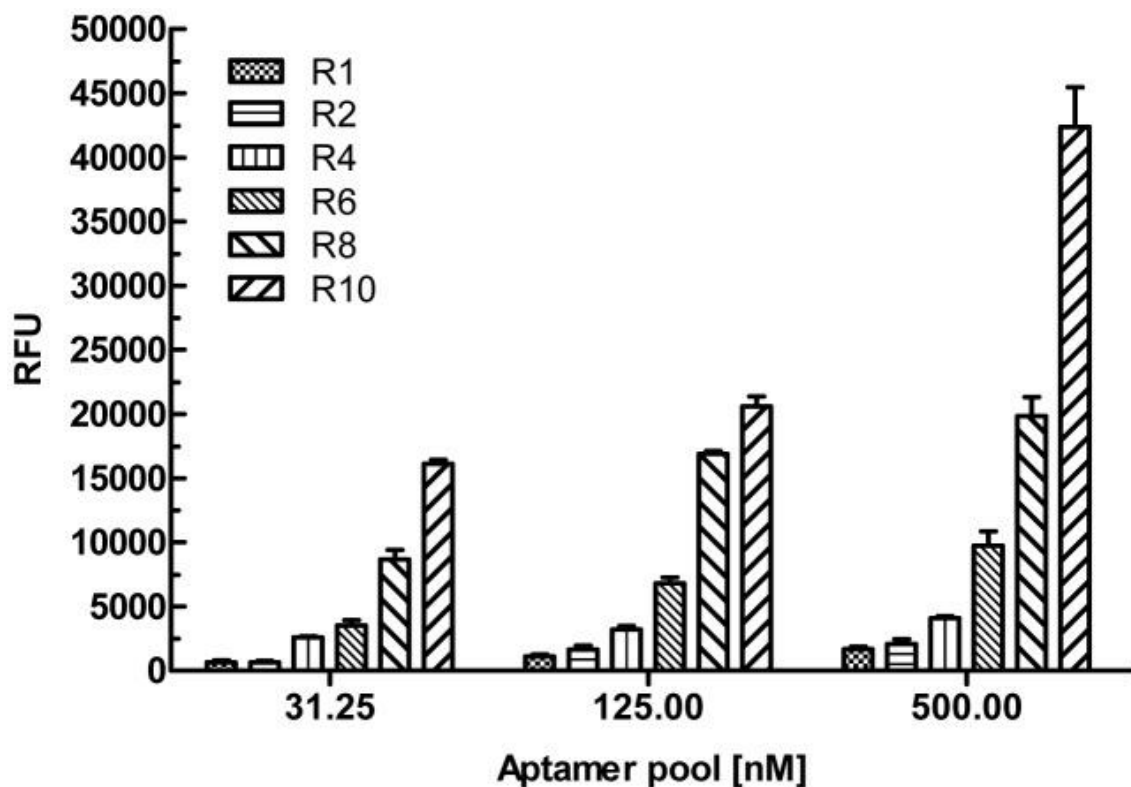


Figura 9. Gráfica de afinidad de los aptámeros biotinizados por los TESA. Eje Y: Unidades relativas de fluorescencia (RFU); Eje X: Concentración de aptámeros biotinizados (Nagarkatti et al., 2014).

Las formas extracelulares de tripomastigotes de *T. cruzi* y sus biomarcadores TESA pueden detectarse en individuos infectados mediante PCR con alta sensibilidad durante la fase aguda de la enfermedad cuando el número de parásitos circulantes es muy alto. Los problemas de

detección pueden venir durante otras fases como el periodo de incubación del parásito, donde el número de tripomastigotes es aún muy bajo; y durante la fase crónica, donde el número de parásitos circulantes en la sangre puede fluctuar con el tiempo y ser difícil de detectar mediante PCR. Uno de los aptámeros aislados en el estudio de Nagarkatti y colaboradores fue capaz de detectar estos biomarcadores circulantes tanto en la fase aguda, como en la fase crónica, por lo que se podría llegar a consolidar como una potencial herramienta de diagnóstico alternativo para *T. cruzi*.

Los métodos de diagnóstico mediante aptámeros anteriormente mencionados podrían ser una alternativa rápida, sencilla y económica a la hora de detectar biomarcadores de diferentes tipos de enfermedades infecciosas en pacientes con un bajo número de unidades infectivas.

4.4.4 Diagnóstico de enfermedades víricas

También hay numerosos estudios que avalan el potencial de los aptámeros para la detección, diagnóstico y terapia de distintos virus. Un ejemplo lo podemos encontrar en el estudio realizado por Gopinath et al., en 2006 donde consiguieron seleccionar un aptámero capaz de unirse con alta afinidad a la hemaglutinina del virus de la influenza tipo A y distinguir entre las diferentes cepas dentro del mismo subtipo del virus (H3N2). Este aptámero se une específicamente a la región de hemaglutinina (HA) de la cepa objetivo A/Panamá/2007/1999 (H3N2) sin reconocer otros virus de influenza humana, incluyendo otras cepas del mismo subtipo H3N2 (Gopinath et al., 2006). Cabe mencionar que, en la actualidad, la mayoría de los anticuerpos monoclonales (mAb) disponibles comercialmente contra HA no pueden distinguir entre los virus dentro de los subtipos de influenza. El aptámero seleccionado no solo mostró una alta capacidad de discriminación para unirse al HA, sino que también mostró una mayor afinidad (más de 15 veces) que el mAb. Además, el aptámero seleccionado inhibió eficazmente la fusión de membranas mediada por HA, por lo que su uso como terapia dirigida también tiene potencial. Gracias a la especificidad y al alto grado de discriminación que tienen los aptámeros otra aplicación podría ser el genotipado de virus (Gopinath et al., 2006).

Más recientemente, durante la pandemia mundial de COVID-19, aumentó el interés general en el desarrollo de métodos rápidos, fáciles de usar y selectivos para el diagnóstico efectivo del virus SARS-CoV-2. En 2021, el grupo de investigación de Zavyalova y colaboradores desarrollaron un prototipo de aptasensor óptico basado en la dispersión Raman mejorada por superficie (SERS), y compuesto por nanopartículas de plata y aptámeros específicos de la proteína S de superficie del SARS-CoV-2.

La espectroscopia Raman se basa en un fenómeno de dispersión de la luz para detectar un analito mediante vibraciones de enlaces moleculares. Cuando una muestra se expone a la luz láser, se dispersa una pequeña cantidad de fotones. La mayor parte de la dispersión de luz es dispersada elásticamente (conocida como dispersión de Rayleigh) que tiene la misma frecuencia que la luz incidente. Y una mínima parte de los fotones (aproximadamente 1 de cada 10^6 - 10^8) se dispersa inelásticamente (dispersión Raman), el cual sí resulta en cambios de frecuencia entre la luz incidente y la dispersa que pueden ser medidos en un espectro (Petersen et al., 2021). Al ser la dispersión Raman tan débil, es necesario usar sustratos SERS que puedan amplificar la señal para que pueda ser detectada por espectroscopía. Estos sustratos normalmente son nanopartículas metálicas capaces de aumentar la señal de Raman en varios órdenes de magnitud (normalmente entre 10^7 y 10^{14}) (Petersen et al., 2021).

En el caso del aptasensor en cuestión, los sustratos SERS utilizados fueron nanopartículas de plata (AgNP). Estas nanopartículas, en un medio con fuerza iónica alta, interactúan bien con las proteínas de la superficie del virus, formando agregados en su superficie (esto se cumple también con otros tipos de virus en las mismas condiciones), amplificando la señal de Raman. En la figura 10 se esquematiza el mecanismo de SERS para dicho aptasensor. Se añade al tampón buffer los aptámeros específicos para el virus SARS-CoV-2 marcados con una sustancia fluorescente y se incubó con el virus. De forma paralela, se incubó la misma mezcla con el virus de la *influenza A* como virus control. Acto seguido se añaden las AgNP. Las nanopartículas forman agregados en ambos tipos de virus por igual, la diferencia está en que los aptámeros específicos marcados se acumulan con mucha más concentración alrededor del SARS-CoV-2, dando como resultado un aumento de la intensidad de SERS con concentraciones más altas de SARS-CoV-2 y una disminución para los virus control al excitar la muestra con un láser de una longitud de onda de 532 nm. El límite de detección de dicha prueba fue de $5,5 \times 10^4$ TCID₅₀/mL (dosis de virus capaz de infectar al 50% de cultivos utilizados).

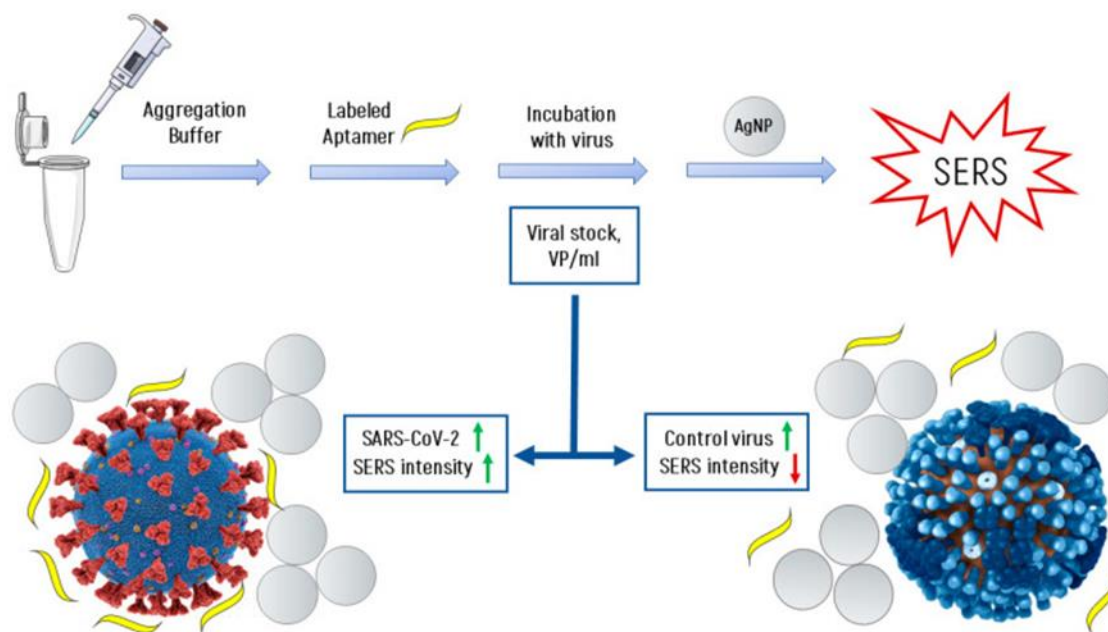


Figura 10. Esquema del funcionamiento del aptasensor fluorescente y la formación de la señal SERS (Zavalyova et al., 2021).

5 Conclusiones

Los aptámeros han demostrado ser moléculas de biorreconocimiento de enorme potencial para el diseño de biosensores gracias a su gran especificidad y amplio rango de dianas. Los datos de los estudios citados sobre el empleo de aptámeros en biosensores para el diagnóstico son muy prometedores, presentando grados de afinidad muy altos, con valores de K_d en el rango nanomolar-picomolar y con límites de detección bajos. Esto, junto a su gran versatilidad tanto en la selección durante el proceso SELEX, las diferentes modificaciones químicas, conjugaciones y diseño posterior del aptasensor usando diferentes estrategias de señalización, brindan a los aptámeros de una infinidad de posibilidades de ser desarrollados en multitud de aplicaciones con respecto al diagnóstico.

Pese a las numerosas ventajas descritas de los biosensores basados en aptámeros, la tecnología de aptámeros permanece aún en una etapa incipiente, en comparación con los biosensores basados en anticuerpos, requiriendo aún un mayor desarrollo e investigación para asegurar su uso generalizado, sobre todo para usos clínicos. Los resultados de los ensayos experimentales que se recaban en esta revisión pertenecen, en la mayoría de los casos, a prototipos de aptasensores que no están desarrollados para su comercialización. Siendo muchos de ellos

simplemente una plataforma aptasensora que necesita de otros métodos de transducción de la señal disponibles en el laboratorio, como por ejemplo un espectrofotómetro. Además, deben estudiarse a fondo las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los aptámeros.

Algunos de los problemas más graves que sufren los aptámeros de forma intrínseca son la disminución de la estabilidad *in vivo* a causa de las nucleasas y la rápida excreción renal. Las modificaciones químicas de los aptámeros antes mencionadas pueden mejorar estas propiedades farmacocinéticas y mejorar su biodisponibilidad en este sentido.

Cabe mencionar que el grado de reconocimiento de mercado del aptámero es bajo. Pocas empresas están dispuestas a pagar por la comercialización de patentes relacionadas con aptámeros. Esto puede revertirse si las investigaciones futuras se centran en desarrollar productos prácticos aplicables. De esta forma, se podría incrementar el grado de reconocimiento del mercado de aptámeros.

Por último, aunque los aptámeros son baratos, las modificaciones químicas, la matriz de inmovilización de aptámeros en los biosensores y los dispositivos de detección que acompañan al biosensor son costosos, lo que da como resultado que el coste total no sea significativamente más barato que los biosensores basados en anticuerpos existentes.

A pesar de la impresionante investigación y el progreso que se ha realizado en este campo, todavía hay margen para mayores refinamientos y, por lo tanto, una explotación futura más exitosa de todo su potencial como reactivos verdaderamente versátiles. Los datos actualmente disponibles indican que los aptasensores de diagnóstico son factibles y merecen una investigación y un desarrollo futuros.

6 Bibliografía

Abid SA, Ahmed Muneer A, Al-Kadmy IMS, Sattar AA, Beshbishy AM, Batiha GES, et al. Biosensors as a future diagnostic approach for COVID-19. *Life Sci.* 2021; 273: 119117.

Bakhtiari H, Palizban AA, Khanahmad H, Mofid MR. Novel approach to overcome defects of cell-SELEX in developing aptamers against aspartate β -hydroxylase. *ACS Omega.* 2021; 6(16): 11005–14.

Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* 2016; 60(1): 1–8.

Borghei YS, Hosseini M, Dadmehr M, Hosseinkhani S, Ganjali MR, Sheikhejad R. Visual detection of cancer cells by colorimetric aptasensor based on aggregation of gold nanoparticles induced by DNA hybridization. *Anal Chim Acta*. 2016; 904: 92–7.

Bucur B, Purcarea C, Andreescu S, Vasilescu A. Addressing the selectivity of enzyme biosensors: solutions and perspectives. *Sensors (Basel)*. 2021; 21(9): 3038.

Chang D, Zakaria S, Deng M, Allen N, Tram K, Li Y. Integrating deoxyribozymes into colorimetric sensing platforms. *Sensors (Basel)*. 2016; 16(12): 2061.

Chang YC, Yang CY, Sun RL, Cheng YF, Kao WC, Yang PC. Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Sci Rep*. 2013; 3: 1863.

Chen C, Zhou S, Cai Y, Tang F. Nucleic acid aptamer application in diagnosis and therapy of colorectal cancer based on cell-SELEX technology. *NPJ Precis Oncol*. 2017; 1(1): 37.

Chen M, Yu Y, Jiang F, Zhou J, Li Y, Liang C, et al. Development of Cell-SELEX technology and its application in cancer diagnosis and therapy. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(12): 2079.

Chen NT, Cheng SH, Liu CP, Souris JS, Chen CT, Mou CY, et al. Recent advances in nanoparticle-based Förster resonance energy transfer for biosensing, molecular imaging and drug release profiling. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(12): 16598.

Costa NG, Antunes JC, Paleo AJ, Rocha AM. A review on flexible electrochemical biosensors to monitor alcohol in sweat. *Biosensors*. 2022; 12(4): 252.

Damborský P, Švitel J, Katrlík J. Optical biosensors. *Essays Biochem*. 2016; 60(1): 91.

El-Husseini DM, Sayour AE, Melzer F, Mohamed MF, Neubauer H, Tammam RH. Generation and selection of specific aptamers targeting *Brucella* species through an enhanced cell-SELEX methodology. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(11): 6131.

Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346(6287):818–22.

Elskens JP, Elskens JM, Madder A. Chemical modification of aptamers for increased binding affinity in diagnostic applications: current status and future prospects. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(12): 1–31.

Gopinath SCB, Misono TS, Kawasaki K, Mizuno T, Imai M, Odagiri T, et al. An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits

haemagglutinin-mediated membrane fusion. *J Gen Virol*. 2006; 87(Pt 3): 479–87.

Guo KT, Paul A, Schichor C, Ziemer G, Wendel HP. Cell-SELEX: Novel perspectives of aptamer-based therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2008; 9(4): 668.

Gupta R, Kumar A, Kumar S, Pinnaka AK, Singhal NK. Naked eye colorimetric detection of *Escherichia coli* using aptamer conjugated graphene oxide enclosed Gold nanoparticles. *Sensors Actuators B Chem*. 2021; 329: 129100.

Hernández FJ, Hincapié JAB. Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. *Iatreia*. 2012; 25(2): 159–68.

Hori SI, Herrera A, Rossi JJ, Zhou J. Current advances in aptamers for cancer diagnosis and therapy. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(1): 9.

Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science (New York)*. 1994; 263(5152): 1425–9.

Komarova N, Kuznetsov A. Inside the black box: what makes SELEX better? *Molecules*. 2019; 24(19): 3598.

Kulabhusan PK, Hussain B, Yüce M. Current perspectives on aptamers as diagnostic tools and therapeutic agents. *Pharmaceutics*. 2020; 12(7): 1–23.

Liu L, He F, Yu Y, Wang Y. Application of FRET biosensors in mechanobiology and mechanopharmacological screening. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020; 8: 595497.

Maglio O, Costanzo S, Cercola R, Zambrano G, Mauro M, Battaglia R, et al. A quartz crystal microbalance immunosensor for stem cell selection and extraction. *Sensors (Basel)*. 2017; 17(12): 2747.

Manganiello L, De Sousa C. Estado del arte: aplicaciones de los sensores piezoeléctricos en la detección de elementos contaminantes en alimentos. *Rev Ing UC*. 2018; 25(3): 433–77.

Marshall ML, Wagstaff KM. Internalized functional DNA aptamers as alternative cancer therapies. *Front Pharmacol*. 2020; 11: 1115.

Moon J, Kim G, Park SB, Lim J, Mo C. Comparison of whole-cell SELEX methods for the identification of *Staphylococcus aureus*-specific DNA aptamers. *Sensors (Basel)*. 2015; 15(4): 8884.

Nagarkatti R, Bist V, Sun S, Fortes de Araujo F, Nakhasi HL, Debrabant A. Development of an aptamer-based concentration method for the detection of *Trypanosoma cruzi* in blood. PLoS One. 2012; 7(8): 43533.

Nagarkatti R, de Araujo FF, Gupta C, Debrabant A. Aptamer based, non-PCR, non-serological detection of Chagas disease biomarkers in *Trypanosoma cruzi* infected mice. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(1): 25.

Odeh F, Nsairat H, Alshaer W, Ismail MA, Esawi E, Qaqish B, et al. Aptamers chemistry: chemical modifications and conjugation strategies. Molecules. 2020; 25(1): 3.

Ospina JD. Aptamers as a novel diagnostic and therapeutic tool and their potential use in parasitology. Biomedica. 2020; 40: 148–65.

Petersen M, Yu Z, Lu X. Application of Raman spectroscopic methods in food safety: a review. Biosensors. 2021; 11(6): 187.

Radi AE, Abd-Ellatif MR. Electrochemical aptasensors: current status and future perspectives. Diagnostics. 2021; 11(1): 104.

Romero López, Berzal Herranz. Aptamers: biomedical interest and applications. Pharmaceuticals (Basel). 2017; 10(1): 32.

Sefah K, Shangguan D, Xiong X, O'Donoghue MB, Tan W. Development of DNA aptamers using cell-SELEX. Nat Protoc. 2010; 5(6): 1169–85.

Shaban SM, Kim DH. Recent advances in aptamer sensors. Sensors (Basel). 2021; 21(3): 1–31.

Shangguan D, Cao ZC, Li Y, Tan W. Aptamers evolved from cultured cancer cells reveal molecular differences of cancer cells in patient samples. Clin Chem. 2007; 53(6): 1153–5.

Shangguan D, Li Y, Tang Z, Cao ZC, Chen HW, Mallikaratchy P, et al. From the Cover: Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(32): 11838.

Sola M, Menon AP, Moreno B, Meraviglia-Crivelli D, Soldevilla MM, Cartón-García F, et al. Aptamers against live targets: is *in vivo* SELEX finally coming to the edge? Mol Ther Nucleic Acids. 2020; 21: 192–204.

Thivyanathan V, Gorenstein DG. Aptamers and the next generation of diagnostic reagents. Proteomics Clin Appl. 2012; 6(0): 563.

- Torres-Chavolla E, Alocilja EC. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens. *Biosens Bioelectron.* 2009; 24(11): 3175.
- Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990; 249(4968): 505–10.
- Villaescusa L. Producción de anticuerpos monoclonales. *Panor actual del Medicam.* 2017; 41: 1022–8.
- Wan Q, Liu X, Zu Y. Oligonucleotide aptamers for pathogen detection and infectious disease control. *Theranostics.* 2021; 11(18): 9133.
- Wang P, Wang A, Hassan MM, Ouyang Q, Li H, Chen Q. A highly sensitive upconversion nanoparticles-WS2 nanosheet sensing platform for *Escherichia coli* detection. *Sensors Actuators B Chem.* 2020; 320: 128434.
- Xu D, Xu D, Yu X, Liu Z, He W, Ma Z. Label-free electrochemical detection for aptamer-based array electrodes. *Anal Chem.* 2005; 77(16): 5107–13.
- Yang Y, Yang L, Ma Y, Wang X, Zhang J, Bai B, et al. A novel metal–organic frameworks composite-based label-free point-of-care quartz crystal microbalance aptasensing platform for tetracycline detection. *Food Chem.* 2022; 392: 133302.
- Zavyalova E, Ambartsumyan O, Zhdanov G, Gribanyov D, Gushchin V, Tkachuk A, et al. Sers-based aptasensor for rapid quantitative detection of sars-cov-2. *Nanomaterials.* 2021; 11(6): 1394.
- Zhou W, Jimmy Huang PJ, Ding J, Liu J. Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *Analyst.* 2014; 139(11): 2627–40.
- Zhuang Y, Liu L, Wu X, Tian Y, Zhou X, Xu S, et al. Size and shape effect of gold nanoparticles in “far-field” surface plasmon resonance. *Part Part Syst Charact.* 2019; 36(1): 1800077.