Juan David Ospina Villa

Aptámeros

Los nuevos anticuerpos

Editorial CES

Aptá-meros

Los nuevos anticuerpos

icmt
Instituto Colombiano de Medicina Tropical

Universidad CES
Un compromiso con la excelencia

Juan David Ospina Villa

Aptá-meros

Los nuevos anticuerpos

icmt
Instituto Colombiano de Medicina Tropical

Universidad CES
Un compromiso con la excelencia

Aptámeros: los nuevos anticuerpos. Juan David Ospina Villa – Medellín: Universidad CES, Instituto Colombiano de Medicina Tropical.

ISBN: 978-958-5101-75-3
102 páginas

1. Biología molecular 2. Genética 3. ARN 4. ADN 5. Genoma 6. Biotecnología

CDD: 572.8
Catalogación: Biblioteca Fundadores, Universidad CES.

Aptámeros: los nuevos anticuerpos

ISBN 978-958-5101-75-3
ISBNe 978-958-5101-76-0
Primera edición: mayo de 2023

© Juan David Ospina Villa
© Universidad CES
© Instituto Colombiano de Medicina Tropical
© Editorial CES
Dirección: Editorial CES
Calle 10 A No 22-04,
teléfono 4440555, ext. 1154
https://editorial.ces.edu.co
editorial@ces.edu.co

Medellín, Colombia

Impresión: Divegráficas SAS

Impreso y hecho en Colombia

Este libro cumple con lo dispuesto por la normativa colombiana que regula el depósito legal, con el fin de «garantizar su conservación e incrementar la memoria cultural del país». Las ideas expresadas en esta publicación por los autores, no comprometen a la Universidad CES o a su Editorial frente a terceros. Está prohibido el uso total o parcial de esta obra sin autorización escrita de la de la Universidad CES y el Instituto Colombiano de Medicina Tropical, salvo las excepciones legales vigentes.

Dedicatoria

A mi hijo, mi mayor logro, mi orgullo. A todas las personas que estuvieron presentes en los malos momentos dándome su apoyo incondicional. A mi yo del pasado que siempre muy romántico creyó en la idea de publicar un libro y luchó contracorriente para que esto fuera posible. A todos esos científicos locos que a pesar de ser señalados siguieron adelante con sus ideales de verdad.

"Lo bueno de la ciencia es que es verdad, creas o no en ella"

Neil deGrasse Tyson

Agradecimientos

Al ICMT-CES por confiar en mí y abrirme las puertas para ser lo que siempre soñé, un Científico. Agradezco a Miryan Margot, que con su personalidad única me enseñó a luchar por lo que quiero. Laurence Marchat, que creyó en mí y me adoptó como un "hijo". A Nancy Guillén, la mujer más brillante que he conocido en mi vida. Ellas tres me formaron y me apoyaron durante el proceso de aprendizaje en esta loca y apasionante carrera.

Gracias a Daniel Guzmán por sus aportes y visión crítica para mejorar algunas secciones del libro.

Agradezco de forma muy especial a Dr. Larry Gold y Dr Jack Szostak, pioneros en la creación de la estrategia SELEX para obtener los aptámeros, que aceptaron contarme su experiencia y que sin duda aportaron muchísimo para enriquecer este libro.

Al Dr. Víctor González gran científico que accedió a contarnos acerca del presente y futuros de los aptámeros.

Gracias a todas estas personas que hicieron posible la publicación de este libro.

Sobre el autor

Investigador del Instituto Colombiano de Medicina Tropical - Universidad CES. Bacteriólogo y Laboratorista Clínico, magíster en Ciencias en Biomedicina Molecular, doctor en Ciencias en Biotecnología.

Prólogo

En 2020, dos eventos importantes elevaron al ARN a una nueva prominencia mundial en el campo de la ingeniería genética. El Premio Nobel de Química otorgado por el desarrollo de la tecnología CRISPR/Cas9 que ha abierto aplicaciones farmacéuticas y medicinales de precisión. Esta tecnología implica un complejo proteico llamado Cas9 que actúa como una tijera genética modificadora del genoma; una molécula de ARN es la guía de Cas 9 que garantiza la precisión de corte en el genoma. En el campo de la inmunología, el ARN permitió responder rápida y eficazmente a la pandemia de COVID-19, en esta movilización revolucionaria se involucró tanto la academia como la biotecnología, y en un esfuerzo sin precedentes se contuvo la propagación del virus SARS-CoV-2 con la aplicación de vacunas para humanos basadas en el ARN mensajero.

Claramente, la biotecnología basada en el ARN nos promete nuevas revoluciones en el mundo medicinal; una de ellas en ebullición es la utilización de aptámeros en medicina. Los aptámeros de ARN son pequeñas moléculas capaces de unirse a una amplia gama de moléculas de interés con alta afinidad y especificidad. Los aptámeros se obtienen por reacciones químicas y su producción es relativamente fácil y poco costosa.

En la escala de la investigación académica, los aptámeros se han desarrollado y utilizado ampliamente como herramientas antagonistas de funciones vitales específicas, como marcadores de diagnóstico, como biosensores; además, como plataforma de purificación de proteínas para muchas aplicaciones farmacéuticas y clínicas. La estructura terciaria de los aptámeros de ARN, y los sitios de interacción ARN-proteína, son la base para metas novedosas en la búsqueda de nuevos fármacos. Se espera que, con el desarrollo tecnológico a media y grande escala, los aptámeros de ARN sean producidos para proponer una nueva generación de fármacos eficaces en el tratamiento de innombrables afecciones incluyendo las enfermedades parasitarias, para las cuales, el diagnóstico, el tratamiento, el seguimiento, la prevención y la investigación son insuficientes.

Dra. Nancy Guillén
Investigadora Emérita
Centro Nacional de Investigación Científica (CNRS – Francia)
Instituto Pasteur (París – Francia)

Contenido

Introducción **19**

Capítulo 1. Anticuerpos **23**
1. Historia 23
1.1. Gregor Mendel 23
1.2. Paul Ehrlich 23
1.3. Edward Jenner 24
1.4. Variolización 26
1.5. Louis Pasteur 29
1.6. Ingeniería genética 31
2. Estructura de los anticuerpos 33
3. Anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales 34
3.1. Inmunoterapia 35
3.2. Identificación de marcadores fenotípicos 35
3.3. Inmunodiagnóstico 35
3.4. Caracterizar niveles de expresión génica 36
3.5. Procedimientos en investigación 36
4. Anticuerpos monoclonales terapéuticos 36
5. Anticuerpos monoclonales bi-específicos 37
6. Nanoanticuerpos 38

Capítulo 2. Aptámeros **41**
2.1. Historia 41
2.1.1. Biología Molecular 41
2.1.2. Mundo del ARN 42
2.2. Gerald Joyce 44
2.3. Larry Gold 45
2.4. Ellington y Szostak 46
3. ¿Cómo reconocen los aptámeros su blanco? 48
4. Entrevistas Dr. Larry Gold y Dr. Jack Szostak 49

Capítulo 3. Estrategia SELEX **63**
3.1. Evolución *in vitro* 63
3.2. Bibliotecas 65
3.3. Moléculas blanco 67
3.4. Selección positiva y negativa 69
3.5. Identificación de los aptámeros 70
3.6. Nuevos tipos de SELEX 71
3.6.1. Cell-SELEX 72
3.6.2. Counter-SELEX 72
3.6.3. Capillary Electrophoresis-CE-SELEX 72
3.6.4. Microfluidic-SELEX 73
3.6.5. Genomic-SELEX 73
3.6.6. Chimeric SELEX 73
3.7. SELEX versus inteligencia artificial 73

Capítulo 4. Aptámeros versus Anticuerpos **77**
4.1. Tiempo de obtención 77
4.2. Tamaño 78
4.3. Estabilidad 78
4.4. Variación lote a lote 79
4.5. Modificaciones químicas 79
4.6. Obtención *in vitro* 79
4.7. Costo 79
4.8. Nueva generación de aptámeros 80

Capítulo 5. Aplicaciones de los aptámeros **83**
5.1. Herramienta terapéutica 83
5.2. Diagnóstico de enfermedades 83
5.3. Control ambiental 83
5.4. Acarreador de medicamentos 84
5.5. Imagenología 84
5.6. Búsqueda de biomarcadores 86
5.7. Entrevista Dr. Víctor M. González 86

Capítulo 6. Perspectivas ¿Podrán los aptámeros reemplazar a los anticuerpos? **93**

Referencias **97**

Anexo. Protocolos SELEX **101**
7.1. SELEX para obtener aptámeros contra una proteína purificada en platos de ELISA 101
7.2. SELEX para identificar el sitio de unión de una proteína sitio específica al ARN (Protocolo adaptado de Manley 2013) 101

Introducción

Gregor Mendel "el padre de la genética" fue el primero en instalar los principios de la transmisión de la herencia en 1865. Casi un siglo después, a mediados del siglo XX, se dio la edad dorada de los descubrimientos en genética, cuando se definió de forma clara y concisa la estructura y función del código genético. El dogma central de la biología molecular dictaba que el Ácido desoxirribonucleico (ADN) era la molécula más importante encargada de almacenar la información genética en todos los seres vivos, el Ácido ribonucleico (ARN) la molécula intermediaria encargada de transportar dicha información fuera del núcleo para, posteriormente con ayuda de la maquinaria ribosomal, producir las moléculas funcionales por excelencia que son las proteínas, las cuales llevan a cabo los procesos celulares necesarios para la vida.

Sin embargo, pocos años después, en 1962 Alexander Rich y luego en 1986 Walter Gilbert, proponen la teoría del "Mundo del ARN", que da un vuelco total al dogma central de la biología molecular. Después de recoger evidencia sobre la existencia de algunos viroides en los cuales el material genético está compuesto solo por ARN como almacenador de la información genética y, además, descubrir la capacidad del ARN de ser parte de los ribosomas como molécula funcional. Los científicos se dieron cuenta que los modelos planteados previamente no eran universales. Esta teoría plantea que el ARN fue la primera molécula en existir en el cultivo primordial. Esto debido a que el ARN es menos complejo que el ADN, tiene la capacidad de autorreplicarse y posee también una actividad catalítica (ribozimas) que le permitiría cumplir con todas las funciones necesarias para la vida. Las moléculas de ADN aparecerían después como una forma más compleja y especializada de resguardar la información genética y habrían evolucionado a partir del ARN.

De hecho, en parte apoyando esta teoría, en 1990 se descubrió que los ARN tenían una función desconocida hasta ese momento. Fueron obtenidas moléculas de este ácido nucleico con la capacidad de reconocer blancos específicos (proteínas, colorantes, entre otros) con alta afinidad y sensibilidad, tal como lo hacen los anticuerpos monoclonales. A estos ARN se les conoció en primer lugar como "anticuerpos químicos" o aptámeros (de la raíz griega *aptus* - que encaja y la raíz latina *mers* - molécula), podían ser creados totalmente *in vitro* (a diferencia de los anticuerpos que se obtienen a partir de modelos biológicos) y diseñados para reconocer cualquier tipo de blanco, fuese o no inmunogénico.

El contenido nucleotídico de los aptámeros les confiere la capacidad de adoptar estructuras tridimensionales (3D) únicas e intrincadas, que les permiten adaptarse a los blancos que reconocen por medio de un acoplamiento molecular nunca visto. El proceso mediante el cual se obtienen los aptámeros es conocido como estrategia SELEX por sus siglas en inglés, *Selection of Ligands by Exponential Enrichment* o su equivalente en español, Selección de Ligandos mediante Enriquecimiento Exponencial. Esta estrategia fue descubierta y patentada por Larry Gold en 1993, hoy en día es reconocida como la técnica mediante la cual se obtienen los aptámeros. El SELEX fusiona varias técnicas químicas y de biología molecular que permite obtener moléculas de ARN (más adelante se empezó a utilizar ADN también) afines por un blanco particular sin uso de modelos biológicos. El SELEX también es conocido como la primera técnica de "evolución *in vitro*", debido a que los aptámeros son "seleccionados" por medio de ella para reconocer una molécula específica y solo las más "aptas" debido a la forma única que adoptan en su estructura 3D pueden hacerlo.

Los aptámeros han sido adoptados por científicos y empresas dedicadas a la producción de biológicos para ser utilizados en múltiples aplicaciones: diagnóstico de enfermedades infecciosas y no infecciosas, novedosas herramientas terapéuticas, acarreadores de medicamentos, biosensores, detectores de toxinas y contaminantes, entre muchas otras.

En este libro se resume la historia de los anticuerpos, la historia de los aptámeros, la estrategia SELEX, las aplicaciones de los aptámeros, y se plantea la discusión acerca de si es posible que los aptámeros reemplacen a los anticuerpos en un futuro cercano. ¿Podrán los aptámeros ser los nuevos anticuerpos y reemplazarlos?

Capítulo 1. Anticuerpos

1. Historia

1.1. Gregor Mendel (1822-1884)

Gregor Johann Mendel era un monje y botánico austriaco que con su trabajo logró ser reconocido como "El padre de la genética". Mendel estudió la transmisión de los rasgos hereditarios en la planta del guisante, usando alrededor de treinta mil plantas a lo largo de sus experimentos. Implementó términos como carácter dominante (para aquel rasgo que se expresaba en la siguiente generación) y carácter recesivo (para aquel rasgo que no se expresaba en la siguiente generación). Posteriormente, realizó el cruce de las generaciones filiales y logró de forma relativamente sencilla explicar cómo evolucionan los rasgos que podrían explicar la evolución de todos los seres vivos. Luego de analizar los resultados obtenidos con sus experimentos, Mendel promulgó sus famosas leyes. Las "leyes de Mendel" que se han convertido con los años en los principios fundamentales de la biología. Sus conclusiones más relevantes fueron: que diferentes rasgos son heredados independientemente unos de otros, no existe relación entre ellos y, por tanto, el patrón de herencia de un rasgo no afectará el patrón de herencia de otro. Su trabajo sería reconocido solo treinta años después de haber sido publicado, cuando el término gen se popularizó y su trabajo pudo cobrar trascendencia.

1.2. Paul Ehrlich (1854-1915)

La primera vez que se usó el término "anticuerpo" fue en un texto de Paul Ehrlich, donde "Antikörper" (la palabra alemana para anticuerpos) aparece en la conclusión de su artículo "Los estudios experimentales sobre la inmunidad", publicado en octubre de 1891. Paul Ehrlich fue un gran científico, médico y bacteriólogo alemán que siempre soñó con descubrir una "bala mágica" para atacar solo a los agentes infecciosos, sin causar efectos secundarios en el huésped. Esto sentó un precedente muy importante que le hizo merecedor del título de "El padre de la quimioterapia" y del premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1908.

1.3. Edward Jenner (1749-1823)

En mayo de 1796 el científico británico Edward Jenner, sin conocer plenamente la existencia de los anticuerpos, ya había descubierto su utilidad práctica. Él estudió la viruela humana (altamente mortal) y la viruela bovina (una enfermedad auto resolutiva) y cómo esta última podría conferir resistencia para no padecer la viruela humana.

La investigación se sustenta en el caso de Sarah Nelms, una recolectora de leche que presentaba lesiones frescas de viruela bovina en sus manos y brazos. Este virus suele ser benigno y se cura sin ningún tratamiento en veintiún días aproximadamente. La viruela vacuna era muy común entre las personas que trabajaban manipulando el ganado. En cuanto a la viruela humana, ha sido la enfermedad infecciosa que más vidas ha cobrado en la historia de la humanidad en un siglo, superando a la peste negra que azotó a Europa, Asia y África entre 1347 y 1353 causando entre ochenta y doscientos millones de muertes. Se calcula que la viruela pudo haber cobrado la vida de quinientos millones de personas en todo el mundo solo en el siglo XX. Los sobrevivientes quedaron con lesiones desfigurantes de por vida y ceguera en los casos donde la córnea se vio afectada.

El material recolectado de las secreciones de las lesiones de Sarah Nelms, fue utilizado por Jenner como inóculo para que James Phipps, un joven de 8 años, fuera el primer vacunado de la historia (figura 1). Jenner sabía con anterioridad que las personas que contraían la viruela bovina sufrían una enfermedad leve que los protegía de la viruela humana. Jenner indagó en esta observación y llegó a la conclusión de que la primera de alguna forma desconocida protegía de la segunda. James Phipps luego de ser vacunado con secreciones de lesiones de viruela vacuna fue inoculado más de veinte veces con secreciones de lesiones de viruela humana y nunca sucumbió ante la enfermedad. El proceso había sido exitoso.

El término vacuna proviene de la viruela vacuna (que afecta a las vacas). Para hacer un poco de justicia, es importante mencionar que en 1774 Benjamín Jesty y en 1791 Peter Plett, ya habrían realizado este mismo procedimiento.

Figura 1. Edward Jenner inoculando a James Phipps, un joven de 8 años contra la viruela.
Tomada de: Shutterstock.com [1]

Sin embargo, como suele suceder en la historia de la ciencia, el crédito lo recibe quien tenga mejor documentado el procedimiento y ninguno de ellos documentó mejor sus experimentos que Edward Jenner. De hecho, en 1798 Jenner publicó un libro que contenía todas sus hipótesis y experimentos, dejando claro sus procedimientos y conclusiones (figura 2).

1.4. Variolización

Es necesario resaltar que, para el tratamiento de la viruela, existía un procedimiento llamado variolización. Hay registros antiguos provenientes de China, India, Turquía e incluso de África donde se utilizaba este procedimiento para contener la viruela humana.

La variolización consistía en realizar una incisión en la piel del paciente, poner polvo de las costras de viruela y cerrar la incisión. El paciente era aislado y se esperaba que desarrollara la enfermedad de forma leve y pudiera recuperarse. Incluso, en algunos lugares de África se utilizaba la ropa de pacientes recuperados para cubrir a los niños que tenían heridas variolosas, con la intención (sin entender realmente la causa) de dar protección cruzada a los nuevos enfermos. La variolización fue conocida en Europa a principios del siglo XVIII y se esparció rápidamente.

Figura 2. Portada del Libro publicado por Edward Jenner en 1798, producto de sus investigaciones sobre la viruela.
Tomada de: imagen de dominio público

AN

INQUIRY

INTO

THE CAUSES AND EFFECTS

OF

THE VARIOLÆ VACCINÆ,

A DISEASE

DISCOVERED IN SOME OF THE WESTERN COUNTIES OF ENGLAND,

PARTICULARLY

GLOUCESTERSHIRE,

AND KNOWN BY THE NAME OF

THE COW POX.

BY EDWARD JENNER, M.D. F.R.S. &c.

——— QUID NOBIS CERTIUS IPSIS
SENSIBUS ESSE POTEST, QUO VERA AC FALSA NOTEMUS.
LUCRETIUS.

London:

PRINTED, FOR THE AUTHOR,

BY SAMPSON LOW, N°. 7, BERWICK STREET, SOHO:

AND SOLD BY LAW, AVE-MARIA LANE; AND MURRAY AND HIGHLEY, FLEET STREET.

1798.

M. Pasteur.
AN INOCULATION FOR HYDROPHOBIA.—From "L'Illustration."

Cabe anotar que, este procedimiento era bastante peligroso, algunos pacientes enfermaban gravemente debido a que se inyectaba pus de lesiones recientes con alta carga de virus, lo que podría agravar los síntomas y también transmitir otras enfermedades.

1.5. Louis Pasteur (1822-1895)

El siguiente hecho histórico relevante en el que se utilizó una vacuna fue en 1885. Un niño de 9 años llamado Joseph Meister, que había sido mordido catorce veces por un perro rabioso, fue llevado a las instalaciones del laboratorio (que también era su casa) del bacteriólogo francés Louis Pasteur.

Aunque él no era médico y había experimentado solo con perros hasta ese momento, aceptó el desafío y probó su vacuna antirrábica con el joven Joseph al que le esperaba una muerte inminente si continuaba el curso de la enfermedad (figura 3). El tratamiento duró diez días y fueron doce inyecciones que contenían el virus atenuado. El procedimiento fue todo un éxito. Después de que se conociera su trabajo en todo el mundo, cientos de personas acudieron al laboratorio de Pasteur para recibir su vacuna antirrábica.

Figura 3. Louis Pasteur supervisando la aplicación de la vacuna antirrábica. **Tomada de:** Shutterstock.com [3]

El 14 de noviembre de 1888 se inauguró el Instituto Pasteur en París, donde se llevaron a cabo investigaciones para el tratamiento y control de enfermedades como la rabia, el tétano, difteria, poliomielitis y otras enfermedades virales. Hoy en día, el Instituto Pasteur es una de las instituciones más prestigiosas del mundo dedicada a la investigación en diferentes áreas (figura 4).

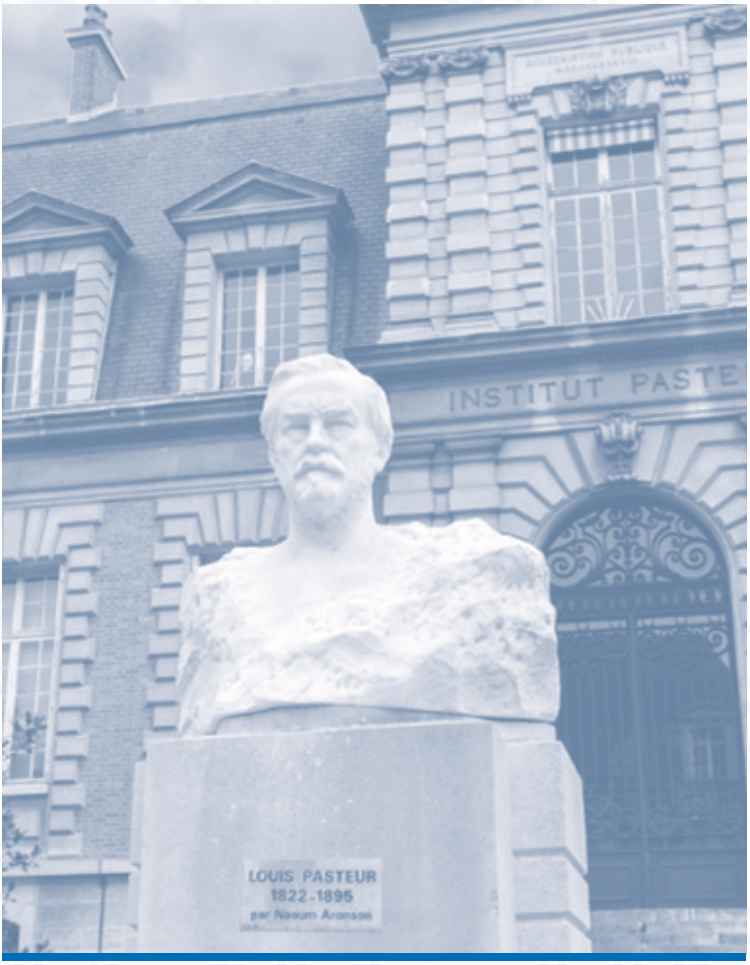

Figura 4. Instituto Pasteur en París, Francia inaugurado en 1890
Tomada de: Shutterstock.com [4]

Tanto Pasteur como Jenner utilizaron microorganismos vivos o atenuados. Una estrategia novedosa y revolucionaria en ese momento. Sin embargo, siempre existía el riesgo de llegar a producir la infección activa si la inactivación o atenuación del microorganismo no se llevaba a cabo de la forma correcta. Con el pasar de los años, la vacunación fue masivamente aplicada sin que los principios cambiaran mucho.

1.6. Ingeniería genética

Aproximadamente cien años después del éxito del Instituto Pasteur, en 1983, se produciría una gran modificación en la producción de vacunas, esto es, la introducción de la ingeniería genética para la producción de proteínas recombinantes. Este término se refiere a la producción de proteínas en células o líneas celulares diferentes a la célula original. Es decir, se utilizan organismos heterólogos que crecen más rápidamente, como es el caso de las bacterias. El material genético de otra especie puede ser proveniente de bacterias, parásitos, plantas, mamíferos e incluso humanos, este se inserta en el genoma de un microorganismo como las bacterias y levaduras con el fin de que produzca las proteínas de forma masiva y más rápida que el organismo original.

Como ejemplo, imaginemos por un momento que en la cumbre del Aconcagua o en cierta región del Amazonas crece una planta que en sus flores produce un tipo de alcaloide. Este tiene una preferencia por destruir las células cancerígenas, mas no las células sanas. Pero el acceso a esta planta tiene varios inconvenientes: el ciclo de vida para que florezca tarda alrededor de diez años, la cantidad de flores que produce es limitada, además, con cien plantas no se podrían generar ni una dosis terapéutica, y su manipulación *in vitro* para propagarse no ha podido ser descifrada. Lo que sí se ha realizado con éxito es la secuenciación de su genoma que ha permito identificar los genes blanco que producen los metabolitos anticancerígenos.

Estos genes pueden ser amplificados a partir de muestras de ARN de la propia planta o sintetizados químicamente, asimismo, pueden ser incorporados al genoma de un organismo receptor a través de vectores o plásmidos.

Los organismos receptores crecen rápidamente, pueden ser mantenidos en condiciones de laboratorio y producir el alcaloide anticancerígeno sin depender de un sustrato del suelo, el clima; si es de día o de noche, o incluso si hay predadores en el ambiente. Así se produce un metabolito recombinante, tomando el ADN de una planta e insertándolo en un organismo hospedero de diferente especie.

La idea de producir proteínas recombinantes es usarlas como antígeno, de ese modo se evita usar microorganismos completos que puedan llegar a causar

una infección activa. Una proteína por sí sola puede activar al sistema inmune, pero no causa una infección, ya que carece de otros componentes para la replicación como los ácidos nucleicos y las demás estructuras que causan patogenicidad. Para realizar este procedimiento debe identificarse el gen que codifica para la proteína de interés. Hoy gracias a las tecnologías desarrolladas en secuenciación, a los datos depositados en las bases de datos públicas y a las herramientas bioinformáticas creadas para analizar los datos se pueden identificar estos genes.

El o los genes candidatos son amplificados por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir del genoma del microorganismo elegido. También, con los avances de la biología sintética contamos con la síntesis química del ADN. Esta es de gran utilidad cuando la manipulación del organismo patógeno representa un riesgo para el personal o cuando no se cuenta con las instalaciones necesarias para la manipulación de éste. Luego de obtener el gen, este es clonado en un vector o plásmido para obtener el mayor número de copias. Este proceso puede tener múltiples pasos de verificación que pueden realizarse con enzimas de restricción, electroforesis, PCR y secuenciación.

Posteriormente, es subclonado en un vector de expresión y transformado (insertado en células no animales como bacterias y levaduras) o transfectado (insertado en células animales como en líneas celulares inmortalizadas).

Las células más utilizadas para producir proteínas recombinantes son las bacterias como *Escherichia coli* y *Bacillus subtillis* que permiten la producción de proteínas en corto tiempo y a bajo coste, pero no son ideales para la producción de proteínas de organismos eucariotas, ni con un alto peso molecular. Levaduras como *Pichia Pastoris* y *Saccharomyces cerevisae* tienen alto rendimiento al momento de producir proteínas eucariotas con modificaciones postraduccionales. Sin embargo, uno de los inconvenientes de este modelo es el proceso de glicosilación, diferente al que realizan las células en los mamíferos.

También son usadas células de insecto, que permiten expresar de buena manera proteínas intracelulares, pero cuya mayor dificultad es la transformación, debido a que se deben usar bacuolavirus (virus de

ADN que actúan como vectores conteniendo el gen de interés) y los medios de cultivos son costosos. Finalmente, las líneas celulares de mamíferos como CHO (*Chinese Hamster Ovarias*) y HEK293 (*Human Embryonic Kidney*), son el sistema de elección para producción de proteínas terapéuticas y usadas como vacunas en humanos.

Las proteínas obtenidas de estas líneas celulares adquieren un adecuado plegamiento y todas las modificaciones postranscripcionales necesarias, pero debido a su uso final requieren mayor tiempo de producción e inversión en los que se garantice buenas prácticas de manufactura y altos estándares de purificación.

Por medio de la ingeniería genética se han obtenido proteínas que han servido de inóculo para la fabricación de vacunas y también proteínas terapéuticas como la insulina. La primera vacuna que se comercializó de este tipo fue la proteína de superficie HBsAg contra la hepatitis B en 1986 con una efectividad probada del 95 %.

El virus de la hepatitis B se transmite por medio de fluidos como la sangre, semen (transmisión sexual) u otros fluidos. Puede ocasionar una afección moderada en el hígado o causar un daño para toda la vida, ocasionando cirrosis, cáncer hepático, e incluso la muerte.

Otras vacunas obtenidas por este procedimiento fueron utilizadas para combatir enfermedades como cólera, difteria, tétano y tos ferina, que han reducido el número de casos en todo el mundo hasta en un 90 %.

2. Estructura de los anticuerpos

La típica representación en forma de "Y" de los anticuerpos, es quizás una de las imágenes más icónicas de la historia de la ciencia. Los anticuerpos hacen parte de la respuesta inmune humoral que busca neutralizar, señalar y destruir agentes patógenos, mientras que la respuesta inmune celular se refiere al ataque directo de los agentes patógenos (bacterias, virus, parásitos) por medio de células como macrófagos, neutrófilos, células *natural killer*, entre otras.

Figura 5. Representación esquemática de la estructura de los anticuerpos.
Tomada de: Shutterstock.com [5]

La estructura en forma de "Y" de los anticuerpos representa sus cuatro cadenas polipeptídicas. Dos cadenas livianas de 220 aminoácidos y dos cadenas pesadas de 440 aminoácidos. Estas cadenas permanecen unidas por medio de puentes disulfuro covalentes y enlaces no covalentes (figura 5).

Por otro lado, los anticuerpos disponen de una sección conocida como región constante (Fc) que le permite unirse a los receptores de las células inmunes. También cuentan con una región variable (Fb) que posibilita reconocer a los antígenos. La región dependerá de la célula plasmática que produce el anticuerpo. Esta variabilidad le permite al sistema inmune generar múltiples anticuerpos contra un mismo patógeno (figura 6).

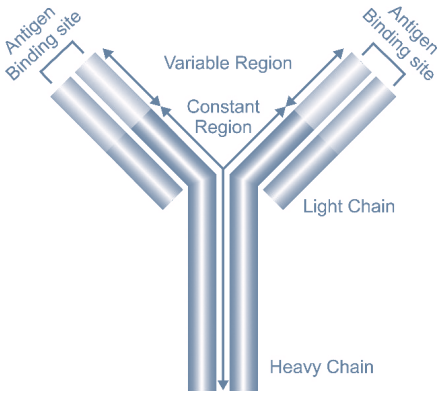

Figura 6. Región constante y regiones variables de los anticuerpos.
Tomada de: Shutterstock.com [6]

3. Anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales

Los antígenos reconocidos por los anticuerpos son generalmente proteínas de superficie de los microorganismos que ocasionan la infección. El sitio reconocido por el anticuerpo en el antígeno es conocido como epítope. Las células plasmáticas que son las encargadas de producir los anticuerpos generan una gran cantidad de estos en contra de muchos epítopes de un mismo antígeno. En el suero humano, por ejemplo, se encontrarán múltiples anticuerpos producidos por múltiples clonas de las células plasmáticas. Estos son conocidos como anticuerpos policlonales. Esta producción de anticuerpos garantiza que un antígeno sea neutralizado al bloquear diferentes epítopes, lo que le da una ventaja significativa al sistema inmune. Sin embargo, para uso en investigación, diagnóstico o tratamiento no resulta conveniente la utilización de anticuerpos policlonales, por la elevada posibilidad de obtener reactividad cruzada entre diferentes antígenos.

Es por esto por lo que, en 1975, Köhler y Milstein desarrollaron una técnica para la producción de anticuerpos monoclonales. La técnica consiste en extraer células B (precursores de las células plasmáticas) a partir del bazo de modelos animales tratados previamente con un antígeno. Posteriormente, las células B son fusionadas con una línea celular tumoral inmortal de mieloma. Estas dos

líneas celulares formarán una línea celular híbrida conocida como hibridoma. Los hibridomas pueden dividirse indefinidamente y secretar anticuerpos que provienen de una sola clona. Esta técnica revolucionó totalmente la producción de anticuerpos y generó un mercado enorme que impulsó una adopción masiva en múltiples campos.

Las principales aplicaciones de los anticuerpos monoclonales se presentan a continuación.

3.1. Inmunoterapia

Se trata de reemplazar la incapacidad natural de un organismo para producir anticuerpos por medio de anticuerpos monoclonales generados por cultivos *in vitro*. También es posible utilizar anticuerpos monoclonales para bloquear la sobreproducción de proteínas que generan alguna enfermedad. Ambas estrategias ayudan al sistema inmune a reconocer un antígeno particular y poder controlarlo. Esto se ha usado en múltiples enfermedades como, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer colorrectal, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis, entre otras, asimismo se usa para evitar el rechazo en trasplante de órganos.

3.2. Identificación de marcadores fenotípicos

Los anticuerpos pueden reconocer marcadores celulares de superficie que permiten identificar un tipo de célula en particular. Esta es la base para la clasificación moderna de linfocitos y fagocitos mononucleares. Por tanto, también es útil para la clasificación de leucemias y otros trastornos hematológicos, en los cuales estos marcadores se ven alterados por la presencia de células inmaduras de la médula ósea en el torrente sanguíneo.

3.3. Inmunodiagnóstico

A partir del suero de pacientes infectados con determinados patógenos pueden aislarse anticuerpos específicos que nos indican la presencia de una enfermedad infecciosa particular. Así, la purificación y aislamiento de estos anticuerpos han servido para la creación de pruebas de diagnóstico rápido, con el objetivo de determinar la

presencia o ausencia de diferentes enfermedades como malaria, VIH SIDA, hepatitis B, entre otras.

3.4. Caracterizar niveles de expresión génica

Los blancos favoritos de los anticuerpos son las proteínas. Por tanto, el uso de anticuerpos para identificar y cuantificar proteínas particulares es ampliamente utilizado. En ciertas condiciones, la subproducción o la superproducción de determinadas proteínas puede ser un indicador clave de la presencia o ausencia de una enfermedad, así como para realizar seguimiento de tratamientos farmacéuticos y la evolución de enfermedades e infecciones crónicas.

3.5. Procedimientos en investigación

Técnicas de rutina utilizadas en laboratorios de diagnóstico y de investigación, usan los anticuerpos tanto policlonales como monoclonales para determinar la presencia o ausencia de un determinado patógeno, caracterización de células infectadas o sanas, determinación del origen de células en el camino de la embriogénesis, identificación de biomarcadores, entre otros. Los anticuerpos pueden ser acoplados a fluoróforos u otras moléculas que permiten amplificar las señales de detección. Técnicas como Western blot, ELISA, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, citometría de flujo, entre otras, son algunas de las más ampliamente usadas.

4. Anticuerpos monoclonales terapéuticos

El principal valor de los anticuerpos se ha centrado en el uso que se le da en aplicaciones clínicas. Hasta 2018, 64 anticuerpos monoclonales habían sido aprobados por la USA Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de múltiples enfermedades. Estos anticuerpos en general lo que hacen es reconocer un antígeno específico y neutralizarlo. Es el caso de algunas enfermedades particulares como, por ejemplo: anticuerpos contra disialogangliósido, que se expresa en tumores de origen neuroectodérmico (GD2), para el tratamiento del neuroblastoma pediátrico; anticuerpos contra Interleucina 5 (IL-5), para el tratamiento de asma severo; anticuerpo contra el antígeno de superficie CD319 (SLAMF7), para el tratamiento de mieloma múltiple;

anticuerpo contra la proteína de muerte 1 (PD-1), para el tratamiento de melanoma; anticuerpo contra el receptor específico de línea mieloide (CD33), para el tratamiento de Leucemia Mieloide Aguda (LMA); anticuerpo contra el receptor específico de células B (CD20), para el tratamiento de Esclerosis Múltiple, entre otros.

Lamentablemente, los anticuerpos monoclonales terapéuticos no han tenido el éxito esperado, ya que los pacientes no han respondido de la manera que se predecía. Esto debido a que la mayoría de las enfermedades crónicas son de origen multifactorial, razón por la cual son difíciles de controlar con un solo tratamiento. Es por eso que se están investigando nuevos tipos de anticuerpos terapéuticos que tengan la capacidad de reconocer varios blancos y no solo uno, dado que el uso de múltiples anticuerpos monoclonales para una sola enfermedad no sería viable a nivel económico ni clínico, por las impredecibles interacciones y los múltiples tratamientos que debería recibir el paciente.

Los anticuerpos monoclonales son obtenidos en modelos murinos y durante el tratamiento en humanos se descubrió que se generaba algo llamado respuesta HAMA (*human anti- mouse antibody*). La respuesta inmune de los humanos responde al anticuerpo murino, lo que provoca una disminución de los niveles de los anticuerpos monoclonales en la sangre, eliminándolos rápidamente. También es posible en algunos casos que se presente una reacción anafiláctica que puede llevar al paciente a la muerte.

En un intento por disminuir estas reacciones se desarrollaron los anticuerpos quiméricos, uniendo las regiones variables (Fb) murinas con las regiones constantes (Fc) de un anticuerpo humano. Luego vinieron los anticuerpos humanizados, donde se emplearon ratones *Knock out* a los cuales se les eliminan los genes productores de inmunoglobulinas propios y se les incorporan genes que codifican para inmunoglobulinas humanas, obteniendo así anticuerpos lo más similares posibles a los anticuerpos humanos.

Otra novedosa estrategia consiste en aislar linfocitos B producidos por pacientes humanos vacunados, pero esto implica procesos complejos y costosos que no parecen ser adecuados para la masificación que se busca.

5. Anticuerpos monoclonales bi-específicos

En 1984 el Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH por sus siglas en inglés) creó el primer anticuerpo monoclonal bi-específico. La producción se realizó a través de un método de fusión, donde en una sola molécula había regiones variables diferentes en cada cadena o con varios sitios de unión a diferentes blancos. Estos son

administrados vía parenteral y no son eliminados por metabolismo hepático o renal, sino por vía proteolítica. Sin embargo, se ha observado que estos pueden ocasionar efectos adversos por las citoquinas que modulan sus propiedades, entre los más comunes se encuentran: linfopenia, respuesta inflamatoria, hepatotoxicidad, neurotoxicidad y toxicidad gastrointestinal.

Algunos anticuerpos aprobados por la FDA basados en esta tecnología son: Catumaxomab (Removab®) para el cáncer de ovario, aunque sus efectos benéficos son controvertidos, Blinatumomab (Blincyto®) es usado para las recaídas de Leucemia Linfoide Aguda (LLA), Leucemia Linfocítica crónica (LLC) y Linfoma de Hodgkin (NHL). Muchos otros se encuentran en fase de desarrollo.

Muchos pacientes no responden a la inmunoterapia debido a que surgen mecanismos de resistencia como mutaciones, pérdida de expresión de los antígenos tumorales, entre otros.

6. Nanoanticuerpos

En el numeral 2 de este mismo capítulo revisamos la estructura de los anticuerpos en humanos, compuestos por una cadena pesada y una cadena liviana. Al igual que otros mamíferos, la familia de los camélidos (camellos, dromedarios, llamas y vicuñas) producen anticuerpos de forma natural, pero estos poseen ciertas características particulares con un gran potencial en investigación y terapéutica. Los anticuerpos de los camélidos poseen solo una cadena pesada y un dominio variable simple o VHH (figura 7). Experimentalmente se han aislado estos pequeños dominios VHH (15 Kda) y han demostrado un gran potencial de unión a antígenos, también llamándolos anticuerpos de tercera generación o nanoanticuerpos. Dentro de las ventajas en la producción y uso de nanoanticuerpos se destaca su pequeño tamaño, el cual no exige un diseño, construcción y acoplamiento molecular exhaustivo, lo que favorece su producción en masa y escalamiento. Las regiones determinantes de complementariedad son más extensas que las de los humanos y aun así tienen una alta afinidad y retención por su antígeno. Debido a su pequeño tamaño tienen una permeabilidad más alta que los anticuerpos monoclonales, incluso se ha reportado que pueden cruzar la barrera hematoencefálica. Algunas de las desventajas se concentran en su corta vida media y excreción rápida, cuando se han utilizado dosis más altas para compensar este fenómeno se reportan casos de hepatotoxicidad. Otra desventaja yace en su estructura, al carecer de región Fc no pueden iniciar una respuesta inmune por esta vía. Es aún un campo en desarrollo y faltan estudios de inmunogenicidad para determinar su seguridad en humanos. Una alternativa sería humanizar los dominios VHH, pero todavía no se conoce si esto pudiera disminuir su funcionalidad.

En conclusión, los anticuerpos son moléculas con un amplio rango de aplicaciones que son producidos naturalmente e incluso pueden ser modificados químicamente para mejorar sus capacidades. En investigación son ampliamente usados tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales, hasta el momento no existe una molécula mejor que pueda reemplazarlos.

En cuanto a las aplicaciones como moléculas terapéuticas hay todavía mucho por investigar y mejorar, ya que los efectos adversos siguen siendo un problema generalizado, además, el costo de la producción de anticuerpos es todavía muy alto y quienes producen estos tratamientos establecen tarifas exageradas que son difíciles de regular por las entidades gubernamentales.

Por ejemplo, el tratamiento con anticuerpos monoclonales para el cáncer de mama positivo para HER2, conocido comercialmente como trastuzumab®, tiene un costo aproximado de 70 mil dólares por año de vida ganado. Lo que no representa un valor costo efectivo en países en vía de desarrollo.

Los anticuerpos monoclonales representan un mercado enorme sin ningún tipo de competencia hasta el momento. Sin embargo, en 1990 se descubrieron unas moléculas prometedoras para este aspecto, se conocen como aptámeros o anticuerpos químicos y se darán a conocer en el siguiente capítulo.

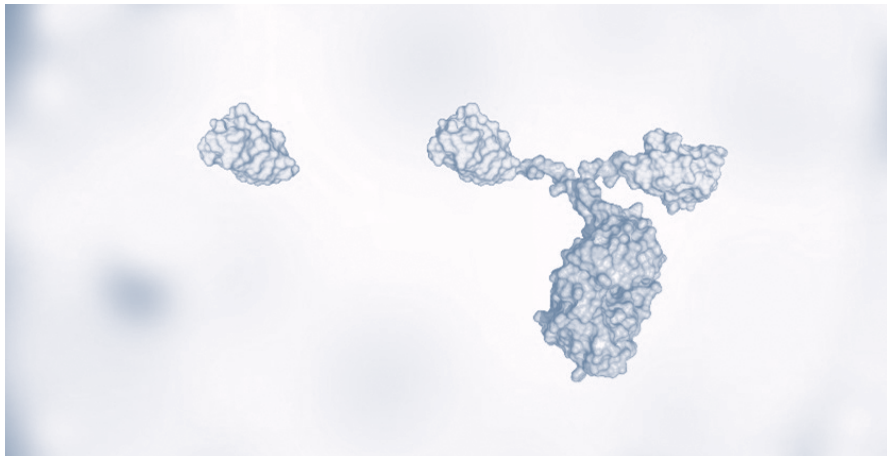

Figura 7. Región constante y regiones variables de los anticuerpos de camélidos en comparación con los anticuerpos humano.
Tomada de: Shutterstock.com [7]

Capítulo 2. Aptámeros

2.1. Historia

2.1.1. Biología Molecular

A mediados del siglo XX se dio el nacimiento de una de las disciplinas que más ha impulsado el avance de la ciencia en general en los últimos años: la biología molecular. El dogma central de esta dictaba que el ADN contiene las instrucciones en forma de genes para crear las proteínas. Estas instrucciones son copiadas en forma de ARN que actúa como mensajero para transmitir la información y luego esta es traducida para crear las proteínas, que son las moléculas efectoras de todos los procesos fundamentales dentro y fuera de la célula para su supervivencia.

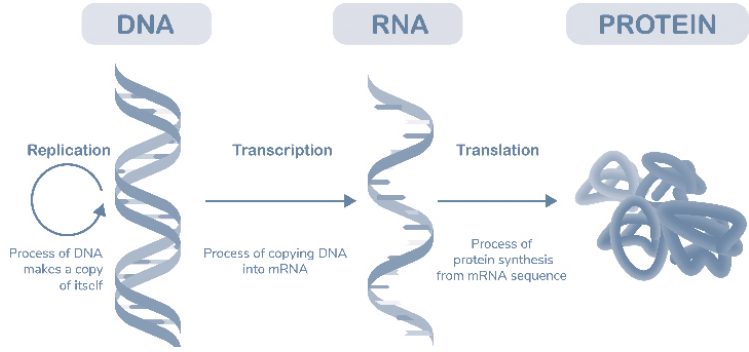

Figura 8. Dogma central de la biología molecular.
Tomada de: Shutterstock.com [8]

A partir del dogma central de la biología molecular (figura 8) que fue propuesto por Watson y Crick en 1954, se estableció que la principal utilidad del ADN era almacenar la información genética. El ARN tenía como función principal transportar dicha información genética fuera del núcleo, para ser traducida utilizando el código genético y producir proteínas funcionales gracias a la maquinaria ribosomal.

2.1.2. Mundo del ARN

Antes de comenzar con este precedente, me gustaría abordar un tema importante que ha tomado mucha fuerza luego de que el dogma central de la biología molecular fuera propuesto como una ecuación inquebrantable. La teoría del mundo del ARN. Esta teoría fue propuesta por primera vez en 1962 por Alexander Rich, y posteriormente por Walter Gilbert en 1986. Ambos señalaban que el ARN y no el ADN como se pensaba, podía ser al comienzo de la existencia de la vida en nuestro planeta en el caldo primordial. Varias investigaciones habían acumulado información acerca de la capacidad del ARN de almacenar información genética (es la molécula que almacena la información genética de la mayoría de los virus), de autorreplicarse e incluso de tener actividad enzimática (ribozimas) fundamental para las reacciones que debieron dar lugar al origen de la vida. Es decir, la teoría del mundo del ARN propone que la molécula fundamental para el origen de la vida fue el ARN y no el ADN. En este libro no pretendo ahondar en esta teoría que me parece acertada, factible e inspiradora, sino exponer que, a medida que avanzan las investigaciones se ha descubierto que los ARN tienen capacidades únicas y que, además, en el año de 1990 se demostró que los ARN tienen una capacidad única de reconocimiento específico de blancos, tal como lo hacen los anticuerpos. A estas moléculas se les conoce como aptámeros.

Estos descubrimientos acerca del ARN han hecho que el dogma central de la biología molecular allá sido modificado como se ve en la figura 9, donde el ARN cobra mayor importancia, a la par que el ADN.

La historia de los aptámeros comenzó en 1990, con la publicación de tres artículos científicos elaborados por tres grupos de investigadores diferentes en los Estados Unidos.

El 29 de marzo de 1990 se publicó en la prestigiosa revista *Nature*, un artículo titulado *"Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA"* firmado por Debra L. Robertson y Gerald F. Joyce del Departamento de Química y del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigación de la Clínica *Scripps* en California, Estados Unidos.

Mas tarde ese mismo año, el 3 de agosto de 1990, se publicó en otra de las más prestigiosas revistas científicas del mundo, la revista *Science,* un artículo científico titulado *"Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase"* firmado por Larry Gold y Craig Tuerk.

Solo 27 días después, el 30 de agosto de 1990, se publicó en la revista *Nature* un tercer artículo titulado: *"In vitro*

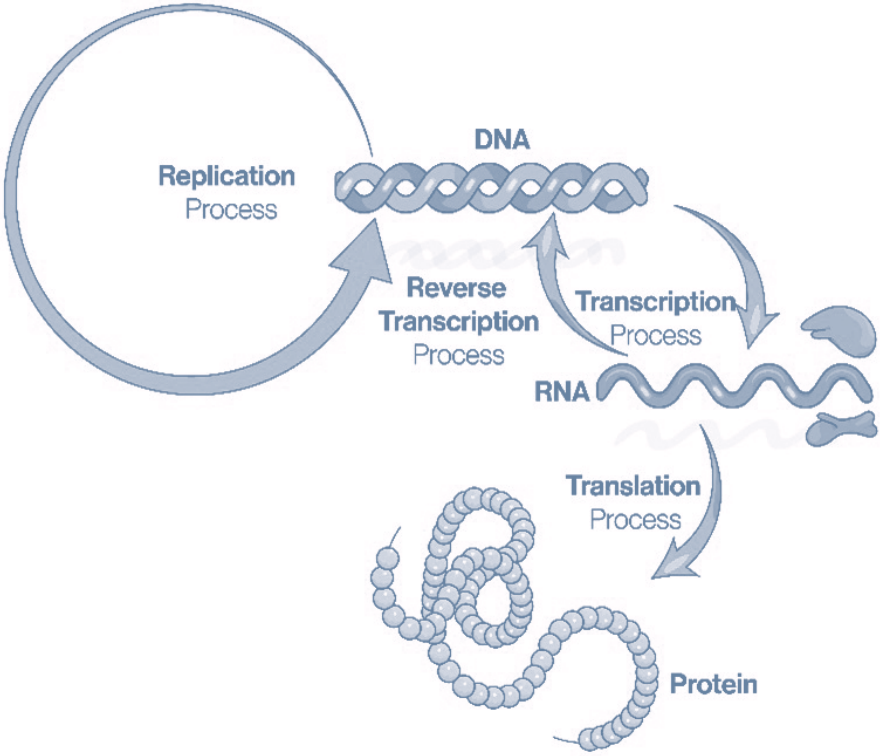

Figura 9. Cambios en el dogma central de la biología molecular.
Tomada de: Shutterstock.com [9]

selection of RNA molecules that bind specific ligands" firmado por Andrew D. Ellington y Jack William Szostak.

Los tres grupos de investigadores coincidieron en la obtención de moléculas de ARN de cadena sencilla, que desarrollaban una actividad de interacción desconocida hasta ese momento, la cual les permitía unirse a una molécula blanco de forma específica.

En el caso de Robertson y Joyce el blanco específico eran ADNs de una sola cadena. En el caso de Gold y Tuerk fue la ADN polimerasa del bacteriófago T4, y en el caso de Ellington y Szostak fueron seis diferentes colorantes orgánicos (moléculas muy pequeñas).

¿Cómo es posible que moléculas de ARN actúen reconociendo blancos específicos como los hacen los anticuerpos? ¿No era su función principal transportar información genética desde elnúcleo de la célula para producir proteínas?

Para entender la respuesta, debemos analizar cada uno de los tres estudios publicados.

2.2 Gerald Joyce (1956-Actualidad)

En primer lugar, debemos entender que Gerald Joyce es y ha sido hace muchos años un pionero en el campo de la evolución *in vitro*. Él ha centrado su trabajo investigativo en entender como el ARN tiene un rol clave como molécula catalizadora de reacciones fundamentales para la vida desde el cultivo primitivo. Ha estudiado como algunos ARNs tienen la capacidad de actuar como enzimas (ribozimas). Los ARN poseen la facultad de provocar su propia replicación y, además de eso, actuar como las moléculas efectoras (proteínas). Lógicamente Gerald Joyce es un seguidor y defensor de la teoría del mundo del ARN.

Robertson y Joyce en 1990 se encontraban estudiando una ribozima del grupo I. Más exactamente, la ribozima *Tetrahymena* que es un intrón con capacidad auto catalítica. Es decir, es una porción de ARN que puede separarse del ARN mensajero por sí solo actuando como su propia enzima.

Al tener capacidad de auto empalmarse, esta ribozima cataliza la transferencia de grupos fosforilo entra la guanosina y una hebra sustrato de ARN. La ribozima Tetrahymena tiene 413 nucleótidos y asume una estructura 3D que le permite llevar a cabo tanto su capacidad como ARN como también una actividad catalítica.

Robertson y Joyce desarrollaron una serie de técnicas para la mutación, selección y amplificación de la ribozima de ARN para obtener una variante que pudiera reaccionar con un substrato de cadena sencilla de ADN. Es decir, querían obtener una ribozima mutante que no solo reconociera ARN como

sustrato, sino que también, por un proceso de evolución acelerado, pudiera reconocer hebras del ADN.

Estos ensayos se enfocaron en realizar experimentos evolutivos totalmente *in vitro,* que responden a selección artificial bajo ciertas condiciones impuestas, y que derivaron en el descubrimiento de la primera ribozima de ARN que corta ADN de cadena sencilla de forma específica. ¿Cómo se logra entrenar a una molécula que lleva miles de años de evolución realizando una misma función para que cambie su capacidad y se adapte a unas nuevas condiciones? Ellos querían saber si era posible acelerar la evolución natural mediante procesos *in vitro,* modificando la cuarta dimensión ¡El tiempo!

2.3 Larry Gold (desconocido-actualidad)

En segundo lugar, Craig Tuerk, aspirante a PhD en Biología Molecular, Celular y del Desarrollo de la Universidad de Colorado en *Boulder,* cuyo asesor era el Dr. Larry Gold, estudiaba la regulación de la traducción del gen de la ADN polimerasa del bacteriófago T4.

Hay que entender que, el operador de este ARN mensajero está configurado por un sitio de unión para la ARN polimerasa, el cual reprime su propia traducción cuando hay niveles suficientemente altos. A esto se le conoce como un Represor.

La estructura que se forma en el ARN mensajero cuando se une la ARN polimerasa, enmascara el sitio de unión de los ribosomas y, por tanto, evita que se lleve a cabo la traducción. Esa estructura que se forma en el ARN fue el objeto de estudio de Tuerk y Gold, ya que constituye un bucle intramolecular de ocho nucleótidos a los cuales se une la ARN polimerasa.

¿Cómo era posible que este bucle inhibiera la traducción de la proteína? Ya eran conocidos los casos de operón Lac y del operón del triptófano, pero ¿cómo actuaba este operón en particular? ¿era posible modificar el bucle para que fuera reconocido por otras proteínas?

Lo que hicieron a continuación fue realizar todas las posibles mutaciones en estos ocho nucleótidos (4^8) posibles variantes. Es decir, 65.536 mutantes del sitio de unión) y probar cuál de ellos podría unirse al sitio de unión de la ARN polimerasa. Obtuvieron que, dos moléculas de ARN podían hacerlo, una molécula exactamente igual a la original (*wild type*) y otra molécula con cuatro mutaciones en el bucle de ocho nucleótidos. Habían obtenido entonces una molécula totalmente nueva que podía reconocer el sitio de unión de la ARN polimerasa. ¿Cómo era esto posible? ¿Aparte de la secuencia original, hay otra que puede ser un motivo de unión para la ARN polimerasa?

Al proceso que ellos mismos diseñaron y por el cual llegaron a los resultados obtenidos lo nombraron SELEX, por sus siglas en inglés *Selection of Ligands by Exponential Enrichment*. A este se le atribuyen tres características que están relacionadas con los principios de la evolución darwiniana; algo que Robertson y Joyce habían estudiado por años. La variabilidad, la selección, y la replicación.

La variabilidad dentro de la estrategia SELEX que llevaron a cabo Tuerk y Gold es otorgada por las 65.536 moléculas de ARN usadas al inicio del experimento, la selección se llevó a cabo contra la ARN polimerasa que fue el blanco elegido en este experimento. La replicación equivale a la amplificación por RT-PCR y, posteriormente, los ADN complementarios obtenidos, que fueron amplificados por PCR. El resultado de este proceso permite seleccionar las moléculas "más aptas"para usar un término darwiniano, tras la finalización de cada ciclo. Cuando realizaron varios ciclos de selección, garantizaron que, solo se estaban eligiendo las moléculas con mayor afinidad y, por tanto, descartando aquellas con afinidades bajas por el blanco específico. Larry Gold al obtener estos resultados, tuvo la visión de que estos experimentos se podrían extrapolar a otras aplicaciones y por eso patentó la tecnología SELEX que le fue concedida en 1993.

2.4 Ellington (1956-actualidad) y Szostak (1952-actualidad)

En tercer lugar, se encuentran Ellington y Szostak, quienes buscaban obtener moléculas de ARN que reconocieran una variedad de colorantes orgánicos que son moléculas muy pequeñas (Cibacron blue 3GA, Reactive Red 120, Reactive Yellow 86, Reactive Brown 10, Reactive Green 19, y Reactive Blue 4) a partir de una población al azar de ARN de 10^{10} (10.000.000.000) moléculas individuales. La estrategia se llevó a cabo en columnas de afinidad con cada uno de los seis colorantes mencionados y se realizaron seis ciclos de selección y amplificación. Tres de las seis poblaciones de ARN que se obtuvieron para cada colorante fueron específicas. Posteriormente, estas poblaciones fueron clonadas y obtenidas de forma individual.

Moléculas de ARN habían desarrollado la capacidad de otras moléculas individuales. ¿Cómo era posible esto? ¿Moléculas de ARN que podían reconocer colorantes? Los colorantes son moléculas muy pequeñas ¿los ARN habían desarrollado alguna "capacidad" para adaptarse y reconocerlos?

Un dato para resaltar es que Ellington y Szostak acuñaron el término Aptámero que viene de la raíz latina *"aptus"* que

significa "que encaja" y la raíz griega "*mers*" que significa"molécula". Es decir, los aptámeros son moléculas que encajan con casi cualquier tipo de blanco. ¿Cómo funciona esta novedosa capacidad de reconocimiento?

Es posible deducir que los tres grupos de investigación hicieron aportes bastante significativos para lo que ahora conocemos como estrategia SELEX o *evolución in vitro,* técnica mediante la cual podemos obtener aptámeros que son ácidos nucleicos de cadena sencilla y, además, reconocen un blanco con alta especificidad y afinidad. Sin embargo, mediante comunicación directa con el Dr. Gerald Joyce a través de correo electrónico, pudimos aclarar que los experimentos de su grupo de investigación nunca usaron la estrategia SELEX. Su respuesta literalmente fue la siguiente "Mi laboratorio nunca ha realizado selección *in vitro* (SELEX) para obtener aptámeros de ácidos nucleicos, sino que se ha centrado en la evolución *in vitro* de enzimas de ácidos nucleicos".

Con esta información y con las entrevistas que logramos realizar al Dr. Larry Gold y el Dr. Jack Szostak podemos afirmar que; la estrategia SELEX fue creada por solo dos grupos de investigadores y no tres como se cita en muchos artículos científicos e incluso en este libro con la intención de aclararlo definitivamente.

Volviendo al tema principal, Larry Gold al haber patentado sus descubrimientos tenía una gran ventaja sobre sus competidores para explotar dicha tecnología. Fue así cómo decidió dar el siguiente paso y fundó la empresa NeXagen en 1992. Durante siete años esta compañía se dedicó a desarrollar una serie de métodos para potencializar la estrategia SELEX y obtener aptámeros con capacidad terapéutica. El mayor logro de la compañía fue la obtención de un aptámero contra la proteína VEGF (*Vascular endothelial growth factor*). Esta proteína es secretada, se une selectivamente a su receptor y lo activa, este receptor está localizado en la superficie de las células vasculares endoteliales. VEGF induce angiogénesis e incrementa la permeabilidad vascular y la inflamación que contribuye a la progresión de la Degeneración Macular asociada a la edad en la forma húmeda, esto es, la mayor causa de ceguera en mayores de 60 años. Este aptámero fue nombrado

Pegaptanib, fue aprobado por la FDA en 2004 para su uso terapéutico por medio de inyección intravítrea.

En NeXagen también desarrollaron variantes a la estrategia SELEX como cell-SELEX, covalent-SELEX, photo-SELEX que son variantes mejoradas de la estrategia original. NeXagen fue vendida por Larry Gold y se fusionó con Vestar creando la compañía NeXstar en 1999.

En el año 2000, Larry Gold fundó SomaLogic, una empresa especializada en la creación de aptámeros con un enfoque diferente, diagnóstico. Durante muchos años esta empresa se ha dedicado a crear aptámeros con modificaciones en los cuatro nucleótidos tradicionales para obtener mayor especificidad y variabilidad a la hora de interactuar con un blanco. Estas nuevas moléculas fueron llamadas *"SOMAmers" (Slow Off-rate Modified Aptamers)*. Somalogic se dedica a la fabricación de aptámeros con nuevos nucleótidos sintéticos diferentes a los cuatro canónicos (Adenina, Guanina, Citosina, Timina/Uracilo). Los SOMAmers se utilizan principalmente para cuantificar proteínas en matrices biológicas, usando una gran plataforma múltiple llamada SOMAscan. Por medio de esta se pueden identificar biomarcadores de forma rápida, robusta y reproducible, utilizando una pequeña cantidad de muestra. Una vez identificados los biomarcadores, pueden crearse paneles a la medida de problemas médicos particulares. Una de mis frases favoritas de Larry Gold, que publicó en un número especial por los veinticinco años de los aptámeros y la estrategia SELEX en el 2015 es **"El futuro de las aplicaciones de los aptámeros estará limitado únicamente por nuestra imaginación"** [13].

Una vez venció la patente que protegía la tecnología SELEX en 2013, investigadores, farmacéuticas y otros interesados comenzaron a poner su atención en este proceso y tanto las publicaciones como la solicitud de nuevas patentes fue creciendo de forma exponencial. Hoy en día, existen más de cuarenta empresas dedicadas a trabajar con aptámeros en múltiples aplicaciones. Estas se encuentran localizadas en China, Estados Unidos, Canadá, Europa y probablemente en poco tiempo también podamos hablar de algunas en América Latina.

3. ¿Cómo reconocen los aptámeros su blanco?

A través de muchos años de investigación se ha determinado la estructura cristalográfica de múltiples complejos aptámero-blanco. Dichos complejos revelan que, los aptámeros desarrollan diferentes plegamientos que les permite adaptarse a su blanco: tallos-bucles, horquillas, protuberancias, pseudonudos y G-cuádruplex. Las uniones aptámero-blanco se dan en su mayoría por enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones de van der Waals y apilamiento aromático, entre otros. En la estructura cristalográfica de los

aptámeros de ARN unidos a su blanco, resalta la capacidad que tienen de adoptar conformaciones intrincadas que les posibilitan reconocer grandes superficies y unirse con gran afinidad a blancos que naturalmente no se unirían al ARN. Lo que queda claro del análisis de los complejos aptámero-blanco es que, por lo general, los aptámeros no dependen directamente de su secuencia primaria para la interacción con su blanco, sino de su estructura 3D. El reconocimiento y la unión al blanco implican interacciones tridimensionales dependientes de la forma, así como interacciones hidrófobas, apilamiento de bases e intercalamiento. Se requieren diversos cambios de conformación tanto del aptámero como del blanco para producir un "ajuste inducido", el cual es difícil de predecir, pero esencial para que se dé la interacción con gran afinidad. Precisamente, los aptámeros no "reconocen" su blanco; el término correcto sería que "encajan" con su blanco.

Esto confirma que la elección del nombre por parte de Andy Ellington y Jack Szostak para estas novedosas moléculas no pudo ser más acertado. Los aptámeros son moléculas que encajan con su blanco al adaptarse tridimensionalmente, esto ha sido confirmado por cristalografía y múltiples simulaciones computacionales.

A continuación, pueden leerse los apartes de las entrevistas realizadas tanto al Dr. Larry Gold como al Dr. Jack Szostak creadores de la estrategia SELEX y de los aptámeros. Las entrevistas también pueden ser vistas y escuchadas en formato digital a través del siguiente código:

4. Entrevistas

Dr. Larry Gold
(15 de marzo de 2022 vía *Teams*)

Dr. Larry Gold es un pionero en el desarrollo de la estrategia SELEX la cual ayudó a crear mientras era profesor de la Universidad de Colorado en Bulder. Es miembro de la Academia Americana de Artes y Ciencias y la Academia Nacional de Ciencias de EE. UU. El Dr. Gold ha recibido múltiples premios por su trabajo: Premio al Mérito del Instituto Nacional de Salud de EE.UU., Premio al Desarrollo de la Carrera, Premio al Desarrollo Profesional, Premio a la Trayectoria de la Asociación de Biociencia de Colorado, entre muchos otros.

JO: Quiero aprovechar este espacio para aclarar un par de preguntas que tengo:

JO: ¿Cuáles piensa que son los antecedentes claves para llegar al descubrimiento de la estrategia SELEX?

LG: Tuerk era mi estudiante de PhD quien estaba planeando estudiar ARN mensajeros, específicamente en la regulación de la transcripción, es decir, cuando los niveles de proteína aumentan y son suficientes altos se unen a su propio ARN mensajero y bloquea su propia traducción. Él estaba terminando su PhD haciendo todo su trabajo, leyendo artículos de forma increíble, todavía es increíble, Aún es mi amigo.

Él se sentó conmigo y miramos que en el motivo donde se unía la proteína al ARN tenía una pequeña zona de solo ocho nucleótidos que evitaban que los ribosomas se unieran. Él dijo que quería estudiar las mutaciones en la horquilla que estaba en el extremo 5' donde se da la unión de los ribosomas.

Hablamos de ello y él iba a pedir oligonucleótidos con cambios en cada uno de estos nucleótidos, quería comprar muchos materiales. En el curso de nuestra conversación yo le dije: Craig, no importa cuantas modificaciones hagas del sitio de unión del ribosoma, siempre habrá alguien en el comité de evaluación que quiere que hagas más trabajo, porque eso es lo que los comités hacen. Creemos ser inteligentes pidiéndoles más trabajo. Entonces, ¿por qué no haces todo el trabajo de una vez?

Él me preguntó: ¿A qué te refieres?

Bueno, toma ocho nucleótidos que están formando esta horquilla en la región 5' donde se une el ribosoma y qué tal si pedimos 65 mil secuencias (4^8) en vez de solo algunas.

Él era muy creativo y dijo: claro, hagamos eso.

Quiero decir, eso estuvo genial.

Estuvimos cerca de dos años realizando el que sería el primer experimento de SELEX. Quiero dejar claro que yo solo era el supervisor. Él era tan bueno haciendo todos los experimentos, que nunca necesitó de mi ayuda. Después de esa conversación en mi oficina no volvimos a hablar hasta el miércoles en la noche antes del día de Acción de Gracias en 1989. Fueron dos años durante los cuales Craig estuvo trabajando bastante duro sin ninguna ayuda mía, ¡cero! Porque, como

sabes, tú quieres gente independiente en tu vida y Craig Tuerk era un hombre increíblemente independiente.

Bueno, luego él obtuvo los resultados que fueron publicados finalmente en la revista *Science*, pero antes de publicar él tenía los datos y los revisamos juntos y no podíamos creerlo, bueno, son recuerdos de hace treinta años.

Fue en realidad un momento increíble, teníamos dos secuencias de las 65 mil, recuerden que la horquilla tiene ocho nucleótidos y una de las secuencias era la secuencia *wild type* [nativa] y eso no sucede muy frecuentemente en el proceso SELEX, es casi imposible que el SELEX te dé de vuelta la misma secuencia biológica. Porque el proceso SELEX busca la molécula con mejor unión, pero no necesariamente la más funcional.

Y hubo una segunda secuencia con cuatro mutaciones en esos ocho nucleótidos que ya te he mencionado.

Yo estudié genética. De forma natural o evolutiva no puedes obtener en ninguna selección genética cuatro mutaciones de ocho nucleótidos. ¡Nunca! tendrías que esperar un trillón de años para que esto sucediera. Entonces en ese momento obtuvimos un resultado que no tenía sentido para nosotros, ahora sabemos que tiene sentido porque alguien más nos ayudó a realizar la estructura 3D.

La segunda secuencia con cuatro mutaciones de ocho nucleótidos con exactamente la misma estructura 3D que la nativa nunca había sido vista en biología. Tú no puedes encontrar algo como esto en la teoría, y juntos pensamos por primera vez, no recuerdo cuál de los dos fue primero para ser honesto, a lo mejor fue Craig, probablemente, pero no lo sé, no recuerdo. Alguno de los dos dijo:

¡Wow! Tú puedes hacer anticuerpos con ARN, porque puedes hacer que estos se unan a cualquier cosa como lo hacen los anticuerpos. Y nos miramos estupefactos, casi nos abrazamos, no lo hicimos.

JO: ¿En ese momento "Eureka" cuáles fueron los primeros pensamientos que le indicaron que tenía algo muy valioso en sus manos?

LG: Después de esa conversación yo me fui a casa el miércoles antes del día de acción de gracias, que es un día festivo muy grande en EE. UU. La noche del Día de Acción de Gracias, es decir, el jueves de 1989 (23 de noviembre) yo estaba en casa y mi cabeza se sacudía y yo comencé a escribir lo que se convertiría en los principios del trabajo de Craig basado en la conversación que habíamos tenido, tuve que comenzar a escribir todo lo que recordaba porque en aquel tiempo no contábamos con teléfonos celulares (o alguna tecnología para grabar en el instante).

Esto sucedió durante todo el fin de semana y comencé a trabajar. Escribí toda la noche, permanecí despierto desde el miércoles en la noche. Esa tarde (jueves) mi familia y yo fuimos a la casa de un amigo por la cena de Acción de Gracias y yo ya había escrito el borrador del artículo. Como no había descansado me quedé dormido en el piso. Al lado de la mesa donde estaba la cena. Mi esposa les dijo a todos "no se preocupen, esto lo hace todo el tiempo", entonces a la gente no le molestó, y pasaban por encima de mí mientras seguía la celebración. Dormí tanto que me perdí el pavo (La cena principal en el día de acción de gracias). El lunes ya tenía el borrador del trabajo de Craig. Cinco días después de la charla del miércoles. Él fue el mejor posdoctorado de mi carrera. Todavía es mi amigo. Tomé una computadora que tenía disponible, una como esta con que estamos haciendo la entrevista.

Amo mi laboratorio, había veinte personas allí, yo tenía mis ayudantes y Peter estaba también hablando con sus ayudantes. Yo estaba sentado ahí pensando, ya no me importa esto para nada. El equipo de científicos más importante de mi laboratorio hablando y yo perdí todo mi interés en todos, menos en Craig por esos cinco días.

Tiren todo, lo que tengan en los cuartos fríos, los congeladores, tiren las bitácoras, pensemos en como podemos ayudarle a Craig. En mi laboratorio hay gente increíble, un tipo que es más famoso que yo, se llama Sean Eddy, un científico computacional y experimental que ahora es profesor de Harvard que hace muy buenas cosas, me dijo: se supone que debo entregar mi tesis en dos semanas ¿Esta bien si termino eso? ¿y después me uno a ustedes en dos semanas? y yo dije: ¡oh me olvidé de eso! claro, no hay problema, de hecho esto es algo voluntario, pueden unirse los que quieran. Pero en mi opinión, esto va a ser algo enorme.

Tengo que decir que, la verdadera fuente de un invento, una buena invención, no se puede crear sin experimentos, así como ¡Oh! Tomemos algunos ARN y seleccionémoslos contra algunos blancos y BOOM ya lo tengo. Pero con el tiempo, yo soy de la idea de que el plegamiento de los ARN, eso fue en 1989, las cosas no son como ahora que se sabe mucho del plegamiento de los ARN. Nosotros teníamos estas charlas del plegamiento hablando de cintas versus formas. Porque todo esto del Mundo del ARN habla de formas, no de cintas.

Es como cintas y hélices versus cosas, es lo mismo. Y me parece algo bonito que la gente hable de eso. Y es algo que Craig ha hecho muy bien. Realmente el descubrimiento emocionalmente fue conectar esta criatura extraña, la segunda molécula que fue el primer aptámero. Nosotros no creamos los aptámeros, recuérdalo, estos fueron creados por mi amigo Jack Szostak y su posdoctorado Andy Ellington quien hizo ensayos

similares y sus experimentos son más elegantes que los de Craig. Pero Craig tenía una ventaja que fue trabajar con diez polímeros de ADN por cuatro años, él conocía estas moléculas que fue muy diferente a lo hecho por Andy Ellington y Jack Szostak. Yo conozco a Jack Szostak muy bien, es un muy querido amigo.

Él estaba interesado en lo que Andy estaba haciendo, pero realmente conectado con su profunda necesidad de entender cómo el mundo del ARN contribuyó al origen de la vida. Ese es Jack. Ellos estaban tratando de hacer eso. Y era el sentido de lo que buscaban en ese momento. Ellos hicieron muchos experimentos y publicaron un mes antes o después de nosotros, no puedo recordarlo, pero fue al mismo tiempo.

Creo que fue un mes después del artículo científico de Craig. Y luego Jack no pensó en diagnóstico o terapéutica como yo lo hice. Esto es como un hecho interesante, él se interesó en cómo comenzó la biología. Él es profundo, él no se movería por eso. Andy Ellington no es así, él continuo con los aptámeros en Texas, pero Jack no es así.

En un simposio que organizamos cada año en *Gold Foundation* (www.goldfundation.org), tenemos más de doscientas charlas en los últimos veinte años. Y el año pasado Jack tuvo una acerca de su pasión, el comienzo de la vida. Es una presentación espectacular. (https://goldlabfoundation.org/symposia/symposium-2021/)

JO: ¿Cuál es el cuello de botella en la implementación de los aptámeros?

LG: Es una pregunta profunda, muy buena pregunta, me gusta.

Nosotros tuvimos las empresas NeXstar, y Soma Logic hasta ahora. Y trabajamos en reemplazar anticuerpos monoclonales, y la razón por la que el camino fue más fácil es porque nosotros pudimos hacer lo que ellos [demás científicos] no podían hacer por veinte años (por la patente que LG solicitó sobre el SELEX). Y nosotros dijimos, esto es algo muy interesante porque podemos hacerlo con aptámeros, bla, bla, bla.

El camino hacia las aplicaciones se hizo bastante fácil porque, en cierto modo, un aptámero no es más que un anticuerpo monoclonal con mejor afinidad, tal vez, quiero decir, la afinidad depende de unos u otros blancos. Hay dos grandes aplicaciones para diagnóstico y terapéutica. Entonces déjame dividir la pregunta en una pequeña respuesta para diagnóstico y una pequeña respuesta para terapéutica. Porque son importantes. Hay un millón de cosas más que podemos hacer con estas moléculas, podemos hacer una lista y demorarnos para siempre, hay montones de datos acerca de esto. Pero vamos a enfocarnos en estas dos grandes aplicaciones. En terapéutica, los anticuerpos son buenos y hay un enorme mercado de anticuerpos terapéuticos hoy en día. Y la pregunta es: ¿Dónde pueden aplicarse los aptámeros terapéuticos?

En terapia, la ventaja real de los anticuerpos es que viven en tu cuerpo para siempre. Si recibes una inyección los anticuerpos durarán dos meses y decaerá por eliminación o por degradación. La cinética de una proteína normal decae dependiendo del sitio, algunas más rápido, algunas más lento. Nadie ha descubierto cómo hacer que un aptámero viva en tu cuerpo como lo hacen los anticuerpos monoclonales, nunca. Yo creo, es mi opinión, no es una respuesta religiosa ni un hecho, es solo mi opinión, Los aptámeros son seguros.

Probablemente los usos más fáciles de los aptámeros como terapia fueron cuando ellos fueron dirigidos de forma local, algún lugar importante donde la actividad de la proteína debe ser regulada y está haciendo el daño. Por eso, el primer aptámero terapéutico fue Macugen®, que fue hecho contra tres formas de degeneración macular. Cuando tú pones un aptámero dentro del vítreo del ojo, este permanece allí por mucho tiempo, eso es lo que tu deseas, que permanezca ahí. Y para detener, ralentizar la forma húmeda de la degeneración macular, es perfecto. El ojo es el lugar perfecto para probar medicamentos antes de ir de forma sistémica. Entonces el cuello de botella, la palabra que usaste es cómo puedes competir con anticuerpos monoclonales con intenciones similares. Nosotros seguimos trabajando en SomaLogic muy fuerte, un chico en SomaLogics es quizás el más fuerte en el uso de aptámeros, el que más ha trabajado con ellos, puedes leer algunos artículos científicos de él.

Su nombre es Nebojsa y su estudiante más joven Janjic un científico espectacular, el continúa trabajando duro en aptámeros terapéuticos, que nosotros llamamos Somamers [aptámeros desarrollados por la empresa SomaLogic]. Yo creo que el cuello de botella no es la afinidad ni la capacidad de reconocimiento de la proteína, eso ya está hecho, fue un trabajo hermoso. **El punto es que tenemos que elegir enfermedades donde el corto periodo de vida de los aptámeros no sea una barrera, que más bien sea una ventaja.**

Para terapéutica es una gran pregunta, mis colaboradores leen cientos de artículos científicos y nosotros hemos escrito algunos. Y finalmente, es realmente interesante que nosotros fuimos los primeros en usar los aptámeros contra VEGF en terapia para el tratamiento de la degeneración macular, pero la molécula fue usada contra diferentes

epítopes del VEGF. Los anticuerpos monoclonales bloquean la unión de VEGF a su receptor.

Su afinidad era muy buena no había diferencia entre el anticuerpo monoclonal y el aptámero de ARN que nosotros probamos.

Aún no hay otros aptámeros terapéuticos que hayan sido probados, tal vez salgan otros en 10-20 años. Lo importante es analizar la indicación de la enfermedad y la vida media en el organismo.

Nosotros hemos hecho en SomaLogics aptámeros contra 7 mil proteínas humanas porque nos interesa hacer proteómica. Y hemos hecho mil diferentes SOMAmers contra esas 7 mil proteínas. Nosotros tenemos 7 millones de SOMAmers. Porque las modificaciones que hacemos a los SOMAmers reconocen epítopes alrededor de toda la proteína. Por lo tanto, tu podrías bloquear la actividad de la proteína, es decir, puedes usarlos como medicamento. Pero debes usar este medicamento de forma inteligente, ese es el cuello de botella.

El cuello de botella para la proteómica, que es como se realiza el diagnóstico es muy interesante. En SOMAlogics lo que queremos es medir, cuantificar muchas diferentes proteínas humanas, ¿cómo hacemos eso? En una prueba de embarazo mides hCG (gonadotropina coriónica humana), solo tienes que medir una cosa. ¿Cuál es la idea detrás de cuantificar 7 mil proteínas? Podemos procesar cien muestras humanas al mismo tiempo, es muchísimo, ¿por qué no solo medir la que tu necesitas? La gente no entiende esto, yo soy quizás la primera persona, no estoy seguro, pero yo siempre he pensado que es mejor medir muchas proteínas que solo la que crees que le ayudará al paciente. Puedes suponer que esa es la correcta.

La respuesta correcta solo la conseguirás con datos. Si tú quieres hacer el diagnóstico de una enfermedad X. No tienes que adivinar que proteína puede ayudarte. Nosotros tenemos la plataforma para hacerlo. La gente odia este tipo de cosas, la gente odia hacer un *screning* para una enfermedad. La proteómica no se hace para comprobar una hipótesis. Yo siempre he sido un científico que sigue hipótesis, pero la proteómica no esta preparada para eso. Y SOMAlogic está en el principio de detectar nuevos biomarcadores. Jack Szostak nos ha visitado varias veces. Él es honesto, él es mi amigo, él me dice ¿qué vas a hacer con toda esta cantidad de datos que has recolectado? como científico real que es, me dice: ¿Cuál es tu hipótesis? Y yo le digo que no tengo una hipótesis. Si yo mido todas las proteínas humanas encontraré cosas más importantes para los pacientes que tú, porque son nuevas. Esa es mi hipótesis.

El cuello de botella que tenemos en el trabajo que hacemos con el SOMAscan (instrumento utilizado en SomaLogic

para cuantificar proteínas humanas por medio de SOMAmers), es obtener aptámeros contra toda la molécula. Ya lo resolvimos, puedes leer los artículos acerca de esto. Esa es una difícil barrera para mejorar.

JO: Usted ha sido capaz de transferir el conocimiento del laboratorio a compañías bastante consolidadas. **¿Puede hablarnos acerca de estas experiencias y darnos algunos consejos a los científicos emprendedores que queremos hacer lo mismo?**

LG: Esta pregunta me la han hecho cientos de veces, pero me gusta responderla. Porque eso quiere decir que tú quieres, tú estás pensando como científico y estas tratando de contribuir y no es nada fácil contribuir, muchas personas hacen ciencia. Y yo creo que nunca me han hecho esta pregunta de la forma apropiada. Pero te voy a dar mi respuesta, la que yo creo para ti y para cualquiera. La pregunta importante es ¿Por qué debo hacer algo con la biotecnología? Yo lo aprendí en las otras compañías que cree. La respuesta es, que quiero obtener con todo el trabajo duro que he realizado que yo creo que ha tenido algún éxito. ¿Cómo tomo la decisión? ¿Qué debo hacer? ¿Qué es lo que creo que yo debo hacer? Es demasiado importante y es una pregunta demasiado difícil. Tú haces un experimento, lo compruebas y lo compruebas. Cuando trabajas duro no puedes pensar en nada más. Solo en el siguiente experimento. Y yo pensé en diciembre de 1982 cuando yo hice mi último experimento en mi laboratorio de la universidad. Yo tengo los datos, y le dije a todos en mi laboratorio ya estuvo. Esto fue casi 10 años antes de Craig, no quiero seguir este camino nunca más. Yo pienso que debí ser más inteligente de lo que pensaba que era. Quería ser libre y no depender de un salario. Me dediqué a leer resúmenes, artículos, un montón de datos. Casi 8 años solo leyendo datos. Para todos en la empresa yo era un loco de los datos y estaba estancado. Yo tenía que tomar la decisión y hacerlo, ya tenía suficientes datos.

Mi primera compañía fue fundada en 1991, yo no podía pagarme a mí mismo, pero podía pagarles a las otras personas. A mis 51 años, a mí no me importaba pasarme todo el día obteniendo datos, leyendo datos. Y yo decidí en ese momento que quería aprender más biología. Solo 7 personas en el mundo sabían hacerlo, yo mismo estuve en tu posición buscando a Jack Szostak para preguntarle, y yo sabía que podía hacerlo. Entonces, relacionado con tu pregunta, yo pensaba como podía hacerlo... podría hacer diagnóstico, terapia, lo cierto es que no sabía qué debía hacer. Como me encantaba leer me di cuenta de que nadie en el mundo estaba haciendo esto de la forma correcta.

Si tú no sabes lo que es importante para ti, no deberías hacerlo. Porque va a ser demasiado difícil.

JO: En los últimos años hemos visto como la bioinformática y la inteligencia artificial han complementado la predicción de estructuras de biomoléculas. **¿Cree usted que es posible crear una estrategia bioinformática que reemplace completamente el SELEX?**

LG: Como tú, yo he leído en profundidad publicaciones acerca de la resolución del plegamiento de estructuras y tengo muchos amigos que trabajan en esto. Mi primera respuesta es: "No lo creo". Sin embargo, puedes leer acerca de plegamiento de ácidos nucleicos y plegamiento de proteínas y ponerlos juntos. Resolver la estructura de dos proteínas que forman dímeros es algo realmente muy difícil. Lo único que "necesitas" es predecir la estructura de un ácido nucleico de cadena sencilla una proteína y ya está. La parte más rápida del SELEX es hacer la selección, solo toma 2 semanas o 1.

Lo que menos toma tiempo es hacer la seleción, donde mas te tardas es en entender las interacciones de los aptámeros seleccionados.

JO: Para 2050 se espera que el cambio climático afecte diferentes campos en la producción de alimentos y la aparición de nuevas enfermedades. **¿Qué rol piensa usted que podrían jugar los aptámeros para resolver los problemas del presente y del futuro?**

LG: Las pandemias y las enfermedades infecciosas yo creo que van a estar todo el tiempo, de todo tipo, bacterias, virus, lo que sea. Yo creo que las estrategias antivirales como ahora, nosotros en SomaLogic hemos hecho aptámeros contra la proteína spike y su receptor. Entonces, no hay una estrategia para todos los virus, todas las bacterias, solo para una que nos ataca ahora y yo creo que la ciencia de los aptámeros debería enfocarse en entender los virus y los antivirales. No puedes reemplazar la vacunación, la vacunación es lo mejor. Yo creo que los aptámeros tienen mucho futuro en entender las funciones.

Dr. Jack Szostak
(21 de marzo de 2022 vía *Zoom*)

El Dr. Szostak es profesor de Química y Biología Química en la Universidad de Harvard, profesor de Genética de la Escuela de Medicina de Harvard, investigador del Instituto Médico Hugues e Investigador distinguido Alex Rich del Hospital General de Massachusetts.

A través de su carrera, el Dr. Szostak se ha enfocado en la bioquímica de los ácidos nucleicos, incluyendo su trabajo seminal en la reparación del ADN, telómeros y telomerasas, y el laboratorio de evolución de aptámeros y ribozimas. Ganó el premio en Biología Molecular en la Academia Nacional de Ciencias en 1994; premio de investigación en bases médicas Albert Lasker en 2006; premio HP Heineken en Biofísica y Bioquímica en 2008 y nada más y nada menos que el premio Nobel en Fisiología y Medicina en 2009. El Dr. Szostak es miembro de la Academia Nacional de Ciencias, La Sociedad Americana de Filosofía y fue elegido miembro de la Royal Society. Actualmente, su investigación académica está enfocada en el origen de la vida.

JO: Quiero utilizar este espacio para clarificar algunas dudas específicas que quiero preguntarle.

Tuve la fortuna de hablar con el Dr Larry Gold hace menos de una semana. Él me habló acerca de su experiencia en lo que él llamó "El momento de Tuerk", que era su estudiante posdoctoral y que llevó a cabo los experimentos que condujeron al descubrimiento de la estrategia SELEX.

Yo conozco el gran trabajo que usted realizó entre 1980 y 1989 con levaduras, algo que lo llevó a ganar el premio Nobel y luego de esto comenzó su interés por el ARN.

JO: ¿Puede hablarnos acerca de su trabajo con ARN con Andy Ellington? ¿Cómo se llevó a cabo ese trabajo y cómo tomó usted las conclusiones de este nuevo descubrimiento?

JS: Claro, por supuesto. Nosotros comenzamos trabajando con la bioquímica del ARN y las ribozimas cerca de 1985. Mi primer estudiante en involucrarse fue Jennifer Doudna, más famosa por su trabajo con CRISPR. Con Jennifer y otros estudiantes maravillosos como Rachel Green, nosotros tratamos de usar las ribozimas que actúan naturalmente para hacer tanto replicación como reacciones siguiendo la idea del comienzo de la vida, donde el ARN podría auto-replicarse.

Eso fue muy interesante y promisorio, pero eventualmente llegamos a la conclusión que nosotros necesitábamos ser capaces de evolucionar alrededor de los

ARNs, porque las ribozimas son encontradas en la naturaleza no hechas para ser evolucionadas por química aplicada. Luego tuvimos la idea de encontrar nuevos ARNs que pudieran actuar como catalizadores a partir de una biblioteca de secuencias aleatorias.

Nosotros comenzamos con algo realmente simple, tratando de encontrar secuencias de ARN que se unieran a algunos blancos moleculares. Lo que realmente me interesó fue que cuando yo hablaba con algunas personas como, por ejemplo, expertos en estructura de proteínas, ellos me decían que la posibilidad de encontrar un ARN funcional, algo que se pudiera plegar a partir de secuencias aleatorias, era prácticamente imposible $1^{(50)}$. Pero otras personas con las que hablé decían "¡Oh no, es muy fácil!", ellos decían que secuencias que se unen a un blanco eran muy comunes, tal vez una en $10^{(5)}$. Todo este rango era incierto, entre $10^{(5)}$ y $1^{(50)}$.

Hablando con Andy Ellington y otras personas en el laboratorio, quisimos explorarlo. Ellington dijo que quería hacer los experimentos. Nosotros realizamos una gran colección de secuencias aleatorias fácilmente y fuimos capaces de purificar unas moléculas muy extrañas de estas librerías con diferentes pasos de purificación. Para nosotros tenía más sentido hacer enriquecimiento de las moléculas que se unían al blanco de interés por amplificación de muchas moléculas, enriquecerlas nuevamente y luego realizar varios ciclos. Y bueno, esto funcionó, no fue fácil, pero Andy desarrolló este método en mi laboratorio y fue exitoso en encontrar ARN que podía unirse a moléculas pequeñas como blanco y luego vino una gran explosión, luego encontramos otras moléculas catalíticas más interesantes.

JO: ¿Cómo es posible que podamos "manipular" los aptámeros para reconocer blancos específicos? Si los ácidos nucleicos tienen funciones ya preestablecidas por años de evolución...

JS: En realidad, no hay nada de especial, cuando nosotros tenemos una secuencia de nucleótidos, si la secuencia, es la secuencia adecuada, espontáneamente se plegará de forma 3D única, proyectando algunos grupos funcionales que le permiten interactuar con la molécula blanco. No creo que "entrenemos" los ARN, más bien nosotros encontramos las secuencias que ya existen y que harán una tarea como unirse a un blanco, unirse a moléculas pequeñas, un medicamento, una proteína. Pero las secuencias existen y nosotros las encontramos. Una vez las encontramos podemos agregar mutaciones y optimizar las uniones para que sean más fuertes o catalizar algunas reacciones más rápidamente. Pero es un proceso de optimización, por eso el término evolución para encontrar las mejores secuencias que puedan hacer el trabajo.

JO: Evolución *in vitro* es uno de mis términos favoritos para describir a la estrategia SELEX, ¿quién tuvo la idea de utilizar estos dos términos, evolución *in vitro* y aptámeros y por qué?

JS: El término aptámeros, creo que en realidad vino de Andy Ellington, a algunas personas no les gusta el término porque la primera parte "apta" viene del latín "aptus" que quiere decir algo así como "encajar" y mers, sabes es un sufijo griego, entonces es una palabra un poco difícil, pero yo creo que es un buen término porque describe fácilmente en varios ordenes lo que quiere decir. Básicamente son oligonucleótidos que encaja con el blanco. Y la idea con selección *in vitro,* es una vía para encontrar secuencias muy raras y luego continuar con opciones *in vitro* como en la evolución *in vitro,* es casi el mismo proceso, excepto porque en la última introduces más mutaciones y vas seleccionando los que tienen mejor actividad. Yo pienso, sabes, nuestros antecedentes principales tenían que ver con nuestra especialidad en genética, ya habíamos realizado selección en levaduras y en muchos organismos vivos, entonces para nosotros seleccionar moléculas no era algo muy diferente.

JO: ¿A través de los años, cual ha sido la aplicación práctica de los aptámeros que más le ha llamado la atención?

JS: Yo estaba más interesado en las implicaciones fundamentales de los aptámeros y ribozimas. Debo reconocer que la idea de utilizar aptámeros como anticuerpos no era mi esencia. En principio, todo lo que puedas hacer con anticuerpos, reconocer dominios de proteínas, en principio, puedes hacerlo con aptámeros de ARN o ADN. Pero ha tomado mucho tiempo desarrollarlo, desarrollar la química y resolver los problemas para su uso en terapéutica, hay ejemplos muy muy limitados. Yo pienso que la manera más fácil y práctica de aplicar los aptámeros es la aproximación diagnóstica. Creo que hay muchas ventajas ahí, ya que puedes sintetizar químicamente aptámeros con mucha estabilidad. Yo pienso que por el momento las aplicaciones diagnósticas son importantes, hoy en día se siguen desarrollando. Pienso que mucha gente está desarrollando aptasensores. Es un modo de usar los aptámeros con un dominio de reconocimiento y probablemente con algún par de dominios que da una señal detectable. La idea es detectar en tiempo real señales biológicas, lo cual creo que es muy interesante.

JO: Después de evaluar el potencial de los aptámeros, usted se enfocó en evaluar el potencial de los aptámeros de origen proteico. ¿Nunca estuvo interesado en comercializar esta tecnología?, o **¿estaba solo interesado en conocer las bases del origen de la vida?**

JS: Yo siempre estuve más interesado en entender las implicaciones en el origen de la vida. En los aptámeros de

ARN y ADN yo no percibí, de hecho, que tuvieran interés comercial, porque yo pensaba que era muy difícil y tomaría mucho tiempo y tendría muchos problemas, lo que es cierto. Pero gradualmente se han resuelto y la empresa de Larry Gold ha hecho unos avances enormes, con un gran personal que han obtenido grandes cantidades de colecciones de aptámeros.

Pero yo hice un protocolo para seleccionar secuencias de péptidos. Algunas personas nos dicen ¿para qué aptámeros de péptidos? Y es solo otra aplicación de la selección *in vitro* y en este caso yo si percibí una aplicación comercial. De hecho, comenzamos dos diferentes empresas para desarrollar esta aplicación del SELEX. No duraron mucho tiempo, la primera fue como un entrenamiento, la segunda fue más exitosa y todavía existe. Estas empresas han servido para desarrollar algunas buenas moléculas.

JO: Obviamente quiero preguntarle acerca de la hipótesis del Mundo del ARN. Cada vez hay más evidencia de su factibilidad**. ¿De acuerdo con su opinión cuál sería la prueba definitiva? ¿Las células artificiales que ustedes están creando?**

JS: Sí, nosotros estamos tratando de desarrollar, crear o construir en el laboratorio células muy muy simples que creemos deberían ser muy similares a las células primordiales o proto-células. Esta célula se compone de una hebra de ARNs y una membrana envolvente que pueda crecer y dividirse. Creo que estamos muy cerca de construir algo como eso. La parte más difícil ha sido demostrar la auto replicación del ARN sin el uso de ARN polimerasa o ribozimas, porque en el origen de la vida no había proteínas, enzimas, todo debió haber surgido de forma espontánea. Nosotros esperamos poder desarrollar un sistema químico donde se dé la replicación del ARN y se puedan replicar las proto-células. Nosotros esperamos que la evolución emerja de forma espontánea. Esa es la meta, creo que vamos bien y hemos hecho algunos progresos.

JO: Su trabajo es realmente increíble. Tengo una pregunta adicional que no tiene nada que ver con lo demás. Solo por curiosidad. **¿Qué se siente ganar el premio Nobel?**

JS: Risas. Tú sabes, es un momento realmente fascinante. Estuve muy feliz por eso. En realidad, no fue una gran sorpresa porque varias personas ya estaban hablando acerca de esa posibilidad por varios años. Obviamente es fabuloso tener ese tipo de validación o reconocimiento de tu trabajo. Fue muy bonito, pero ahora estoy concentrado en la evolución *in vitro* y el origen de la vida, porque son preguntas fundamentales que son lo más interesante para mí.

Capítulo 3. Estrategia SELEX

Como mencionamos en el capítulo anterior, SELEX son las siglas en inglés de *Selection of Ligands by Exponential Enrichment*, lo que en español sería similar a Selección de ligandos por enriquecimiento exponencial. Como se expuso anteriormente, la estrategia SELEX fue nombrada así por Tuerk y Gold, pero fue concebida por otros dos grupos de investigación en el mismo año, 1990.

3.1. Evolución *in vitro*

SELEX surgió en un contexto evolutivo, por esa razón, SELEX es también conocido como una técnica de evolución *in vitro*, debido a que, a partir de una población variable se seleccionan moléculas individuales contra un blanco específico bajo condiciones o presiones externas. Los ciclos repetitivos con aumentos de condiciones desfavorables nos permiten obtener al final del SELEX las moléculas más aptas para la tarea de reconocimiento molecular que fue planteada.

Desde este contexto evolutivo podemos plantear que la estrategia SELEX respeta los principios de la selección natural, como se muestra en la figura 10.

Desde el punto de vista técnico, la estrategia SELEX combina diferentes herramientas de biología molecular relativamente simples, que permiten en conjunto seleccionar de una biblioteca las moléculas que interactúan con un blanco en particular. Estas moléculas son amplificadas por PCR, lo que hace posible enriquecer la población y a medida que pasan los ciclos de selección, se podrán identificar patrones 3D y secuencias con afinidad por el blanco específico. En la figura 11, podemos ver una representación esquemática de la forma más simple de la estrategia SELEX.

Al final de SELEX, generalmente se lleva a cabo clonación de la población final, se realiza un ensayo transformando bacterias *E.coli* y se secuencia cada una de las colonias obtenidas que representan una única variante por el método tradicional de Sanger.

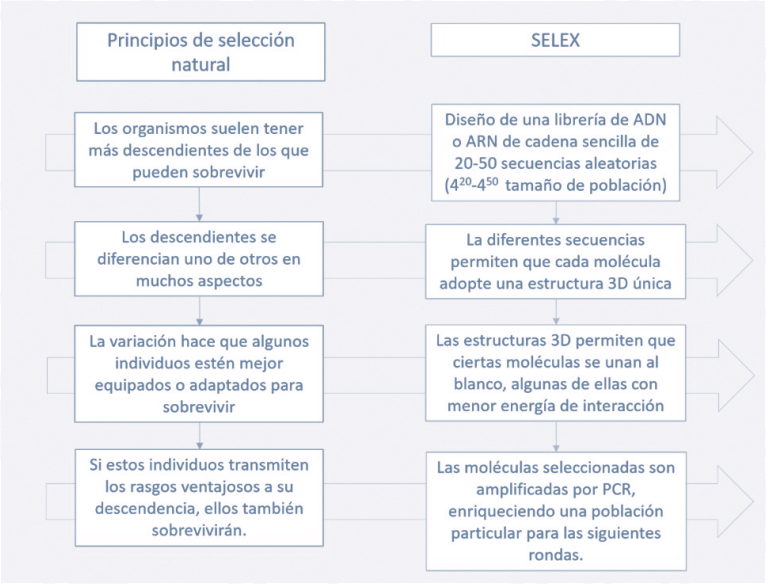

Figura 10. Comparación entre la selección natural y la estrategia SELEX. **Elaboración propia**

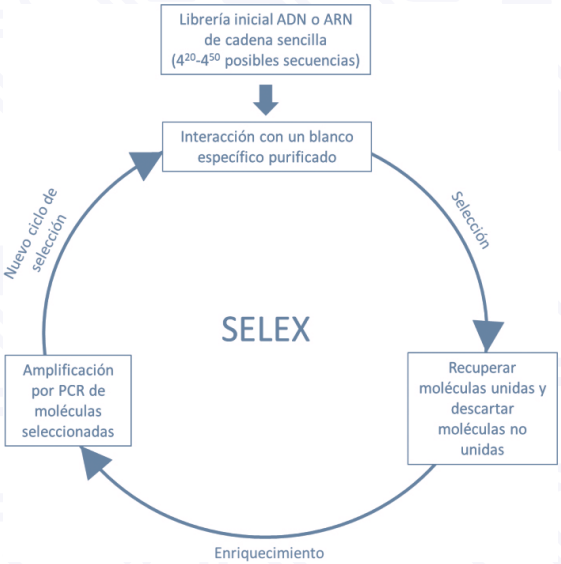

Figura 11. Representación esquemática de la estrategia SELEX. **Elaboración propia**

Con el pasar de los años se han implementado modificaciones en la estrategia SELEX para mejorar el proceso. Esto con el fin de hacerlo más rápido, eficiente y, sobre todo, para aprovechar toda la información posible obtenida de un experimento. Esta información es posible analizarla gracias al avance en otras disciplinas como la bioinformática, el aprendizaje automático (*machine learning*), los programas de predicción de estructuras secundarias, las tecnologías de secuenciación y el desarrollo de equipos de purificación y detectores de interacciones proteína- ácidos nucleicos.

3.2. Bibliotecas

Como mencionamos anteriormente la estrategia SELEX puede llevarse a cabo tanto con ARN como con ADN de cadena sencilla. El ARN desde la invención del SELEX fue la molécula de elección, debido a la presunción de que el ARN y no el ADN tenía la habilidad de adoptar estructuras funcionales. De hecho, el ARN tiene la capacidad de formar estructuras más complejas que el ADN. Como se mencionó en el capítulo 2, el ARN ya ha demostrado que puede adoptar estructuras tan complejas que le permiten actuar como enzimas y catalizar reacciones (ribozimas), por lo que son las moléculas perfectas para ser utilizadas como aptámeros.

Sin embargo, una serie de desventajas se han revelado con el pasar de los años, como, por ejemplo, el ARN tiende a perder más fácilmente su estructura si no se encuentra en un medio adecuado, son más susceptibles a degradación, en cada ciclo SELEX debe incorporarse un paso de transcripción reversa para poder ser amplificados por PCR, lo que aumenta la probabilidad de errores y más tiempo debe ser invertido para su selección. De hecho, la biblioteca inicial, generalmente es de ADN de cadena sencilla con un promotor T7 para realizar transcripción *in vitro* y luego, se obtiene la biblioteca de ARN. Cuando se comenzaron a utilizar bibliotecas de ADN para superar estas barreras del ARN, se revelaron rápidamente sus beneficios, son moléculas más fáciles de sintetizar, más estables y el proceso SELEX es más rápido, debido a que se puede usar la biblioteca luego de una breve preparación, no es necesario realizar transcripción reversa y las poblaciones obtenidas al final de la estrategia se pueden secuenciar directamente gracias al avance en la tecnología de secuenciación NGS (secuenciación de última generación).

Aunque las bibliotecas de ADN son ahora mucho más populares, es necesario resaltar que tanto ARN como ADN son moléculas que pueden ser usadas en el SELEX y que, dependiendo del objetivo y la necesidad de cada blanco o cada proyecto en particular, podría ser necesario utilizar una u otra opción. Por ejemplo, si mi proyecto de investigación busca identificar los sitios de reconocimiento de una proteína sitio específico en el ARN, obviamente la molécula a elegir para un

eventual SELEX será ARN. Si, por otro lado, quiero desarrollar un dispositivo diagnóstico que sea estable a cambios de temperatura, que me permita transportarlo sin refrigeración la molécula a elegir para el SELEX sería ADN.

Mas allá de elegir ARN o ADN para nuestra biblioteca inicial es necesario tener en cuenta otros aspectos. Por ejemplo, el tamaño de la región aleatoria de la biblioteca y el de las regiones conservadas para poder realizar las amplificaciones por PCR. Como mencionamos anteriormente, los tamaños de la región aleatoria pueden ir desde veinte a ochenta nucleótidos, incluso más. El tamaño de esta región nos indica que, a mayor tamaño, mayor variabilidad de secuencias, mayor cantidad de moléculas con estructura única para nuestra biblioteca inicial. Una región aleatoria de veinte nucleótidos nos permiten obtener teóricamente 4^{20} posibles variantes. Cuatro es el número de nucleótidos posibles en cada posición (adenina, timina, guanina y citosina). En este caso podríamos obtener hasta $1{,}09 \times 10^{12}$ moléculas diferentes, en el caso de usar una región aleatoria de cincuenta nucleótidos se podrían obtener hasta $1{,}26 \times 10^{30}$ moléculas diferentes.

A mayor cantidad de moléculas diferentes, más posibilidad de encontrar moléculas que puedan interactuar con nuestro blanco de interés.

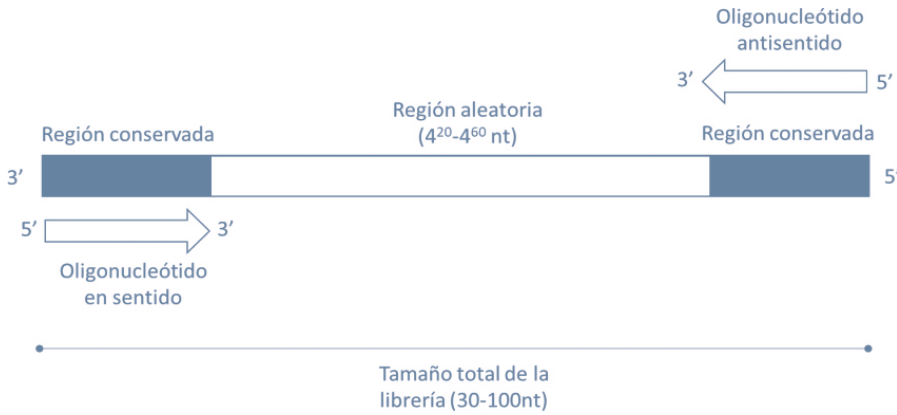

Figura 12. Representación esquemática del diseño de biblioteca y oligonucleótidos para la estrategia SELEX. **Elaboración propia**

Por otro lado, aptámeros de mayor longitud pueden adoptar estructuras 3D más complejas e intrincadas que permitan una mayor afinidad con el blanco de interés. La desventaja estaría en la síntesis de biblioteca y oligonucleótidos de gran tamaño que aumentaría los costos de producción.

En la figura 12 se muestra cómo se realiza el diseño de la biblioteca y los oligonucleótidos necesarios para amplificar las secuencias de interés tras cada ciclo de selección.

Actualmente, existen muchas empresas dedicadas a la síntesis de oligonucleótidos y se ha observado que hay una variabilidad entre las bibliotecas que se obtienen de una empresa a otra. Es necesario que la relación de cada uno de los oligonucleótidos sea igual y puedan incorporarse en las regiones aleatorias en la misma relación, así se garantiza que la biblioteca tenga la heterogeneidad deseada del 25 % A, 25 % T, 25 % C y 25 % G. Esto podría comprobarse por medio de secuenciación NGS de la biblioteca inicial y así garantizar una estrategia SELEX exitosa.

3.3. Moléculas blanco

Los principales blancos utilizados en la estrategia SELEX para obtener aptámeros son las proteínas. Sin embargo, en la literatura científica se puede apreciar la gran cantidad de blancos de diferentes tamaños y naturaleza que han sido reconocidos por los aptámeros. Por ejemplo; iones, colorantes orgánicos, moléculas inorgánicas pequeñas, péptidos, células completas, virus, bacterias, parásitos, células cancerígenas, e incluso órganos completos. Pero para entender cómo puede seleccionarse un blanco, debemos ir paso a paso y estudiar cada uno de los casos.

Varios puntos importantes deben considerarse a la hora de diseñar una estrategia SELEX dependiendo de la naturaleza del blanco. Si el blanco es una proteína como sucede en la mayoría de los casos debemos preguntarnos: ¿es una proteína soluble o insoluble?, ¿es una proteína que pueda adaptarse a una matriz?, ¿es una proteína que no puede adaptarse a una matriz y está en estado libre?

Si la proteína puede unirse a un marcador como los más comúnmente utilizados, es decir, una proteína que pueda unirse a un *tag* como histina (His-tag), glutatión S transferasa (GST-tag), proteína de unión a maltosa (MBP-tag), hemaglutinina (HA), entre otros. Si este fuese el caso, podemos pensar en anclar la proteína a una columna de afinidad de forma reversible.

Ahora bien, ¿es posible sensibilizar un plato de ELISA con la proteína de interés? En este caso podríamos pensar en una estrategia SELEX más similar a una ELISA tradicional que se denomina ahora ELASA (*A sandwich Enzyme-linked aptamer sorbent assay*) o técnicas como

ELONA (Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay) que básicamente permiten seleccionar aptámeros y al mismo tiempo estandarizar una potencial prueba diagnóstica.

¿El blanco del cual queremos obtener un aptámero es una sustancia presente en aguas contaminadas? En este caso deberíamos pensar en inmovilizar la biblioteca de aptámeros y luego poner las muestras de aguas donde los aptámeros están inmovilizados, posteriormente podrían ser seleccionados por técnicas como interferometría para ser amplificados por PCR. Lo que trato de decir es que el diseño experimental de la estrategia SELEX es fundamental para el éxito de la técnica. Voy a poner un par de ejemplos que parecieran ser absolutamente irreales si no conocemos muy bien la capacidad de los aptámeros, pero los cuales son bastantes inspiradores para cualquiera que comience en este mundo.

Una modificación de la estrategia SELEX llamada *live*-SELEX (o SELEX en vivo), experimentó con la posibilidad de obtener aptámeros que tuvieran la capacidad de atravesar la barrera hemato-encefálica. Como sabemos, esto es un desafío enorme, puesto que muchos medicamentos contra enfermedades neurológicas no tienen esta capacidad, debido a su alto peso molecular.

Para poner en contexto, la barrera hemato-encefálica está formada por células cerebrales endoteliales que están conectadas por uniones estrechas con una resistividad eléctrica muy baja, de al menos 0,1 1.m, con un espacio límite de 8 μm para el paso de ciertos componentes vitales como glucosa y agua. Muchos medicamentos han fracasado en este intento por acceder a la barrera hematoencefálica. Obtener moléculas que puedan acceder sería clave para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, encefalitis, epilepsia, entre otras.

Como se mencionó anteriormente en el capítulo 1, los nanoanticuerpos parecieran tener esta capacidad debido a su bajo peso molecular, pero esto todavía está por investigarse. Los aptámeros abren una nueva posibilidad por su bajo tamaño molecular, su capacidad de adaptar su estructura para penetrar tejidos pequeños y su labilidad que lo hace menos probable de causar efectos secundarios.

Chen y colaboradores en 2013 llevaron a cabo una estrategia de SELEX *in vivo*[14]. Utilizaron ratones vivos, inyectando bibliotecas de aptámeros a través de la vena de la cola, y después de un tiempo específico, se sacrificaba el animal y se extraían los órganos. Por medio de PCR se recuperaron los aptámeros. Un grupo de estos tuvo la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica tras ser recuperados del tejido cerebral de los animales. Tras ser amplificados por PCR estos aptámeros se usaron en una nueva ronda de selección. El aptámero denominado A15 pudo ser recuperado en el parénquima del cerebro y fue el primero reportado con esta capacidad, la cual puede ser muy promisoria para múltiples aplicaciones.

Por otro lado, Mao y colaboradores en 2020 desarrollaron biosensores basados en aptámeros acoplados a biomateriales para la detección de sustancias ilícitas en aguas residuales, con el objetivo de realizar la evaluación epidemiológica del consumo de drogas [15]. Estos aptámeros tienen capacidad de reconocer: metanfetaminas, cocaína, codeína, a través de revelado colorimétrico, electromagnético y fluorescente. Esto demuestra el potencial de los aptámeros para reconocer blancos pequeños.

Así como estos, hay cientos de ejemplos de aptámeros que pueden reconocer gran variedad de blancos. Cabe resaltar que los aptámeros al poder detectar moléculas NO inmunogénicas tienen un amplio rango de aplicaciones donde superan con creces a los anticuerpos. Otros grupos de investigación se han dedicado a tratar de reemplazar de alguna manera las aplicaciones de los anticuerpos y reducir los costos, mejorar la sensibilidad, acelerar los procesos de obtención, garantizar una disponibilidad que evite retrasos en los procesos por cuestiones de importación, entre muchas cosas más.

En este libro se busca hacer una invitación a esas mentes curiosas, nuevos investigadores o investigadores ya consolidados para que conozcan estas moléculas y piensen en cómo podrían utilizarlas en sus investigaciones.

En el ICMT-CES hemos implementado el tópico de aptámeros en la Maestría en Ciencias Biológicas y la Maestría en Medicina Tropical, la cual ha tenido una gran acogida por parte de los estudiantes que, al final de las clases, cuando les hacemos la pregunta: ¿dónde creen que los aptámeros podrían ser útiles? Terminan planteando grandes ideas que se han ido materializando poco a poco.

3.4. Selección positiva y selección negativa

La selección positiva se refiere a la obtención de aptámeros contra un blanco definido. Es el blanco que queremos que los aptámeros reconozcan. Por otro lado, la selección negativa o contraselección se refiere a un blanco que no

queremos que sea reconocido por nuestros aptámeros. Cada ronda de la estrategia SELEX que hemos explicado anteriormente es una ronda de selección positiva. Con el avance de la estrategia SELEX se fueron incorporando rondas de selección negativa que permiten hacer a los aptámeros más específicos. Por ejemplo, si deseo obtener aptámeros que reconozcan de forma específica un biomarcador patógeno en muestras de suero, sería ideal implementar en mi estrategia SELEX un paso de selección negativa contra proteínas "normales" o que están presentes en pacientes sanos sin presencia del biomarcador. En la selección negativa pondríamos nuestra biblioteca a interactuar contra las proteínas que no queremos que sean reconocidas y, en este caso, las moléculas de ADN o ARN que se unan a ellas serán descartadas y las moléculas que no se unen serán recuperadas y posteriormente amplificadas por PCR.

La incorporación de selección negativa a la estrategia SELEX ha permitido filtrar aptámeros que reconocen proteínas con una sola mutación puntual, como en el caso del estudio realizado por Chen y colaboradores en 2015, que obtuvieron un aptámero de ARN (p53R175H-A) que tiene afinidad significativamente mayor por la proteína mutante p53R175 que por la proteína nativa p53, tanto *in vitro* como *in vivo* [16].

En trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación (Laboratorio de Biología Molecular II de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía (ENMyH) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en la Ciudad de México), también hemos obtenido aptámeros específicos para una proteína mutante, en nuestro caso fue la proteína EhCFIm25 de *E. histolytica*, que con una mutación sitio dirigida en el aminoácido Y236, pierde la capacidad de ser reconocida por los aptámeros C4 y C5 que contienen la secuencia de unión de la proteína al ARN para llevar a cabo su función en el proceso de corte/poliadenilación de los ARN mensajeros [17].

En el Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT-CES), también hemos llevado a cabo rondas de selección negativa para la obtención de aptámeros que reconocen biomarcadores específicos para la Leishmaniasis (cutánea y mucosa) y Enfermedad de Chagas, donde se usaron muestras de pacientes sanos para aumentar la especificidad de los aptámeros por los biomarcadores específicos de cada enfermedad [18].

3.5. Identificación de los aptámeros

En la estrategia SELEX clásica, debido a la tecnología presente en el momento del descubrimiento de la técnica, la identificación de los aptámeros se realizaba tras clonar la ronda final de amplificación del SELEX en un vector o plásmido. Luego, el plásmido era transformado en bacterias *E.coli* y, posteriormente, cada colonia obtenida correspondía a una

clona independiente. Era necesario entonces seleccionar por lo menos 50-100 colonias individuales (dependiendo de los recursos de cada laboratorio) para extraer el plásmido y luego identificar la secuencia nucleotídica por medio de secuenciación tipo *Sanger*.

Una vez obtenida la información nucleotídica individual, se procedía a realizar una comparación de las diferentes secuencias: para la identificación de similitudes, motivos, y estructuras que permitieran agrupar los aptámeros por grupos o familias.

Desde la finalización del proyecto "Genoma Humano", las mejoras tecnológicas y la automatización han aumentado la velocidad y reducido los costos de la secuenciación, al punto que genes individuales pueden secuenciarse de manera rutinaria. La secuenciación de última generación (NGS por sus siglas en inglés) que puede ser acoplada al SELEX, nos permite identificar como mínimo cien mil lecturas individuales. Es decir, las bibliotecas y cada una de las rondas de selección pueden ser identificadas sin necesidad de clonar los productos-de PCR ni transformar en bacterias. Con una mínima preparación de la muestra es posible identificar casi todas las moléculas presentes en cada ronda de selección a precios muy accesibles (200-500 USD).

Las tecnologías de secuenciación más reconocidas son Illumina (Solexa), Roche 454, Ion torrent: Proton/PGM, y SOLiD. Cada una de ellas tiene ciertas ventajas y desventajas que no vamos a profundizar en este libro y que va a depender de la utilidad y el tipo de experimento y resultados que queremos obtener. La tecnología que hemos identificado que mejor se acopla al SELEX es Illumina.

3.6. Nuevos tipos de SELEX

A medida que se han ido incorporando nuevas moléculas blanco, tecnologías para identificar las interacciones blanco- aptámeros, tecnologías de secuenciación y nuevas visiones de investigadores de todo el mundo, en la estrategia SELEX han surgido algunas variantes que son bastante interesantes de repasar.

3.6.1. *Counter*-SELEX

Este tipo de SELEX fue descrito por primera vez por Jenison y colaboradores en 1994 [19], en él se realiza un paso previo de selección negativa con moléculas homólogas al blanco, en este caso la teofilina (homólogo de la cafeína). La biblioteca inicial se dejó interactuando con las moléculas de teofilina y, posteriormente, se descartaron las moléculas de ARN que se unían a dichos homólogos. Esto incrementó de manera exponencial la afinidad de los aptámeros obtenidos contra la cafeína casi que un orden de magnitud.

3.6.2. *Cell*-SELEX

En esta metodología no se usa como blanco una proteína ni un compuesto purificado, sino que se utilizan células completas vivas para la selección de aptámeros. Esta estrategia ha permitido que, los aptámeros obtenidos sean más aptos para su uso como herramienta diagnóstica y para el tratamiento de enfermedades e infecciones, debido a que la estrategia está diseñada para detectar una célula en sus condiciones fisiológicas normales.

Esta metodología se ha usado por ejemplo para la identificación de células infectadas por virus. Estas células expresan determinados marcadores de superficie que permiten identificarlas[20]. También puede utilizarse para la búsqueda de biomarcadores desconocidos, ya que no es necesario que el blanco sea previamente identificado y purificado.

Además, se han implementado estrategias en las cuales se usan modelos animales como, por ejemplo, ratones a los que se les inyecta la biblioteca de aptámeros vía sanguínea, posteriormente son sacrificados y los aptámeros son recuperados de los diferentes órganos para amplificarlos por PCR. Esta estrategia ha servido para obtener aptámeros que tienen afinidad por distintos órganos como hígado, páncreas e incluso el cerebro [21].

3.6.3. *Capillary Electrophoresis* CE-SELEX

Esta variante de SELEX fue diseñada para seleccionar aptámeros, reduciendo el número de ciclos necesarios sin comprometer su afinidad, ya que los aptámeros obtenidos siguen teniendo bajas constantes de disociación.

Este método permite separar los ácidos nucleicos unidos al blanco de los que no están unidos con base a su movilidad, por lo que pueden obtenerse en fracciones separadas. No solo decrece el tiempo de obtención de los aptámeros, sino que también reduce la variabilidad por manipulación y los costos, puesto que se reduce el número de rondas. Con esta estrategia pueden aislarse aptámeros de alta afinidad en solo 2-4 rondas [22].

3.6.4. *Microfluidic* SELEX

Esta metodología combina el SELEX tradicional con un sistema de micro fluidos. El blanco debe ser inmovilizado en algún tipo de matriz mientras las bibliotecas fluyen e interactúan con esta molécula blanco. Esta técnica potencia la eficiencia de selección y reduce tiempo y esfuerzo comparado con el SELEX tradicional. Con esta estrategia pueden aislarse aptámeros en solo 3 rondas con un tiempo total de solo diez horas [23].

3.6.5. *Genomic* SELEX

La principal diferencia del SELEX tradicional y el Genomic SELEX es la biblioteca inicial usada para la selección. En esta estrategia se usan bibliotecas derivadas de ADN genómico. Por lo tanto, solo se identificarán interacciones que ocurren naturalmente en el genoma examinado[24].

3.6.6. *Chimeric* SELEX

Esta estrategia pretende utilizar aptámeros con una función previamente definida para ser usados como biblioteca de una nueva estrategia SELEX. Así, pueden llegar a obtenerse aptámeros con doble función de reconocimiento para dos moléculas blanco, reconociendo dominios estructurales diferentes [25].

3.7. SELEX Vs Inteligencia Artificial

Cada dos años durante casi treinta años se ha estado realizando la competencia de Evaluación Crítica de Predicción de Estructuras (o CASP por sus siglas en inglés). En esta competencia en la que participan alrededor de cien grupos especialistas en bioinformática, aprendizaje automatizado e inteligencia artificial se busca descifrar la estructura tridimensional de proteínas, a partir de su secuencia aminoacídica lineal. Durante muchos años e incluso ahora, la estructura tridimensional de una proteína había sido determinada a través de métodos fisicoquímicos como la cristalografía, la resonancia magnética y últimamente la Cryo- EM. En el último CASP realizado los primeros días de diciembre de 2020, un grupo de Google denominado DeepMind con su programa AlphaFold2 alcanzó un puntaje de predicción de 92,4 sobre 100, dejando muy por detrás a sus competidores.

En el mundo del ARN también se han realizado avances importantes en la predicción de estructuras. En la actualidad existen programas que nos permiten observar la estructura predicha de un ARN con base en la energía mínima necesaria para su plegamiento como ViennaRNA, MFold y Rosetta. Otros programas como GROMACS, Amber y sus variantes, posibilitan evaluar la dinámica molecular.

Sin embargo, en comparación con las proteínas, hay un camino muy largo por recorrer. El programa AlphaFold2 fue entrenado con alrededor de 170000 estructuras tridimensionales confirmadas, mientras que el programa más actual para la predicción de ARNs (ARES) desarrollado en la Universidad de Stanford solo tenía disponibles 18 estructuras confirmadas experimentalmente.

Tal vez la pregunta no sea si la inteligencia artificial reemplazará al SELEX en un futuro, sino como la potenciará, realizando una discriminación previa de las mejores moléculas para mejorar los diseños de las bibliotecas y esto verse traducido en tiempos más cortos de selección. Por el momento la estrategia SELEX no tiene contrincante.

Capítulo 4. Aptámeros versus anticuerpos

Como hemos expuesto a lo largo de los capítulos anteriores, los aptámeros tienen muchas ventajas significativas sobre los anticuerpos monoclonales. La principal y, diría yo, que es la más importante, es su naturaleza química. Los aptámeros pueden obtenerse totalmente *in vitro* sin necesidad de utilizar modelos animales, lo cual es una ventaja no solo de facilidad, sino también de costos de producción, tiempo de obtención, cuestiones éticas y de equipamiento.

4.1. Tiempo de obtención

En la figura 13 se ve cómo los anticuerpos monoclonales utilizan modelos animales, los cuales son inmunizados con un antígeno. El modelo animal produce anticuerpos naturalmente, lo que puede tomar por lo menos tres meses. Luego, las células productoras de anticuerpos son aisladas del bazo del animal y se fusionan con células de crecimiento ilimitado. Dependiendo de la experiencia y la tecnología del fabricante se obtienen hibridomas viables en algunas semanas o meses. Posteriormente, debe aislarse uno de estas hibridomas, expandirlo en cultivo y seleccionar los anticuerpos.

En el caso de los anticuerpos policlonales, el proceso es un poco más sencillo, ya que luego de inmunizar el modelo animal, se recuperan los anticuerpos producidos naturalmente en el suero y se realiza la purificación total de los anticuerpos producidos, lo cual puede tomar según la experiencia del fabricante entre seis y doce meses. En el caso de los aptámeros, la estrategia SELEX puede tomar unos días o un par de meses dependiendo de la tecnología que se use. Posteriormente, con el avance en las nuevas tecnologías de síntesis química de ácidos nucleicos y secuenciación, el análisis y obtención de aptámeros toma un par de días a unas semanas. Por todo esto, el tiempo de obtención de aptámeros puede estar entre una semana y cuatro meses, dependiendo de los recursos del laboratorio y la facilidad para acceder a estas tecnologías. Lo que es un tiempo considerablemente menor a los 4-18 meses para obtener anticuerpos policlonales y/o monoclonales.

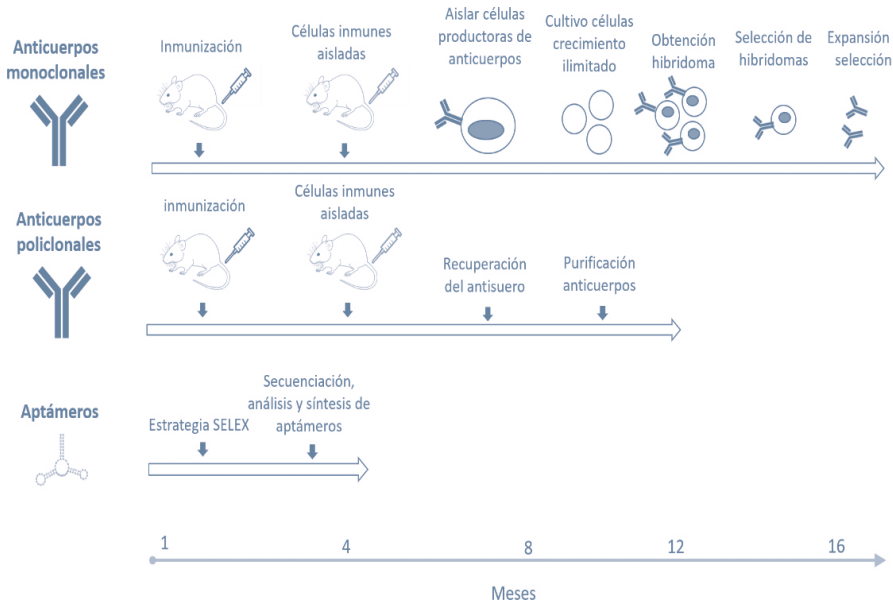

Figura 13. Comparación en los tiempos de obtención de anticuerpos y aptámeros. **Elaboración propia**

4.2. Tamaño

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas plasmáticas de alto peso molecular, entre 150 y 900 kilodaltons (kDa). Los aptámeros tienen un peso molecular entre 8 a 15 kDa. El tamaño juega un rol muy importante en la penetración de tejidos y en la eliminación vía renal. A menor tamaño, mayor posibilidad de acceder a localizaciones intracelulares, órganos, barrera hematoencefálica, entre otras. Sin embargo, el menor tamaño de los aptámeros también puede representar un problema, debido a que será eliminado más rápidamente por vía renal si se utilizan como agentes terapéuticos a nivel parenteral. Este problema ya tiene una solución, puesto que químicamente se pueden incorporar moléculas como Polietilenglicol (PEG), que aumenta el peso molecular de los aptámeros y, por tanto, su biodisponibilidad para llevar a cabo una función dentro de un organismo.

4.3. Estabilidad

Los aptámeros son mucho más estables que los anticuerpos y tienen un mayor

tiempo de vida media. Una vez obtenidos los anticuerpos deben ser conservados con una estricta cadena de frío que, si es rota, puede modificar su función e incluso degradarse y quedar inutilizables. Los aptámeros al ser ácidos nucleicos pueden ser liofilizados, transportados a temperatura ambiente, reconstituidos, y adoptarán nuevamente su estructura en el buffer adecuado. Esta característica es principalmente importante si se piensa en la utilización de los aptámeros para llegar a zonas rurales alejadas de congeladores, y centros de salud especializados. Por ejemplo, sería una gran alternativa para desarrollar pruebas diagnósticas de campo, de bajo costo, fácil manejo y gran estabilidad.

4.4. Variación lote a lote

Un problema común con los anticuerpos es la variación entre lotes. Los aptámeros al ser sintetizados químicamente y poder ser comprobados por secuenciación, reducen la variabilidad por completo. Lo que conduce a menores pérdidas económicas, alta precisión en la producción a gran escala y confiabilidad para las diferentes aplicaciones.

4.5. Modificaciones químicas

Los aptámeros pueden ser modificados químicamente desde el comienzo de la selección o una vez han sido seleccionados. Esto con la finalidad de mejorar su estabilidad e incluso su afinidad. Es posible incorporar, por ejemplo, bases adicionales para crear estructuras más complejas. Las modificaciones pueden ser incorporadas en cualquier posición de la cadena de nucleótidos. Los anticuerpos pueden ser también modificados químicamente, pero las modificaciones sitio específicas son extremadamente difíciles y cualquier modificación puede alterar la afinidad de los anticuerpos por su blanco.

4.6. Obtención *in vitro*

La obtención de los aptámeros a través de técnicas *in vitro* permite, por ejemplo, crear moléculas para detectar componentes tóxicos. Si se quisieran obtener anticuerpos contra estos compuestos, se deberían inocular en un modelo animal que tal vez no sobrevivan. El proceso SELEX puede llegar a ser completamente automatizado sin la intervención de variables del operador, lo que los hace más escalables y repetibles entre laboratorios. El hecho de no tener que usar un modelo animal hace que todo el proceso sea más rápido y menos costoso, e incluso que pueda llevarse a cabo en laboratorios de investigación sin grandes presupuestos.

4.7. Costo

Por todo lo expuesto anteriormente, es indudable que obtener aptámeros es significativamente más costo-efectivo que obtener anticuerpos. Proponer proyectos de investigación en los cuales se implemente la tecnología SELEX y

aptámeros específicos, permitirá que esta metodología pueda popularizarse y poco a poco ganarse un lugar a fuerza de demostrar sus capacidades y aplicaciones.

4.8. Nueva generación de aptámeros

La selectividad de los aptámeros es mucho menor que la de los anticuerpos. Esto es debido a que los ácidos nucleicos cuentan con el esqueleto de azúcar y fosfato y solo cuatro bases nitrogenadas. Por su parte, los anticuerpos cuentan con veinte aminoácidos que les ofrece mayor repertorio a la hora de reconocer un blanco. Esta limitación ya había sido identificada y fue resuelta por la empresa SomaLogic en cabeza del Dr. Larry Gold. Ellos adicionaron químicamente diferentes grupos funcionales a los oligonucleótidos. Por ejemplo, los SOMAmers (aptámeros creados por SOMAlogic) han sido modificados en la posición 5′ de los residuos de uracilo, estos permiten la captura de moléculas blanco en una plataforma llamada SOMAscan, donde pueden acoplarse miles de aptámeros para la identificación de múltiples blancos al mismo tiempo en una misma muestra.

Capítulo 5. Aplicaciones de los aptámeros

5.1. Herramienta terapéutica

Como se mencionó en el capítulo 2, el primer aptámero aprobado por la FDA para su uso terapéutico fue el Macugen para el tratamiento de la Degeneración Macular asociada a la edad. El uso de aptámeros como herramienta terapéutica tiene gran potencial. Solo es cuestión de imaginar las posibles aplicaciones de los aptámeros como anticuerpos químicos. Ciertas patologías relacionadas con la ineficiente producción de anticuerpos naturales podrían ser compensadas por la creación de anticuerpos químicos.

Además, el hecho de que los aptámeros puedan reconocer blancos que no sean inmunogénicos abre una gran cantidad de perspectivas. Muchos biomarcadores y moléculas claves de ciertas enfermedades al no ser inmunogénicos son descartados como blanco, porque los anticuerpos no pueden reconocerlos.

5.2. Diagnóstico de enfermedades

Una de las aplicaciones de los aptámeros con mayor potencial en la actualidad es el diagnóstico de enfermedades. Esto debido a que, al no tener que ser administrado a los pacientes, hay menos cuestiones regulatorias para que sean aprobados. La fabricación de pruebas de diagnóstico rápido (RDT por sus siglas en inglés) o biosensores, es un área donde los aptámeros pueden ser muy fuertes, debido a su estabilidad térmica, sensibilidad, especificidad y costo. Además, su estabilidad permitiría llegar a sitios remotos donde no hay laboratorios especializados de diagnóstico.

5.3. Control ambiental

Se ha demostrado que los aptámeros tienen la capacidad de detectar metales pesados (arsénico, cadmio, plomo, plata, mercurio, entre otros), toxinas de importancia en agricultura (toxinas del agua, pesticidas, insecticidas, bio productos industriales, subproductos farmacéuticos, entre otros) y patógenos en cuerpos de agua (*Salmonella, E. coli, S. aureus, M. aeruginosa, L. monocitogenes, P. aeruginosa*,

diferentes especies de *Vibrio*, entre otras). Muchos de estos blancos no pueden ser detectados por anticuerpos, lo que hace que los aptámeros tengan un gran campo de acción en esta materia.

5.4. Acarreador de medicamentos

Los aptámeros pueden reconocer e interactuar con blancos como receptores antigénicos y diferentes biomarcadores. Lo interesante de esto es que pueden tener diversos efectos como, por ejemplo, agonismo, antagonismo, supresión, e incluso destrucción. Además, los aptámeros son moléculas con excelente permeabilidad tisular, gran variedad de blancos para detectar, buena estabilidad y facilidad para ser modificables.

5.5. Imagenología

Los aptámeros pueden ser conjugados con muchos tipos de moléculas para potenciar su señal. Pueden acoplarse a moléculas para ser detectados por fluorescencia, moléculas radioactivas, micro y nano burbujas o potenciadores de señales de protones para ser localizados por MRI, ultrasonido o PET con mapeo computacional. Además, poseen la propiedad de plegarse en tejidos fijados *in vivo*, lo cual es valioso para el estudio de biomoléculas y metabolitos al momento de su síntesis, acumulación, compartimentalización y degradación.

Uno de los primeros aptámeros fluorescentes fue reportado por el laboratorio de Roger Tsien en 2003 [26]. En este trabajo describen la interacción de tintes de trifenilmetano con secuencias de ARN específicas y lo llamaron el aptámero verde malaquita. Este aptámero fluorescente incrementaba hasta en dos mil veces la intensidad de la fluorescencia del reactivo. Sin embargo, el uso de trifenilmetano poseía dos grandes problemas. El primero, era que el tinte era fluorescente *per se*, esto significa que la fluorescencia ya estaba presente aun antes de unirse con el aptámero. En efecto, la unión con el aptámero resultaba en un incremento de la fluorescencia, pero la discriminación con la fluorescencia de fondo dificultaba la interpretación de los resultados. El segundo problema yacía en la estructura química del tinte.

Una vez expuesto a la luz el trifenilmetano tiende a oxidarse y a formar especies reactivas de oxígeno, las cuales en exceso tienen un efecto tóxico en las células. A pesar de estos inconvenientes, dicho estudios fueron pioneros para la optimización de los aptámeros en imagenología. Por ejemplo, versiones modificadas de este ensayo sirvieron para comprender los efectos de la sustitución de nucleótidos en el plegamiento de los aptámeros, la tolerancia a la temperatura y pH, entre otros.

Años después, en el laboratorio del Dr. Saime Jaffrey se evaluó un nuevo enfoque, comenzando por el diseño del fluoróforo. Se sintetizó una molécula que se asemeja a los tres aminoácidos

que producen la fluorescencia en la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) [27]. Dentro de las cualidades que tenía este fluoróforo se encontraba que mientras no estuviera acoplado con el aptámero no se producía fluorescencia y, además, no presentaba efecto citotóxico sobre las células una vez excitado por la luz. A este nuevo aptámero se le denominó espinaca o "*Spinach*" (figura 14).

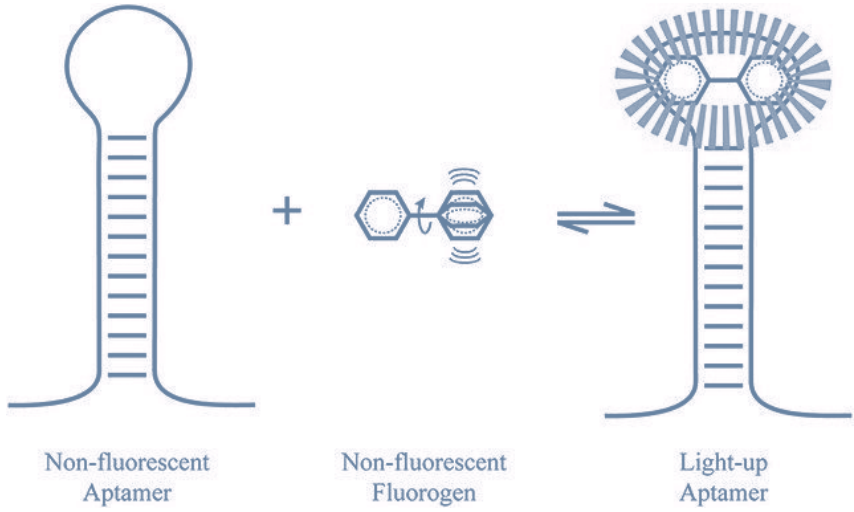

Figura 14. Estructura del aptámero espinaca. **Tomado de:** Paige et al., 2011 [27]

Este trabajo abrió las puertas para una nueva generación de fluróforos químicos y los aptámeros, expandiendo la paleta de colores. En el espectro verde podemos encontrar los siguientes aptámeros: Spinach, Spinach2, iSpinach, baby Spinach y Broccoli. Otros como el aptámero Mango pueden emitir fluorescencia en el rango de los rojos y naranjas.

Mango es un aptámero de sesenta nucleótidos, el cual se acopla con el tinte thiazol naranja (TO1). La fluorescencia producida por este complejo puede incrementar hasta 1100 veces [28]. Una de las desventajas observadas es que el thiazol naranja puede unirse a otros ácidos nucleicos produciendo fluorescencia indeseada. Para evitar este problema se han sintetizado otros derivados del TO1. Igualmente, se han realizado mejoras en el diseño y la selección del aptámero (Mango II, Mango III y Mango IV), obteniendo mejores propiedades fluorescentes y que, además, pueden plegarse en presencia de formaldehído, esto permite la ejecución de experimentos tanto

in vivo como en células o tejidos fijados [29; 30]. Existen también otros aptámeros fluorescentes llamados Corn, Broccoli Red y Broccoli Orange; de los cuales, vale la pena seguir de cerca su desarrollo y perfeccionamiento.

5.6. Búsqueda de biomarcadores

La tarea de identificar biomarcadores específicos para una patología en particular no es nada sencilla. En primer lugar, debemos asegurarnos de que estos biomarcadores solo se expresan bajo cierta condición en particular y no están presentes en otra patología, ya que podrían ser un problema para el diagnóstico diferencial. El biomarcador debe ser caracterizado y dependiendo de su naturaleza química pueden o no obtenerse anticuerpos contra estos. Si son proteínas, debe evaluarse si son o no inmunogénicas para generar anticuerpos en el modelo animal. Todo esto implica la elaboración de un proyecto de investigación que puede tardar años en ser desarrollado.

Una gran ventaja de los aptámeros es que pueden ser obtenidos contra un blanco que no haya sido identificado e incluso ni siquiera purificado. Modificaciones de la estrategia SELEX como el cell-SELEX, permiten obtener aptámeros contra células completas (cancerígenas, bacterias, parásitos, células infectadas con algún virus, entre muchas otras) e implementando estrategias de selección negativa puede enfocarse en la selección de aptámeros contra una célula particular con alta precisión. Esta estrategia inversa es de gran utilidad, ya que en muchas patologías no se han identificado biomarcadores específicos y esta es una gran alternativa para empezar a identificarlos.

Al final de la estrategia SELEX existen cientos de técnicas que permitirían la identificación de los biomarcadores como, por ejemplo: secuenciación de proteínas acopladas a aptámeros por espectrometría de masas, identificación de compuestos por cromatografía de exclusión molecular, secuenciación NGS de ácidos nucleicos acoplados a aptámeros, entre otras.

5.7. Entrevista Dr. Víctor M. González (Hospital Universitario Ramón y Cajal- Madrid España)

El Dr. González es Doctor en Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid. Hizo su estancia posdoctoral en el centro de Biología Molecular Severo Ochoa en Madrid y luego en el *Cancer Center and Geriatric Center* de la Universidad de Michigan. Luego regresó a Madrid y realizó una nueva estancia posdoctoral en la Universidad de Alcalá y en el Centro Nacional de Biotecnología de Madrid. En 2002 se incorporó al

Instituto de Investigación Sanitaria Ramón y Cajal de Madrid donde fundó el grupo de aptámeros. Ha dirigido gran cantidad de proyectos de investigación y es autor de por lo menos 7 patentes. Luego entre 2007 y 2009 cofundó Bioaptamer y en 2010 cofundó Aptus Biotech. Sin duda alguna uno de los investigadores más destacados y con mayor conocimiento hoy en día de la estrategia SELEX, los aptámeros y sus aplicaciones.

JO: Bienvenido Dr. González, gracias por aceptar mi invitación.

Hemos tenido la oportunidad en días previos de poder entrevistar a los pioneros de esta tecnología [SELEX]. El Dr. Larry Gold y el Dr. Jack Szostak quienes nos contaron sus experiencias desde el punto de vista químico y evolutivo respectivamente, lo que fue muy interesante. Hoy estamos aquí con el Dr. González para hacerle unas preguntas y conocer el presente y el futuro de los aptámeros.

JO: ¿En primer lugar me gustaría saber cuándo fue su primer encuentro con el SELEX y los aptámeros y que fue lo que más le llamó la atención para comenzar a estudiarlos?

VG: Primero gracias por la presentación, muy amable. Respondiendo a tu pregunta, mi primer contacto con los aptámeros fue en año 2000 cuando vine de EE. UU de hacer mi estancia posdoctoral y allí conocí a alguien que había trabajado en el laboratorio del Dr. Larry Gold. Aunque ellos no trabajaban en aptámeros me comentó un poco en qué consistía la tecnología y la verdad es que lo ví muy interesante, era una gran desconocida para todos en ese momento y la verdad es que me apasioné y me decidí a tratar de trabajar en esa temática. Ya han pasado más de 20 años y creo que no fue una mala elección.

JO: A principios de los años 90 cuando Larry Gold fundó NeXagen donde logró desarrollar un aptámero contra El Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que es usado para el tratamiento de la Degeneración Macular asociada a la edad en su forma húmeda. Parecía que los aptámeros iban camino a explotar sus aplicaciones terapéuticas, pero solo este aptámero ha sido aprobado por la FDA, hay muchos otros aptámeros en ensayos clínicos, pero al parecer ha sido más complejo de los esperado. Usted mismo ha desarrollado algunos

aptámeros con aplicaciones terapéuticas contra diferentes enfermedades **¿Cuál es su opinión acerca de las aplicaciones terapéuticas de los aptámeros, son viables?**

VG: En mi opinión yo creo que es sorprendente que haya habido como un parón que ha durado casi 20 años o 15 años desde que se desarrolló ese primer aptámero frente a VEGF y luego fue aprobado por la FDA hasta la actualidad. Digo que hubo un parón porque durante muchos años ni tan siquiera había aptámeros en ensayos clínicos, parecía que era algo, no sé, la gente se centró más en aspectos diagnósticos. Pero los investigadores los aspectos terapéuticos los dejaron un poco de lado. Hablando con otros investigadores, colegas pensamos que puede tener que ver el tema de la patente. Es verdad que el tema de la patente cubre 20 años y el desarrollo de una molécula terapéutica pues casi lleva 20 años de desarrollo, con lo cual, probablemente a nivel inversión, no tanto a nivel científico-técnico. A nivel inversión haya habido ciertas reticencias pensando en que iba a ser difícil recuperar la inversión que exige un desarrollo terapéutico por temas de patente. Pero la verdad es que es una posibilidad, no podemos estar seguros de si es la más decisiva. Es verdad, en los últimos años sí que se ha incrementado la carpeta de aptámeros que están en desarrollo clínico y preclínico y la verdad yo sí creo que tienen un potencial enorme.

JO: A nivel diagnóstico la cosa parece ser un poco más sencilla, el Dr. González ha obtenido aptámeros, los ha validado y ha conseguido obtener algunos kits diagnósticos para enfermedades como: Chikunguña, hepatitis C, entre otras. **¿Considera que esta es la mejor aplicación de los aptámeros a la cual se debería apuntar de forma más práctica?**

VG: Yo creo que los aptámeros son muy útiles en diagnóstico, pero insisto que también lo son en terapia y para otras aplicaciones biotecnológicas en otros campos, medio ambiente, etcétera. Yo creo que el tema diagnóstico, pero no solo por los aptámeros, también con los anticuerpos exige desarrollos más a corto plazo y eso hace que haya más inversión dedicada. Aparte que la cantidad de inversión que se necesita es más baja. En mi opinión, un buen aptámero puede dar muy buen resultado en diagnóstico y además los hace más atractivos. A nosotros nos contactan muchos grupos y empresas a la hora de

desarrollar aptámeros frente a moléculas contra las que no hay anticuerpos. Es decir, pueden ocupar un nicho que los anticuerpos no pueden ocupar por motivos obvios. Porque los anticuerpos no se pueden generar contra determinadas moléculas y luego competir de tú a tú con los anticuerpos en aspectos como sensibilidad, afinidad, etcétera.

Entonces, yo creo que son una herramienta muy valiosa en diagnóstico, pero para mí la terapia es un campo en el que van a terminar explotando más antes que después.

JO: ¿Qué tipo de estrategia SELEX le parece más interesante, cual usan en su laboratorio y cuál es el tiempo de obtención aproximada de los aptámeros?

VG: Nosotros en el laboratorio utilizamos técnicas, modificaciones que han sido desarrolladas por otros, publicadas. No hemos inventado, excepto una pequeña modificación que fue bastante significativa en un abordaje concreto, pero depende mucho de la diana. Con los que hemos tenido más éxito y a más corto plazo es utilizando la proteína recombinante o purificada o péptidos como diana. Pero, por ejemplo, el *cell*-SELEX es algo que nos está dando muy buenos resultados. Al principio pensamos que íbamos a tener más problemas porque bueno, al final una célula tiene muchas cosas, muchas proteínas, muchas moléculas diferentes en su superficie, etcétera. Pero, hemos conseguido con la correspondiente contra selección obtener aptámeros muy específicos frente a moléculas como marcadores tumorales, por ejemplo. Utilizamos técnicas muy diferentes dependiendo de la diana y luego buscando un poco hacer la selección dependiendo para que se va a utilizar el aptámero. Cuando hablamos de métodos diagnósticos, algunos colaboradores buscan un sistema de ELISA, pues intentamos seleccionar el aptámero en placas de 96 pocillos porque si ahí los obtenemos, lo más probable es que luego funcione. Si es para otro tipo de sistema a lo mejor utilizamos sistemas SELEX diferentes. Pero básicamente depende de las características de la molécula y tratamos un poco de adaptar el SELEX a la molécula concreta.

El tiempo de obtención depende mucho de la diana y del sistema de selección, pero nosotros desde que empezamos la selección hasta que identificamos aptámeros concretos y los validamos. Mínimo son 3-4 meses y máximo 6-7-8 meses como mucho. No debiera ser más tiempo.

JO: ¿Cuál considera usted que es el punto más importante al momento de desarrollar un protocolo para obtener aptámeros? ¿Qué se debe tener en cuenta primero que todo?

VG: Hay que tener en cuenta la diana y hay que tener en cuenta la aplicación final que se le quiera dar. Para mí son los

dos aspectos claves. Si conoces bien la diana, tanto sus características fisicoquímicas y luego tienes muy claro para que se va a aplicar y en qué condiciones eso es definitivo para desarrollar un buen método de selección. El protocolo que vas a seguir para hacer la selección. Y yo creo que si el protocolo está bien diseñado, el aptámero que se obtenga lo más probable es que funcione y funcione bien.

JO: ¿Podría contarnos acerca de su experiencia de transferencia de los resultados de investigación hacia la industria? ¿Algún consejo para quienes empezamos?

VG: Bueno, yo soy un poco inquieto en ese sentido. Desde el principio que inicie mi carrera siempre me ha gustado la transferencia y de hecho he colaborado y promovido la creación de 3 empresas de biotecnología relacionadas todas con aptámeros. Ahora solo hay dos que todavía sobreviven. Pero yo creo que, si el producto que desarrollas tiene cierta aplicación, la transferencia al mercado o a la clínica es casi automático. No es automático porque hay que poner de tu parte, hay que trabajar para poderlo hacer. Bien a un tercero, a una empresa que ya este constituida, o como ha sido nuestro caso, la creación de un spin-off, de una empresa a partir de lo que habíamos generado en el grupo de investigación. Yo también trabajo y he trabajado mucho anteriormente en investigación básica. Pero al final, yo creo que por muy básica que sea la investigación que haces, si no está orientada a una transferencia, bien a la empresa o bien a la clínica directamente, yo trabajo en un hospital, la verdad yo creo que está mal planteada la investigación. Ósea, saber si un residuo se fosforila o no en una proteína tiene consecuencias. Por supuesto es interesante estudiar esos residuos en profundidad y dedicarle años a ver que proteínas son las quinasas que fosforilan allí, cual es el mecanismo, cual es la cascada en la que está implicada. Pero, **está muy bien el saber por el saber, pero yo creo que esta aún mejor el saber para aplicarlo a algo.** Yo creo que al final es una cadena. Tenemos que cada uno, tiene unas apetencias por así decirlo, pero al final yo creo que hay que transferirlo a la sociedad. El trabajo que hacemos todos los días en el laboratorio.

JO: ¿Cuál ha sido el desarrollo de aptámeros que más lo ha impresionado hasta el momento? Aparte de los que han desarrollado en su laboratorio.

VG: Para mí, es verdad que trabajo en un hospital, me gusta mucho la terapia y entonces es que el primer aptámero que es un referente, el Pegaptanib o Macugen ® para mí es el modelo para seguir. Es decir, ya no tanto en el desarrollo en concreto, si esta pegilado o no que eso habría que verlo. Pero si como la valentía de poner en el mercado una cosa que, si es desconocida todavía, mucho más cuando en su momento se puso. Hombre, para mí eso es un hito, pero

hay otro hito previo que para mí fueron las dos publicaciones a las que todos los que nos dedicamos a esto hacemos referencia del 90 (año) en el que se habla por primera vez del SELEX y se habla por primera vez de los aptámeros. Por supuesto hay aptámeros modelos con los que hemos trabajado todos en algún momento y esos aptámeros han dado mucha información para luego desarrollar nuevos aptámeros y para enfrentar dianas diferentes y todos son muy interesantes. Para mí el aptámero contra VEGF es clave. Luego a nivel nuestro, estamos muy orgullosos del aptámero que tenemos ahora en fase II de ensayos clínicos para el tratamiento del Ictus isquémico y que además ayer mismo entro en fase IB para el tratamiento de COVID-19. Hace una semana se administró al primer paciente con COVID en una situación inmunológica comprometida y bueno, estamos muy ilusionados por ver los resultados que obtenemos. Este aptámero frente al TLR4 con el que hemos trabajado por durante casi 8 años.

JO: ¿Cree que en algún momento los aptámeros van a poder reemplazar a los anticuerpos monoclonales? ¿Qué nos falta para llegar ahí?

VG: Te voy a decir que no quiero que los aptámeros sustituyan a los anticuerpos monoclonales. Tienen que convivir. Además, sería un objetivo para mí, inalcanzable, quiero decir los anticuerpos funcionan y funcionan muy bien. Todo mundo usamos anticuerpos. Yo creo que los anticuerpos tienen algunas carencias, no son útiles para todo y ahí los aptámeros tienen mucho que decir. No me haría especialmente feliz que todos los anticuerpos fuesen sustituidos por aptámeros y no creo que sea real.

JO: ¿Tendrían que convivir, complementarse?

VG: Sí, y no solo a nivel general que tiene que haber aptámeros y anticuerpos, sino que además muchos sistemas diagnósticos probablemente usen aptámeros y anticuerpos para funcionar estupendamente. Sistemas ELISA o ELONA, sandwich, lateral Flow en donde utilices 2 moléculas de bio- reconocimiento son perfectamente compatibles. En ese sentido lo ideal es que siga habiendo anticuerpos y haya cada vez más aptámeros y que al final sirvan para algo individual o conjuntamente.

Capítulo 6. Perspectivas ¿Podrán los aptámeros reemplazar a los anticuerpos?

Según *Markers and Markers*, una página web especializada en análisis de mercados de diferentes productos, se esperaba que el mercado de los aptámeros alcanzara los 151 millones de dólares para el año 2021 y que alcance los 342 millones de dólares para el 2026, un crecimiento del 17,7 %. Por su parte, los anticuerpos tuvieron un mercado en 2020 de 8.554,8 millones de dólares y se espera que para el 2027 alcance 11.230 millones de dólares, esto representa un aumento del 3,5 %.

El crecimiento de los aptámeros tiene un incremento significativamente superior al mercado de los anticuerpos. Sin embargo, no será una tarea fácil superarlos, debido a que el desarrollo de aptámeros todavía requiere de expertos que son relativamente pocos en el mundo en este momento, son muy pocos los investigadores que conocen ahora la estrategia SELEX y sus modificaciones. Por tanto, todavía nos encontramos en un punto donde es demasiado desconocida esta tecnología para la misma comunidad científica. Por esta razón, la posición de los aptámeros en los mercados no es muy visible hoy en día. El mercado dominado por los anticuerpos es prioritariamente en el campo de la terapéutica, diagnóstico y para procesos de investigación. Tanto la comunidad médica como científica es reacia a cambiar de una tecnología a otra si no existen las suficientes pruebas que lo respalden. Basado en otros antecedentes, la transición suele costar mucho tiempo, sacrificio y dinero.

En primer lugar, es indispensable considerar las necesidades del mercado. Los anticuerpos monoclonales tienen un amplio monopolio en lo relacionado con el área terapéutica. Sin embargo, como comentamos anteriormente en el capítulo 1, los anticuerpos monoclonales causan ciertos efectos adversos que no han podido ser remediados a pesar del avance en la producción de anticuerpos bivalentes, trivalentes, o multivalentes. El rechazo del sistema inmune y otros efectos sobre el paciente hacen que esta tecnología sea cada vez más difícil de aplicar. Los aptámeros hasta el día de hoy no han reportado un solo caso de rechazo o efecto adverso sobre el organismo. Se han llevado muchos

estudios y es necesario profundizar en este tema si se quiere competir con los anticuerpos monoclonales.

Por otro lado, en el área de diagnóstico los aptámeros tienen un camino más despejado. Esto debido a que la regulación es menor y no se debe pasar por ensayos clínicos engorrosos para la aceptación de una prueba diagnóstica. En verdad, la aprobación de una prueba diagnóstica tiene que ver con la sensibilidad y especificidad de la técnica y no con sus efectos adversos. Este campo, en el cual los aptámeros son mucho más económicos, fáciles de producir, estables a temperaturas extremas, costos efectivos, entre otros, puede ser el espacio donde los aptámeros puedan demostrar su utilidad y favorabilidad por encima de los anticuerpos monoclonales.

En el área de investigación se sabe que lo que más importa es el precio, la calidad y la costumbre de los investigadores por ciertas marcas. Muchas veces un producto de menor valor es considerado de menor calidad y no es así en todos los casos. Los aptámeros podrían competir fácilmente contra los anticuerpos monoclonales en técnicas como citometría de flujo, western blot, pruebas de diagnóstico rápido (RDT), ELISAS, detección de biomarcadores, entre otras.

El punto está en convencer a la comunidad científica del verdadero valor de los aptámeros. Mi opinión dice que la única forma de lograrlo, es con la mayor cantidad de evidencia posible que provenga de diferentes investigadores, de todas partes del mundo y que sea irrefutable, para de una vez por todas adoptar esta nueva tecnología. Esto solo es posible a través de amplia difusión tanto en modo de artículos científicos como libros, talleres, formación y capacitación. Esta es una de las razones por las que este libro fue pensado. Queremos dar a conocer a la comunidad hispanoparlante la tecnología SELEX y los aptámeros como una novedosa herramienta terapéutica, de diagnóstico, de investigación y muchas áreas más que aún permanecen inexploradas.

En cuanto a la pregunta de si los aptámeros podrán reemplazar a los anticuerpos monoclonales, mi respuesta es sí, sin ningún temor a equivocarme. Que puedan hacerlo o no dependerá de que los científicos que conocen la tecnología puedan difundir sus conocimientos sin restricciones, tanto en la comunidad científica como en la comunidad en general. Es normal al principio de una tecnología tan promisoria que los pioneros quieran patentar sus descubrimientos en vez de publicarlos. Sin embargo, tarde o temprano la comunidad accederá al conocimiento y podrá utilizarlo por sí misma para explorar toda su capacidad. El capítulo final de este libro contiene dos protocolos de estrategia SELEX, que pueden ser fácilmente desarrollados en laboratorios con capacidad mínima en biología molecular para llevar a cabo sus propios proyectos de investigación.

El primer protocolo está dirigido a la obtención de aptámeros de forma sencilla contra proteínas recombinantes, o cualquier tipo de proteína purificada que sea de interés para cada laboratorio.

El segundo, un poco más complejo, pero muy útil, está dirigido a la obtención de aptámeros que nos permiten inferir la secuencia de unión al ARN de proteínas que llevan a cabo funciones en estas moléculas y cuyo sitio de unión sea desconocido.

Referencias

1. Shutterstock. EDWARD JENNER (1749-1823), Médico y pionero de la vacunación, vacunando a James Phipps de 8 años con cowpox para proporcionar inmunidad contra la viruela, 1796 [Internet]. [citado el 6 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/edward-jenner-1749-1823-physician-pioneer-237229861

2. Williams G. Portada del Libro publicado por Edward Jenner en 1798, producto de sus investigaciones sobre la viruela [Internet]. [citado el 6 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.economist.com/1843/2019/08/30/the-original-anti-vaxxers

3. Shutterstock. Vacunación de la rabia (hidrofobia) administrada a la adolescente Jean-Baptiste Jupille en el laboratorio Pasteur, en octubre de 1885 [Internet]. [citado el 6 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/rabies-hydrophobia-vaccination-administered-teenage-jeanbaptiste-242815714

4. Shutterstock. Paris, France - February 09 2020: Pasteur bust in front of the Old building of the Pasteur institute in Paris. Sculpture is from Naoum Aronson (1872 1943) [Internet]. [citado el 6 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.shutterstock.com/es/image-photo/paris-france-february-09-2020-pasteur-1654166866

5. Shutterstock. Icono de línea de anticuerpos, inmunoglobulina, ilustración vectorial [Internet]. [citado el 6 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.shutterstock.com/es/image-vector/antibody-immunoglobulin-line-icon-vector-illustration-1700998852

6. Shutterstock. Scientific Designing Of Antibody Structure. Colorful Symbols. Vector Illustration. [Internet]. [citado el 6 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.shutterstock.com/image-vector/scientific-designing-antibody-structure-colorful-symbols-2104822754

7. Shutterstock. Camelid nanobody or single domain antibody beside heavy chain only antibody with light background; nanobody and heavy chain only immunoglobulin colored by variable and constant domains 3d rendering. [Internet]. [citado el 6 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.shutterstock.com/image-illustration/camelid-nanobody-single-domain-antibody-beside-1920452615

8. Shutterstock. Biology diagram show concept of Central Dogma for RNA transcription and protein translation in cell [Internet]. [citado el 6 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.shutterstock.com/image-vector/biology-diagram-show-concept-central-dogma-2042462267

9. Shutterstock. Central Dogma of Molecular biology: Replication, transcription, translation and reverse transcription. [Internet]. [citado el 6 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.shutterstock.com/image-vector/central-dogma-molecular-biology-replication- transcription-1958325154

10. Robertson D, Joyce G. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. Nature [Internet]. 1990 [cited 31 August 2022];344(6265):467-468. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1690861/

11. Tuerk C, Gold L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. Science [Internet]. 1990 [cited 31 August 2022];249(4968):505-510. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2200121/

12. Ellington A, Szostak J. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature [Internet]. 1990 [cited 31 August 2022];346(6287):818-822. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1697402/

13. Gold L. SELEX: How It Happened and Where It will Go. Journal of Molecular Evolution [Internet]. 2015 [cited 31 August 2022];81(5-6):140-143. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4661202/

14. Cheng C, Chen Y, Lennox K, Behlke M, Davidson B. In vivo SELEX for Identification of Brain-penetrating Aptamers. Molecular Therapy - Nucleic Acids [Internet]. 2013 [cited 31 August 2022];2:e67. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23299833/

15. Mao K, Zhang H, Wang Z, Cao H, Zhang K, Li X et al. Nanomaterial-based aptamer sensors for arsenic detection. Biosensors and Bioelectronics [Internet]. 2020 [cited 31 August 2022];148:111785. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31689596/

16. Chen L, Rashid F, Shah A, Awan H, Wu M, Liu A et al. The isolation of an RNA aptamer targeting to p53 protein with single amino acid mutation. Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]. 2015 [cited 31 August 2022];112(32):10002-10007. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26216949/

17. Ospina-Villa J, Dufour A, Weber C, Ramirez-Moreno E, Zamorano-Carrillo A, Guillen N et al. Targeting the polyadenylation factor EhCFIm25 with RNA aptamers controls survival in Entamoeba histolytica. Scientific Reports [Internet]. 2018 [cited 31 August 2022];8(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29632392/

18. Caraballo Guzmán A, Ospina Villa J, Cuesta Caicedo A, Sánchez Jiménez M. Immunoproteomics characterization of Leishmania panamensis proteins for potential clinical diagnosis of mucosal Leishmaniasis. Parasite Immunology [Internet]. 2021 [cited 31 August 2022];43(6). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33484577/

19. Jenison R, Gill S, Pardi A, Polisky B. High-Resolution Molecular Discrimination by RNA. Science [Internet]. 1994 [cited 31 August 2022];263(5152):1425-1429. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7510417/

20. Tang Z, Parekh P, Turner P, Moyer R, Tan W. Generating Aptamers for Recognition of Virus-Infected Cells. Clinical Chemistry [Internet]. 2009 [cited 31 August 2022];55(4):813-822. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19246617/

21. Li X, Yang Y, Zhao H, Zhu T, Yang Z, Xu H et al. Enhanced in Vivo Blood–Brain Barrier Penetration by Circular Tau– Transferrin Receptor Bifunctional Aptamer for Tauopathy Therapy. Journal of the American Chemical Society [Internet]. 2020 [cited 31 August 2022];142(8):3862-3872. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31991082/

22. Mosing R, Bowser M. Isolating Aptamers Using Capillary Electrophoresis–SELEX (CE–SELEX). Methods in Molecular Biology [Internet]. 2009 [cited 31 August 2022];:33-43. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19377982/

23. Kim J, Olsen T, Zhu J, Hilton J, Yang K, Pei R et al. Integrated Microfluidic Isolation of Aptamers Using Electrophoretic Oligonucleotide Manipulation. Scientific Reports [Internet]. 2016 [cited 31 August 2022];6(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27217242/

24. Zimmermann B, Bilusic I, Lorenz C, Schroeder R. Genomic SELEX: A discovery tool for genomic aptamers. Methods [Internet]. 2010 [cited 31 August 2022];52(2):125-132. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20541015/

25. BURKE D, WILLIS J. Recombination, RNA evolution, and bifunctional RNA molecules isolated through Chimeric SELEX. RNA [Internet]. 1998 [cited 31 August 2022];4(9):1165- 1175. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9740133/

26. Babendure J, Adams S, Tsien R. Aptamers Switch on Fluorescence of Triphenylmethane Dyes. Journal of the American Chemical Society [Internet]. 2003 [cited 31 August 2022];125(48):14716-14717. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14640641/

27. Paige J, Wu K, Jaffrey S. RNA Mimics of Green Fluorescent Protein. Science [Internet]. 2011 [cited 31 August 2022];333(6042):642-646. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21798953/

28. Dolgosheina E, Jeng S, Panchapakesan S, Cojocaru R, Chen P, Wilson P et al. RNA Mango Aptamer-Fluorophore: A Bright, High-Affinity Complex for RNA Labeling and Tracking. ACS Chemical Biology [Internet]. 2014 [cited 31 August 2022];9(10):2412-2420. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25101481/

29. Jeng S, Chan H, Booy E, McKenna S, Unrau P. Fluorophore ligand binding and complex stabilization of the RNA Mango and RNA Spinach aptamers. RNA [Internet]. 2016 [cited 31 August 2022];22(12):1884-1892. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27777365/

30. Autour A, C. Y. Jeng S, D. Cawte A, Abdolahzadeh A, Galli A, Panchapakesan S et al. Fluorogenic RNA Mango aptamers for imaging small non-coding RNAs in mammalian cells. Nature Communications [Internet]. 2018 [cited 31 August 2022];9(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29440634/

31. Vargas-Montes M, Cardona N, Moncada DM, Molina DA, Zhang Y, Gómez-Marín JE. Enzyme-Linked Aptamer Assay (ELAA) for Detection of Toxoplasma ROP18 Protein in Human Serum. Front Cell Infect Microbiol. 2019 Nov 13;9:386. doi: 10.3389/fcimb.2019.00386. PMID: 31799213; PMCID: PMC6863806.

32. Manley J. SELEX to Identify Protein-Binding Sites on RNA. Cold Spring Harbor Protocols [Internet]. 2013 [cited 31 August 2022];2013(2):pdb.prot072934. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23378656/

Anexo. Protocolos SELEX

7.1. SELEX para obtener aptámeros contra una proteína recombinante purificada en platos de ELISA [31]

https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00386/full

7.2. SELEX para identificar el sitio de unión de una proteína sitio específica al ARN [32]

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3703746/

Este libro se terminó de imprimir en mayo de 2023.
Para la formación de textos se utilizaron fuentes de la
familia tipográfica Interstate, diseñada por Tobias Frere-Jones.

o de
ara-
ones
ar a
tiga-
rati-
eros
una
, de
el se
zada
este
pido
n la
lica-

ien-