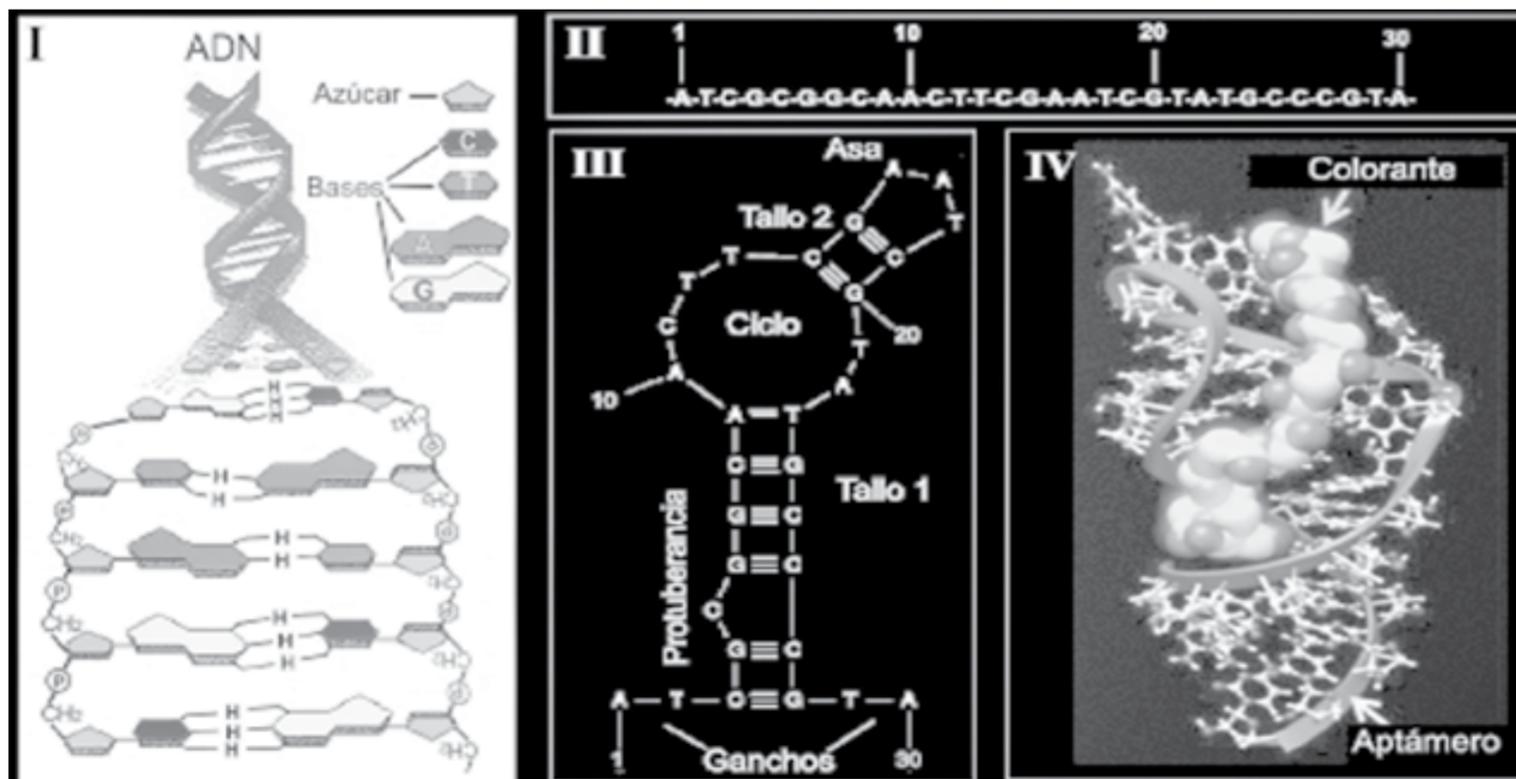


# Los Aptámeros: ADN que se usa en sensores para la detección de comp



**Figura 1. Plegamiento de una cadena de ADN.** Panel I. Como ciertos nucleótidos son estructuralmente complementarios, éstos se aparean y consecuentemente forman una doble hélice en la cadena de ADN. Panel II. Una secuencia lineal de 30 nucleótidos con numeración del 1 al 30. Panel III. La misma secuencia de nucleótidos en una estructura bidimensional mostrando las formas particulares generadas (asas, ciclos, ganchos, protuberancias y tallos). Panel IV. Una estructura computarizada en 3D de la secuencia de nucleótidos, la cual está uniéndose específicamente a un colorante orgánico (que se muestra en color verde).

**Gastón Contreras Jiménez**

Facultad de Ciencias,  
Universidad de Quebec en Montreal, Montreal, (QC), Canadá.  
E-mail gconj@hotmail.com

Presentación por el Dr. Raúl Arredondo Peter, miembro de la Academia de Ciencias de Morelos: El M. en C. Gastón Contreras Jiménez realizó sus estudios profesionales en la Licenciatura en Ciencias (Área terminal en Química) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), obtuvo el grado de Maestro en Ciencias en el Posgrado en Ciencias (Área en Química) de la UAEM y realizó sus estudios de doctorado en la Universidad de Quebec en Montreal (Canadá) en donde actualmente escribe su tesis para graduarse con el proyecto "Desarrollo de biosensores basados en aptámeros y grafeno para detectar contaminantes hormonales en agua". El M. en C. Contreras ha publicado tres artículos originales en revistas indexadas y está preparando uno más para enviar a evaluación; además, ha publicado un artículo de divulgación en la revista "¿Cómo ves?" que edita la Universidad Nacional Autónoma de México.

¿Se hubieran imaginado que las moléculas de ADN (que constituyen el material genético de los organismos vivos) pudieran actuar también como sondas en sensores para detectar compuestos químicos? Recordemos que una sonda es una herramienta que se utiliza para detectar una sustancia particular.

Los aptámeros son cadenas de

ADN (ácido desoxirribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico) con una longitud de alrededor de 100 nucleótidos que poseen la característica de unirse a compuestos de interés con alta afinidad y especificidad. En términos generales, la afinidad es la capacidad o tendencia de dos especies diferentes, y la especificidad se refiere a que una especie sólo se unirá con otra especie única. Los aptámeros se descubrieron en 1990 por dos grupos de investigación independientes. Un grupo estuvo formado por Larry Gold y Craig Tuerk (del Hospital General de Massachusetts en Estados Unidos de América), quienes descubrieron que cadenas de ARN se unían específicamente a una proteína. El otro grupo estuvo formado por Andrew Ellington y Jack Szostak (de la Universidad de Colorado en Estados Unidos de América), quienes observaron que cadenas de ARN se unían de manera específica a moléculas de colorantes que se utilizan como aditivos en plásticos, comida y bebidas. Estos últimos autores fueron quienes bautizaron a dichas cadenas de ARN como aptámeros (el nombre proviene del latín *aptus* – que quiere decir: encajar, y del griego *meros* – que quiere decir: parte).

Ahora, nos enfocaremos en cómo los aptámeros se unen a las moléculas de interés (que llamaremos a partir de ahora "analitos"). Tanto el ADN como el ARN están constituidos por nucleótidos, y éstos a su vez están compuestos de una base nitrogenada (que puede ser adenina

[A], timina [T]/uracilo [U], citosina [C] o guanina [G]), un azúcar (que puede ser ribosa o desoxirribosa) y un grupo fosfato. Las bases nitrogenadas contienen átomos de hidrógeno con la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con otras bases nitrogenadas. Los enlaces de hidrógeno constituyen un tipo de interacción molecular que se ilustra en el panel I de la Figura 1. Por ejemplo, en una cadena de ADN constituida por 30 nucleótidos, como se ilustra en el panel II de la Figura 1, las bases nitrogenadas podrían interactuar unas con otras debido a que la cadena se encuentra en constante movimiento. La interacción entre bases conduciría a la formación de parejas únicas, tales como A con T y G con C (panel I, Figura 1). El emparejamiento de bases permite a la secuencia de nucleótidos que se generen formas peculiares, tales como asas, tallos, protuberancias y ganchos (panel III, Figura 1) lo que en consecuencia le confiere una estructura tridimensional (3D) única de la secuencia de nucleótidos de la cadena de ADN (panel IV, Figura 1). Esta estructura 3D única en el espacio determinará si podrá unirse o no con un analito y qué tan fuerte y específica será dicha interacción.

¿Cómo saber qué aptámero (es decir, secuencia de nucleótidos) es el indicado para enlazar determinado analito con una estructura particular en el espacio? La interacción entre el aptámero y el analito es por medio de interacciones débiles, tales como los enlaces de hidrógeno, las

fuerzas de Van der Waals (que son fuerzas que corresponden a interacciones muy débiles entre moléculas polares) y/o interacciones electrostáticas (que resultan de la existencia de cargas eléctricas entre las moléculas), así como por simple complementariedad estructural, es decir, si las estructuras 3D tanto del aptámero como del analito empalman geoméricamente la una con la otra. Cuando interactúan estas dos moléculas ocurre un fenómeno llamado "cambio conformacional", que no es más que un ajuste de la estructura 3D del aptámero después de unirse con el analito. Comprendiendo la manera en cómo el aptámero interactúa con el analito nos ayudará a entender el método utilizado para la identificación de un determinado aptámero. Los científicos pioneros en el estudio de los aptámeros desarrollaron un método eficaz para la identificación de secuencias de aptámeros con alta afinidad y especificidad hacia el analito. Lo llamaron selección *in vitro* o Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (que se abrevia SELEX, por sus siglas en Inglés). Este método consiste en incubar el analito con una población de aptámeros muy diversa (que en este caso vienen siendo los "Ligandos"), la población está constituida por aproximadamente  $10^{15}$  secuencias de aptámeros diferentes, es decir, un número extremadamente grande. Y es que entre más diversa sea la población de aptámeros, mayor será la probabilidad de encontrar un



**Figura 2. Esquema general del método SELEX.** El proceso consiste en rondas repetitivas e iterativas de incubaciones entre una población diversa de aptámeros con el analito. La 1ra ronda SELEX comienza con la incubación entre el analito y la población diversa de aptámeros. Los lavados son requeridos para eliminar a los aptámeros no-afines al analito o débilmente afines. La etapa de elución permite colectar los aptámeros con buena afinidad con el analito para su posterior amplificación por PCR. El proceso de desnaturalización es necesario para regenerar la estructura 3D de cada aptámero.

aptámero que se una al analito. Se espera que después de la primera incubación (es decir, la 1ra ronda SELEX) encontremos una población muy baja de aptámeros que presenten afinidad por el analito. Para enriquecer esta población de aptámeros se utiliza la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa por sus siglas en inglés), que en general permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, y en este caso de multiplicar (o amplificar) la población de aptámeros con buena afinidad hacia el analito. En una 2da ronda SELEX se utiliza esta última población de aptámeros, lo que incrementará la rigurosidad de la selección pues esta vez separaríamos a los aptámeros con mayor afinidad hacia el analito en comparación con la 1ra ronda SELEX. Nuevamente se enriquece esta última población de aptámeros por PCR y se procede

## Nuestros químicos



con la 3ra ronda SELEX y así sucesivamente, por lo que este método de selección además de ser repetitivo, es iterativo, porque se retroalimenta de la selección de aptámeros anterior. Un diagrama general del método SELEX se muestra en la Figura 2.

Las propiedades de los aptámeros se parecen mucho a las de los anticuerpos (que son proteínas que produce el sistema inmunológico del organismo para reconocer, con alta afinidad y especificidad, moléculas ajenas al organismo de acuerdo con su estructura 3D). Es decir, se ha descubierto una alternativa para imitar un proceso que ocurre de manera natural en el sistema inmunológico. Sin embargo, los aptámeros presentan ventajas sobre los anticuerpos en el sentido de ser utilizados como sondas en sensores, estas ventajas son la estabilidad a temperatura ambiente, la regeneración de su estructura 3D, la facilidad de marcar la secuencia de nucleótidos con otras moléculas (es decir, etiquetar químicamente al aptámero para su posterior identificación) y, también, que no se requieren organismos vivos para su producción como en el caso de los anticuerpos, pues los aptámeros pueden ser sintetizados químicamente y a bajo costo.

Existe una gran variedad de analitos que pueden ser estudiados bajo la tecnología de los aptámeros, que van desde moléculas de bajo peso molecular, como son los fármacos, hasta moléculas de

alto peso molecular, como son las proteínas. Desde el descubrimiento de los aptámeros hasta la fecha se han encontrado muchas secuencias de aptámeros específicas a determinado analito. Por lo tanto, el campo de sus aplicaciones es amplio, por ejemplo, en aplicaciones clínicas y terapéuticas se están evaluando aptámeros que se unen a marcadores específicos de cáncer para diagnosticar e inhibir la proliferación de células cancerosas; en aplicaciones medioambientales se han identificado aptámeros que detectan contaminantes como el Bisfenol A (que es una molécula utilizada en la industria del plástico –ver más adelante); y en medicina ya se está comercializando un fármaco, basado en un aptámero, para combatir la degeneración macular (que es un problema en el ojo que impide ver imágenes nítidas y claras). Esto evidentemente demuestra la utilidad e impacto del uso de aptámeros como alternativa a los métodos comunes de detección y evaluación de sustancias a nuestro alrededor.

En un caso particular de contaminación ambiental, contaminantes como las Sustancias Interrupedoras Endócrinas (EDCs por sus siglas en Inglés) han despertado preocupación en la sociedad debido a que presentan un efecto adverso en la salud de los animales, incluyendo al ser humano en el que alteran las funciones del sistema endócrino (ver en esta misma sección de La Unión de Morelos: Las Hormonas y sus perturbaciones <http://www.acmor.org.mx/?q=content/las-hormonas-y-sus-perturbaciones>). Este sistema está formado por glándulas que secretan hormonas que regulan los procesos fisiológicos y de comportamiento, por ejemplo, la testosterona (que

regula el desarrollo y características sexuales en machos, llamado también efecto androgénico), el estradiol (que regula el desarrollo y características sexuales en hembras, llamado también efecto estrogénico), la progesterona (que es responsable de llevar a cabo la etapa del embarazo, aunque también presenta efecto estrogénico), entre otras. Cuando se ingieren EDCs se podrían alterar los niveles de secreción de hormonas en el organismo ya que los EDCs imitan estructuralmente a las hormonas. Generalmente, estas sustancias son arrojadas a los cuerpos de agua con los desechos provenientes de las actividades industriales y el abuso en el uso de medicamentos por parte del ser humano. Se conoce que la molécula de Bisfenol A (usado en la elaboración de plásticos) es un potente agente estrogénico porque imita a la hormona estradiol. Se han reportado casos en aguas de ríos en los que ciertos peces presentan feminización, es decir, malformación en sus órganos reproductores y apariencia femenina. Entonces, el uso de aptámeros como sondas de reconocimiento molecular de este tipo de contaminantes facilitaría su detección y cuantificación en muestras de agua de manera eficaz y económica.

Un ejemplo reciente del uso de aptámeros es el trabajo que realizamos en el Laboratorio de Materiales Electroactivos y Funcionales del Departamento de Química de la Universidad de Quebec en Montreal, Canadá. En dicho laboratorio estamos trabajando en el desarrollo de un dispositivo que usa aptámeros para la detección y cuantificación de ciertas hormonas de interés. Este dispositivo, que hace uso de biomoléculas como el ADN, es llamado comúnmente "biosensor".

En 2015, se publicó por vez primera (referencia 1) la elaboración de un biosensor electroquímico para detectar específicamente a la hormona progesterona (que abreviaremos como P4). La P4 no sólo interviene en diferentes etapas del embarazo sino también en el ciclo menstrual. Se usa también en la producción de píldoras anticonceptivas y en la terapia hormonal de la menopausia o en casos de transgénero. La P4 también se encuentra presente en machos pero en concentraciones mucho menores que en hembras.

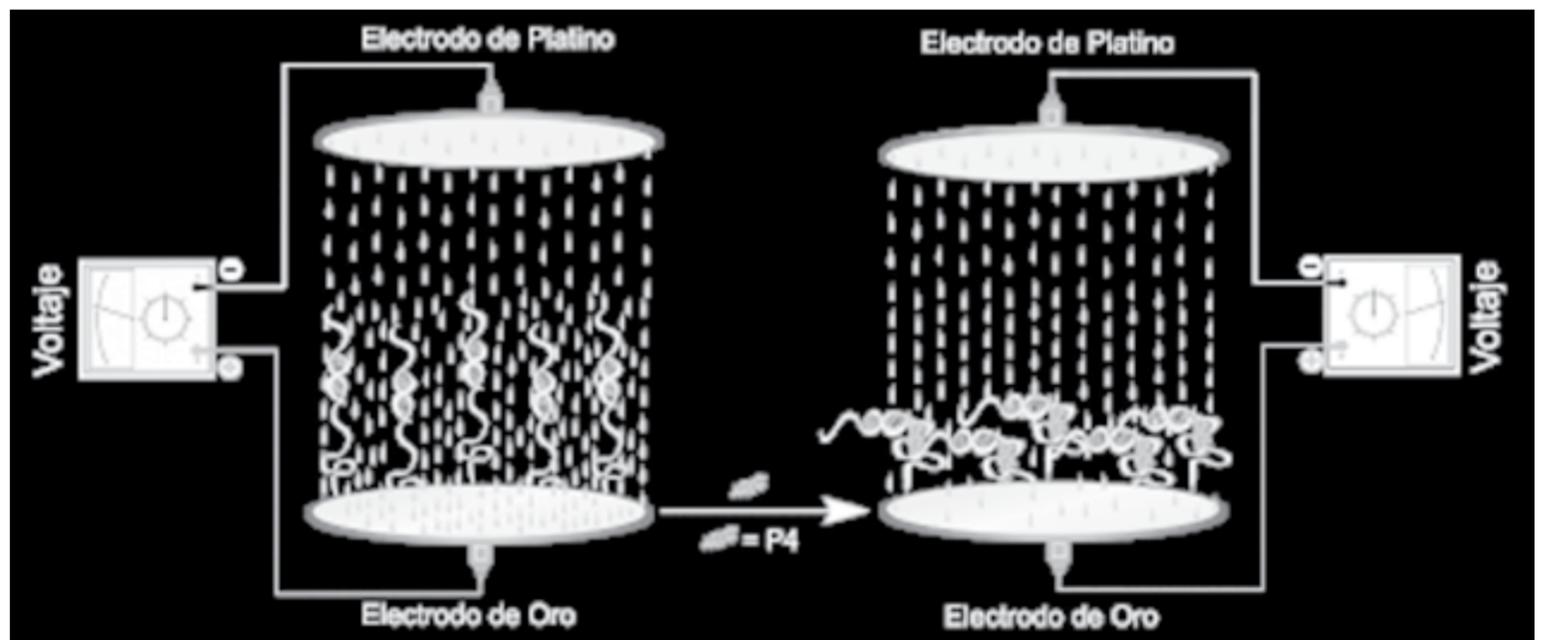
El principio de operación del biosensor consistió en detectar el cambio conformacional del aptámero después de que se unía con P4. Este cambio fue determinado mediante una técnica electroquímica conocida como "impedancia electroquímica", en donde se mide el flujo de electrones que llega a un electrodo a través de un medio electrolítico (que es una solución de sales). En el electrodo se fijan millones de copias del aptámero y posteriormente se sumerge en la muestra que pudiera contener P4 para detectar su presencia y, de ser el caso, determinar su concentración. Se cree que los aptámeros mantienen una conformación 3D constante, y en consecuencia en este escenario, el flujo de electrones será constante también. Una vez que el aptámero se une con una molécula de P4, éste cambiará su conformación 3D originando que el flujo de electrones cambie también (es decir, que se vea "impedido" de realizar la función electroquímica). Aunque este comportamiento fue particular en nuestro experimento, pudiera ocurrir el proceso contrario, es decir, que haya un mayor flujo de electrones después de la unión del ap-

támero con el analito. El punto es que el cambio en el flujo de electrones se puede correlacionar directamente con la concentración del analito en la muestra (ver la Figura 3), y este cambio es medido como una señal de voltaje por el instrumento analítico utilizado en el laboratorio. Y así de simple podríamos cuantificar niveles de P4 en varias muestras. En nuestros ensayos hemos logrado detectar P4 a concentraciones tan bajas como 0.9 ng/mL, algo así como detectar la hormona después de arrojar 2 g en una alberca olímpica.

Con base en nuestros resultados, concluimos que el uso de aptámeros como sondas de bio-reconocimiento molecular promete mejoras en los métodos de detección comunes en términos de sensibilidad, manipulación y bajo costo, lo que promueve a continuar con la investigación relacionada con los aptámeros. Para los lectores interesados en este tema, en la bibliografía se incluyen algunas páginas web que contienen mayor información sobre los aptámeros e interruptores endócrinos.

### Referencias

Contreras-Jimenez G., et-al (2015). "Aptamer-Based Label-free Impedimetric Biosensor for Detection of Progesterone". *Analytical Chemistry*. 87(2):1075-82. Páginas web que contienen mayor información sobre los aptámeros e interruptores endócrinos <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/ia-treia/article/view/11956> <http://www.unioviado.es/electroanalisis/acnuclei.htm> <https://www.ucm.es/data/cont/docs/136-2015-01-27-Apt%C3%A1meros.pdf> <http://www.acmor.org.mx/?q=content/las-hormonas-y-sus-perturbaciones>



**Figura 3.** Esquema general del mecanismo del biosensor de progesterona (P4), el diámetro de los electrodos es de apenas de 2 mm. A la izquierda se aprecia la conformación de los aptámeros (en color verde) antes de unirse a P4, esta conformación permite un mayor flujo de electrones (líneas verticales de color amarillo). A la derecha se observa cómo la conformación de los aptámeros ha cambiado tras unirse con P4 (que se muestra en color rojo), el flujo de electrones se ve impedido por una conformación más voluminosa, lo que causa que menor cantidad de electrones llegue al electrodo de oro. El flujo de electrones (que es la corriente eléctrica) es medido por un potenciómetro en lecturas de voltaje.