



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Aptámeros acoplados a nanopartículas para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones microbianas



Juan Carlos Gutiérrez-Santana^{a,b,*}, Julia Dolores Toscano-Garibay^c, Marisol López-López^d y Victor Rafael Coria-Jiménez^a

^a Laboratorio de Bacteriología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, México

^b Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, México

^c Unidad de Investigación en Microbiología y Toxicología, Dirección de Investigación, Hospital Juárez de México, Ciudad de México, México

^d Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 21 de agosto de 2019

Aceptado el 9 de diciembre de 2019

On-line el 13 de enero de 2020

Palabras clave:

Aptámeros

Nanopartículas

Resistencia a múltiples antimicrobianos

Antibacterianos

R E S U M E N

Existen nanopartículas con características antibacterianas destacables y aptámeros capaces de reconocer con gran afinidad y especificidad a determinadas bacterias patógenas. La combinación de ambos sistemas se ha utilizado en el diseño de métodos rápidos de detección bacteriana con excelentes límites de detección. Asimismo, la sinergia entre aptámeros y nanopartículas ha permitido optimizar la actividad antimicrobiana de antibióticos y otras nanoestructuras dotándolos de actividad bacteria-específica, convirtiéndolas en herramientas atractivas y prometedoras frente a las bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos.

© 2019 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Aptamers coupled to nanoparticles in the diagnosis and treatment of microbial infections

A B S T R A C T

There are nanoparticles with remarkable antibacterial characteristics and aptamers able to recognize specific pathogenic bacteria with high affinity and specificity. The combination of both systems has been used to design rapid bacterial detection methods with excellent detection limits. Likewise, the synergism between aptamers and nanoparticles have allowed to optimize the antimicrobial activity of antibiotics and other nanostructures providing them with activity bacterium-specific, turning into attractive and promising tools to fight against bacteria resistant to multiple antimicrobials.

© 2019 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

La morbilidad de las infecciones bacterianas ha aumentado debido al incremento en la frecuencia de bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos (MDR)^{1,2}, reduciendo la eficacia de las terapias de erradicación disponibles³ y estableciendo un

importante problema de salud con graves secuelas económicas y sociales^{4,5}.

Esta «crisis de resistencia a los antibióticos»⁶ ha sido generada principalmente por el uso extenso e inadecuado de antibióticos⁴, así como por el diagnóstico convencional realizado mediante cultivo y pruebas bioquímicas (método estándar), que identifica a los agentes infecciosos tras varios días, permitiendo la progresión de la infección. Por ello, es necesario desarrollar métodos rápidos para el diagnóstico bacteriano⁵, diseñar terapias que evadan los mecanismos de resistencia bacteriana^{3,6} y/o mejorar la acción de los

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: biol.jcgutierrez@gmail.com (J.C. Gutiérrez-Santana).

antibióticos existentes, donde la nanotecnología parece ser una herramienta prometedora⁴.

Aptámeros

Los aptámeros son ácidos nucleicos monocatenarios cortos, seleccionados *in vitro* mediante un proceso denominado evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) para reconocer blancos específicos diversos^{7,8}.

El reconocimiento aptámero-blanco se consigue por compatibilidad estructural y combinación de diversas interacciones no covalentes^{9,10}, estableciendo constantes de disociación usualmente en el rango de pico-nanomolar para dianas con peso molecular alto, y de nano-micromolar para blancos de peso molecular bajo^{9,11}. Los aptámeros son capaces de discriminar entre enantiómeros y moléculas que estructuralmente difieren solamente en un grupo funcional¹². Asimismo, su tamaño y peso molecular pequeño¹¹, síntesis *in vitro*^{7,12}, estabilidad bajo un rango amplio de condiciones^{8,9,11,12}, y nula o baja toxicidad *in vivo*⁹, los han convertido en moléculas atractivas para el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas para agentes infecciosos^{8,9,11,12}.

Adicionalmente, estas biomoléculas se pueden modificar fácilmente para mejorar su bioestabilidad frente a nucleasas^{8,9,11,12}, incrementar su biodisponibilidad, sus propiedades farmacocinéticas y su afinidad, así como para evadir la respuesta inmune⁹ e incluso acoplarlas con moléculas reporteras, grupos funcionales o nanopartículas (NPs) para incrementar su aplicabilidad⁷.

Nanopartículas

Las NPs son una gama de materiales pequeños con al menos una dimensión inferior a 100 nm, cuyas propiedades dependen de su tamaño, forma, distribución y formulación química^{1,2,13}. Su elevada relación superficie-volumen les confiere reactividad elevada e interacciones únicas con sistemas biológicos¹. Adicionalmente, la resonancia de plasmones localizados en superficie (LSPR) manifestada comúnmente por NPs metálicas bajo estímulos fotónicos o electromagnéticos otorga propiedades ópticas equivalentes a 10 fluoróforos¹³, por lo que se podrían utilizar para el desarrollo de herramientas diagnósticas¹³.

Asimismo, existen NPs que a dosis no tóxicas para células humanas poseen cualidades antimicrobianas destacadas frente a diversos patógenos y sus variantes MDR^{1,13}, donde las NPs metálicas figuran como promotoras¹ al producir especies reactivas de oxígeno, liberar constantemente cationes metálicos^{1,3,14} y poseer una carga generalmente positiva, favoreciendo su adhesión y acumulación en la membrana externa bacteriana^{3,14}, disociándola y ocasionando la eliminación del gradiente de protones y la subsiguiente salida del contenido citoplasmático^{1,3,14}.

Además, las NPs más pequeñas y los cationes metálicos pueden internalizarse en las bacterias^{1,3}, añadiendo efectos antimicrobianos trascendentales, como la inhibición de enzimas cruciales para la replicación del ADN y la producción de ATP^{3,14}.

También las NPs no antimicrobianas pueden ser útiles para diseñar estrategias diagnósticas y terapéuticas para infecciones bacterianas, al adecuarlas para el transporte-entrega de compuestos antimicrobianos en sitios específicos (nanoportadores)^{2,4}, acumulando el compuesto sobre la superficie bacteriana y mejorando su farmacocinética^{3,4,13,15}. En esta revisión abordaremos algunos ejemplos de aptámeros selectivos para especies bacterianas patógenas, que han sido utilizados junto con NPs para el diseño de estrategias diagnósticas y/o terapéuticas novedosas frente a patógenos bacterianos (tabla 1).

Aptámeros y nanopartículas para la identificación de patógenos bacterianos

En la actualidad se han seleccionado aptámeros dirigidos a especies bacterianas diversas^{1,7,8,10,12}, principalmente usados como fase estacionaria de captura de moléculas, capaces de identificar bacterias en muestras ambientales y clínicas, con sensibilidades equivalentes o superiores a las de los cultivos convencionales^{8,12}. La sinergia existente entre los aptámeros y las NPs ha evidenciado su potencial para ser empleados en biomedicina¹⁶, al incrementar la afinidad de un aptámero por su diana ocasionado por una densidad elevada de aptámeros sobre las NPs, acrecentando la cantidad de interacciones con el blanco por acción cooperativa (efecto multivalencia)^{7,16}, que a su vez protege a los aptámeros de la digestión por nucleasas¹⁶.

Detección bacteriana basada en aptámeros y quantum dots

Las *quantum dots* (QD's) son un tipo de NPs con propiedades fluorescentes destacables^{10,17}. Se han utilizado en ensayos piloto para el desarrollo de un sistema de detección semicuantitativo para *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis* mediante la conjugación de aptámeros a QD's, demostrando ser capaces de reconocer a cada microorganismo mediante variaciones de fluorescencia de las QD's. La detección inicial se evaluó con $\sim 2,8 \times 10^6$ bacterias/mL y la intensidad fluorescente se modificó proporcionalmente al número de bacterias presentes¹⁷, evidenciando su potencialidad para el diagnóstico bacteriano¹⁸. También se ha utilizado un aptámero anti-*Pseudomonas aeruginosa* para desarrollar un método de detección de esta bacteria en agua potable. Mediante el marcaje de aptámeros con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y aptámeros conjugados a QD's, se demostró que estos últimos tuvieron afinidades disminuidas respecto al aptámero marcado con FITC¹⁹, probando que la nanotecnología también puede presentar resultados desfavorables para moléculas de reconocimiento prometedoras.

También se han utilizado las *carbon dots* (CD's), que tienen propiedades luminiscentes, tóxicas y de biocompatibilidad prometedoras^{10,20}. Se han empleado en conjunto con aptámeros anti-*S. typhimurium* para desarrollar un método de detección basado en fluorescencia, mostrando límites de detección (LDD) de 50 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL en 2 h de incubación con cultivos bacterianos líquidos^{10,21,22} (fig. 1), confirmados por el método de recuento en placa²².

Detección bacteriana a través de aptámeros acoplados a nanopartículas metálicas

Actualmente, las NPs de oro (AuNPs) se utilizan ampliamente para la generación de biosensores bacterianos debido a las características electroquímicas, ópticas y de resonancia de plasmones, entre otras propiedades prometedoras que poseen²¹. Estas se han utilizado en conjunto con aptámeros para la detección de *Salmonella enteritidis*, conjugando aptámeros con AuNPs, para posteriormente inmovilizarlos sobre un electrodo de carbono. Esta prueba de concepto demostró que al introducir el electrodo en soluciones con la bacteria, la resistencia eléctrica se incrementó debido a la formación de complejos aptámero-bacteria, permitiendo su medición por espectroscopia de impedancia electroquímica con un LDD de 600 UFC/mL^{10,23}, sentando las bases para desarrollar nuevos métodos basados en este principio, para la detección de diversos microorganismos²³.

También se ha desarrollado un *chip* basado en la inmovilización de AuNPs acopladas a aptámeros anti-*S. typhimurium*, cuyo estudio piloto mostró su utilidad para detectar a este patógeno en líquidos procedentes de lavados de carne de cerdo. Así, al introducir el *chip*

Tabla 1

Empleo de aptámeros y nanopartículas utilizados para el diseño de estrategias diagnósticas y/o terapéuticas frente a patógenos bacterianos

Nanoestructura	Elemento de reconocimiento	Bacteria diana	Utilidad potencial	Referencias
QD's	Aptámero	<i>E. coli</i>	Diagnóstica	17
	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>B. subtilis</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>P. aeruginosa</i>	Diagnóstica	
CD's	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	18
	Aptámero	<i>S. enteritidis</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>E. coli</i>	Diagnóstica	
AuNPs	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	19,36
	Aptámero	<i>C. jejuni</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>C. coli</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>L. acidophilus</i>	Diagnóstica	
Au-sílica NPs	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	12,21,22
	Aptámero	<i>P. aeruginosa</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
MNPs	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	7,19,21,24,25
	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
MBs y AuNPs	Aptámero	<i>V. parahaemolyticus</i>	Diagnóstica	10,26,27
	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
MNPs y UCNPs	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	5,10
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
MNPs	Aptámero marcado con FAM	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	28
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
MNPs y nano keepers unidos a oligonucleótidos marcados con FAM	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	29
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
MBs, AuNCs y vancomicina	Anticuerpo y aptámero marcado con FITC	SARM	Diagnóstica	30
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
SWNTs	Aptámero modificado con DNazima	<i>S. paratyphi A</i>	Diagnóstica	31
	Aptámero	<i>E. coli</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>E. coli</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>E. coli</i>	Diagnóstica	
FNPs	Aptámero	<i>V. parahaemolyticus</i>	Diagnóstica	10,33
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
CNP's	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	34
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>E. coli</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>E. coli</i>	Diagnóstica	
AuNCs, vancomicina y AuNPs	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	40
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	
AuNPs y UCNPs unidos a ADNc del aptámero	Aptámero	<i>E. coli</i>	Terapéutica	41
	Aptámero	<i>E. coli</i>	Terapéutica	
	Aptámero	<i>E. coli</i>	Terapéutica	
	Aptámero	<i>E. coli</i>	Terapéutica	
AgNPs	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	42
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	
TiO ₂ NPs	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	43
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	
AuNPs acoplados a A3-APO ^{His}	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	43
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	

A3-APO^{His}: péptidos antimicrobianos marcados con hexahistidina; ADNc: ADN complementario; AgNPs: nanopartículas de plata; AuNCs: nano-agrupaciones de oro; AuNPs: nanopartículas de oro; CD's: carbon dots; CNPs: nanopartículas de carbono; CPX: ciprofloxacino; CY3: colorante 3 de cianina; FAM: carboxifluoresceína; fGmH: 2'-F-dG, 2'-OMe-dA/dC/dU; FITC: isotiocianato de fluoresceína; FNPs: nanopartículas fluorescentes; MBs: perlas magnéticas; MNPs: nanopartículas magnéticas; NPs: nanopartículas; QD's: quantum dots; ROX: 6-carboxi-X-rodamina; SARM: *S. aureus* resistentes a meticilina; SWNTs: nanotubos de carbono; TiO₂NPs: nanopartículas de dióxido de titanio; UCNPs: nanopartículas de conversión ascendente.

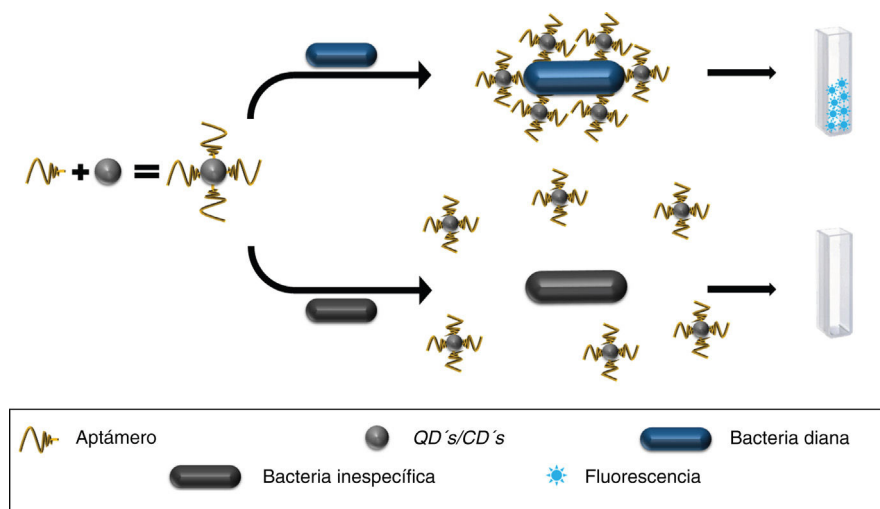


Figura 1. Acoplamiento entre aptámeros y QD's/CD's. El aptámero permite la agrupación de QD's/CD's sobre el microorganismo de interés favoreciendo la emisión de fluorescencia, a diferencia de QD's/CD's dispersos en muestras sin presencia de la bacteria diana.

CD's: carbon dots; QD's: quantum dots.

en el líquido, el aptámero adquiere un cambio estructural al ligar a la bacteria, modificando la absorbancia basal de la LSPR de las AuNPs que se detectó por espectrofotometría UV/visible (fig. 2). La principal limitación de este método es la necesidad de establecer matrices diferentes para los diferentes alimentos antes de comercializar este tipo de tecnología²⁴.

Del mismo modo, un estudio piloto basado en aptámeros inmovilizados sobre NPs de sílica cubiertas con oro (Au-sílica NPs) ha permitido desarrollar un sensor multiplex para *Lactobacillus acidophilus*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*, logrando discriminar entre cada patógeno con un LDD de 3 UFC por ensayo, gracias al reconocimiento de cada aptámero a su diana,

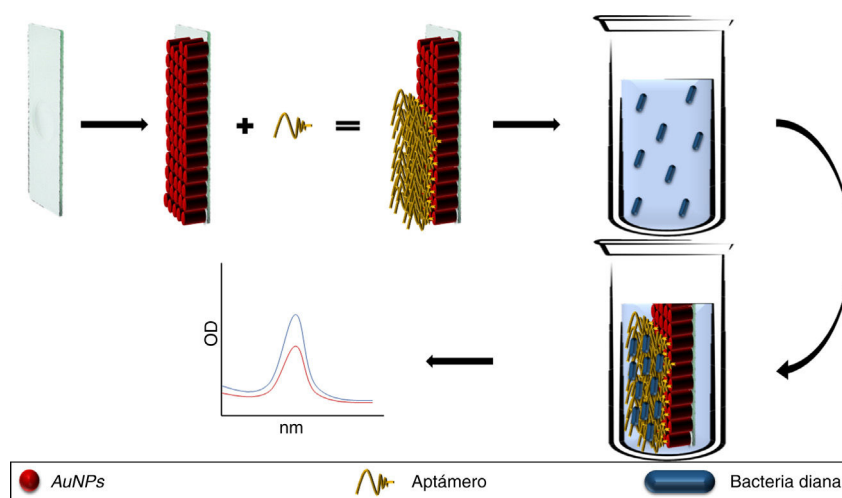


Figura 2. Aptámeros conjugados a AuNPs e inmovilizados sobre una placa de vidrio (*chip*). El aptámero une a las bacterias diana modificando los picos de absorción de las AuNPs. En soluciones sin el patógeno los picos de absorción se mantienen idénticos al pico de absorción basal de las AuNPs. AuNPs: nanopartículas de oro.

alterando de manera particular la LSPR de las NPs para cada especie bacteriana^{12,25,26}.

Aptámeros y moléculas magnéticas para la detección de bacterias

Las NPs magnéticas (MNPs) pueden ocasionar cambios de coloración de una solución en presencia de un sustrato colorimétrico como 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y H_2O_2 , de manera similar a la peroxidasa. Esta propiedad se ha utilizado para detectar *S. typhimurium* mediante un estudio de prueba de concepto, donde se observó que aptámeros anti-*S. typhimurium* en solución con MNPs inhibían la acción enzimática de estas últimas, pero al añadir $7,5 \times 10^5$ UFC/mL de la bacteria, el aptámero se unió al patógeno desprotegiendo las MNPs y permitiendo su acción enzimática²⁷.

Adicionalmente, las perlas magnéticas (MBs) y las MNPs se pueden usar en conjunto con los aptámeros para desarrollar métodos de captura-separación magnética de patógenos presentes en una muestra, para concentrarlos^{7,21,25,28–30} y posteriormente detectarlos por estrategias diversas, consiguiendo LDD de 1–682 UFC/mL validados por el método de recuento en placa^{29,31–33}, como sigue:

- (i) A partir de la variación en la señal eléctrica ocasionada por la excitación fotónica de AuNPs acopladas a aptámeros anti-*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) al ligar a dicho patógeno^{7,25,28}.
- (ii) Por la medición de iones de plata (Ag^+) en solución, producidos por NPs de plata (AgNPs) acopladas a aptámeros anti-*S. aureus*, donde la concentración de Ag^+ es directamente proporcional a la densidad de la bacteria en una muestra^{21,29}.
- (iii) Mediante la detección de la fluorescencia específica de NPs de conversión ascendente (UCNPs) unidas a aptámeros específicos anti-*S. typhimurium*, anti-*S. aureus* y anti-*Vibrio parahaemolyticus*^{10,30,31}.
- (iv) De manera similar, a partir de la detección de fluorescencia de aptámeros selectivos para *S. typhimurium* modificados con carboxifluoresceína (FAM)^{5,10,34}.
- (v) Por medio de la identificación de enzimas específicas producidas por un patógeno en particular, como las nucleasas micrococales (MN) de *S. aureus*, que mediante la adición de *nano keepers*, constituidos por oligonucleótidos marcados con FAM específicamente susceptibles a las MN, se inmovilizan en los poros de NPs de sílica mesoporosas (MSNs) para inhibir la fluorescencia de FAM, pero al estimular la producción de MN, los oligonucleótidos se degradan, permitiendo la emisión de fluorescencia³².

- (vi) Mediante la interacción específica de antimicrobianos con patógenos concretos, como la vancomicina y *S. aureus*, comportamiento que ha sido útil para la detección de este patógeno mediante la incubación con nano-agrupaciones de oro (AuNCs) con propiedades fluorescentes, las cuales se inhiben por la vancomicina, pero en presencia de *S. aureus*, la vancomicina interactúa con el patógeno permitiendo la emisión de fluorescencia de las AuNCs³³.

También hay evidencia del uso combinado de anticuerpos y aptámeros para la detección fluorométrica de determinados microorganismos, tales como *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) utilizando MBs cubiertas con anticuerpos anti-proteína A de *S. aureus* (SpA) para capturar al patógeno. El método consiste en lisar a la bacteria e incubarla en presencia de un aptámero anti-PBP2a (proteína específica de SARM) modificado con FITC e hibridado con tres ADNs cortos para eliminar la emisión de fluorescencia. Cuando el aptámero se une a la proteína PBP2a, se rehabilita la emisión de fluorescencia de FITC, logrando LDD de $1,38 \times 10^3$ UFC/mL, confirmados por métodos microbiológicos convencionales³⁵.

Detección bacteriana basada en aptámeros acoplados a nanoestructuras

Se han utilizado aptámeros modificados con deoxiribozima (DNAzima) inmovilizados sobre nanotubos de carbono (SWNTs) para la detección de *Salmonella paratyphi A*, donde el complejo aptámero-*S. paratyphi A* genera un cambio conformacional del extremo modificado con DNAzima, permitiéndole formar complejos con heminas (adicionadas a la solución) que, en presencia de luminol (también adicionado al sistema), catalizan la generación de quimioluminiscencia en presencia de H_2O_2 con LDD de 10^3 UFC/mL³⁶.

Asimismo, se han diseñado sistemas más elaborados para la detección de patógenos, como la plataforma de optofluidos construida para detectar la señal fluorescente de aptámeros anti-*E. coli* acoplados a NPs fluorescentes (FNPs), donde el microflujo de cultivos a través del microcanal del sistema permitió identificar ~100 células de *E. coli* por segundo mediante la señal fluorescente de las FNPs unidas a ellas, resultados que fueron confirmados por recuento en placa³⁷.

También se han diseñado sistemas multiplex para la detección de patógenos, como la inmovilización de aptámeros anti-*S. typhi*

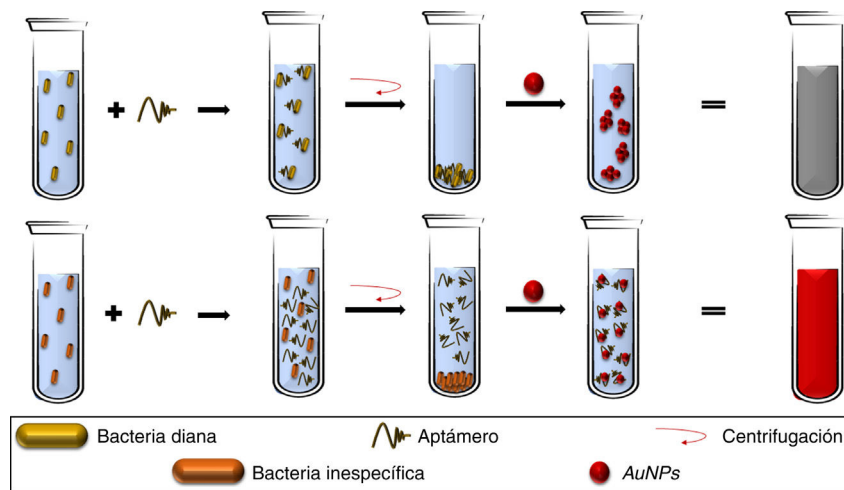


Figura 3. Los aptámeros adicionados a un caldo bacteriano ligan con especificidad a las bacterias diana, por lo que, al recuperar el botón celular mediante centrifugación, no hay aptámeros libres en la solución, permitiendo la agregación de AuNPs. Por otra parte, la ausencia de la bacteria específica permite la presencia de aptámeros libres, que mantienen dispersadas a las AuNPs. AuNPs: nanopartículas de oro.

murium, anti-*V. parahemolyticus* y anti-*S. aureus* modificados con fluorocromos diferentes (FAM, colorante 3 de cianina (CY3) y 6-carboxi-X-rodamina (ROX)) para detectar cada patógeno mediante fluorescencia. Los aptámeros fueron inmovilizados en NPs de carbono (CNPs) que permiten el ensamble de colorantes inhibiendo su fluorescencia, pero cuando los aptámeros reconocieron a su patógeno diana se disociaron de las CNPs resultando en la emisión y detección de fluorescencia^{10,38} con LDD de 50, 25 y 50 UFC/mL, respectivamente, validados por recuento en placa³⁸.

Por otro lado, también se ha utilizado la relación entre vancomicina y *S. aureus* para el estudio piloto de una estrategia de detección mediante la variación en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), utilizando AuNCs conjugadas a la vancomicina como elemento donador de energía y aptámeros anti-*S. aureus* inmovilizados sobre AuNPs como elemento receptor de energía, constituyendo las unidades de reconocimiento dual basado en FRET (DRU-FRET). Ambos sistemas son atraídos en presencia del patógeno, ocasionando la variación de FRET y habilitando LDD de 10 UFC/mL³⁹.

Existen otras evidencias de estudios piloto sobre estrategias basadas en elementos donadores y receptores de energía, como el uso de aptámeros anti-*E. coli* inmovilizados sobre AuNPs (elemento receptor de energía) y UCNPs acoplados a un oligonucleótido de ADN complementario (ADNc) a la secuencia del aptámero (elemento donador de energía), los cuales al ser hibridados inhiben la producción de fluorescencia de las UCNPs, pero en presencia del patógeno, el aptámero lo liga disociando su interacción con las UCNPs y ocasionando la emisión de fluorescencia con LDD de 3 UFC/mL⁴⁰.

Estrategias de detección bacteriana basadas en aptámeros no acoplados a nanopartículas

Los aptámeros y las NPs se pueden utilizar sin conjugar para la detección de microorganismos específicos. Algunas propiedades, tales como la interacción natural entre aptámeros y AuNPs, han sido útiles para diseñar métodos de detección para *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. aureus*. Los estudios de pruebas de concepto han demostrado que los aptámeros libres inhiben la agregación de las AuNPs, pero en presencia de los patógenos blanco, los aptámeros ligan a las bacterias permitiendo la agregación de las AuNPs (produciendo cambio de coloración de la solución)^{7,10,21,41}.

Así también, los aptámeros se pueden utilizar como elementos de reconocimiento y captura de microorganismos, como los métodos de detección descritos para *S. aureus*⁴², *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*⁴³, donde al adicionar aptámeros a soluciones bacterianas, los aptámeros se unen específicamente a su patógeno objetivo, siendo eliminados al descartar el botón celular y permitiendo la agregación de las AuNPs (adicionadas al sobrenadante), obteniendo LDD de $5,6 \times 10^5$ UFC/mL (fig. 3), con valores de sensibilidad y especificidad del 80,0% y 93,3%, respectivamente, validados por cultivos suplementados con tazobactam (método estándar)⁴³, abriendo la oportunidad de usar plataformas similares para otras bacterias patógenas, pese a presentar dificultades para reconocer diferentes variantes morfológicas de una misma especie bacteriana⁴³.

Terapéutica basada en aptámeros y nanopartículas

Pese a las prometedoras características antimicrobianas de las NPs y la especificidad de los aptámeros, estos no se han empleado ampliamente para desarrollar estrategias terapéuticas. Sin embargo, su uso como nanoportadores de fármacos ha sido una estrategia atractiva^{2,44,45} para incrementar la eficiencia de los antibióticos disponibles⁴⁵.

Las NPs se pueden administrar por diversas vías⁴⁴ y, actualmente, existen tratamientos antibacterianos como PolyMemSilver®, Acticoat™, SilvaSorb™ y Aquacel® Ag², por mencionar algunos, donde las AgNPs figuran como actores principales.

Algunos estudios sugieren toxicidad de ciertas NPs frente a las células del huésped, aunque se pueden modificar para disminuir ese efecto desfavorable¹⁴, como su conjugación con aptámeros⁴⁵ que, adicionalmente, abre la posibilidad de dirigir NPs y/u otros fármacos al sitio apropiado, a concentraciones y periodos de tiempo adecuados², incrementando su poder antimicrobiano en rangos de 3-250 veces^{2,14}, por lo que han sido útiles para el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas frente a diferentes tipos de cáncer¹⁵.

Estudios in vitro de estrategias potencialmente terapéuticas

Respecto a la terapéutica frente a infecciones bacterianas basada en aptámeros y NPs existe evidencia escasa pero alentadora. Una de ellas es la modificación de un aptámero anti-SpA con fGmH (2'-F-dG, 2'-OMe-dA/dC/dU), dotándolo de resistencia a la hidrólisis

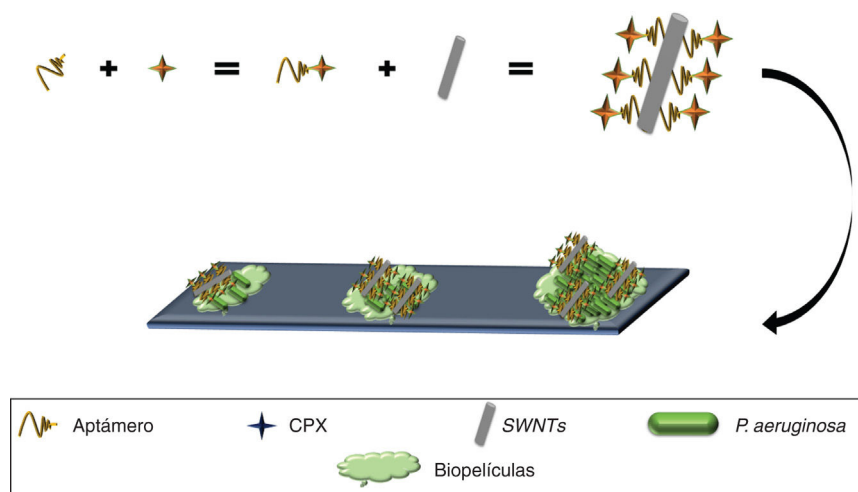


Figura 4. Aptámero anti-*P. aeruginosa* acoplado a CPX, complejo inmovilizado sobre SWNTs, mostrando el reconocimiento y unión a *P. aeruginosa*, inhibiendo el crecimiento bacteriano, formación de biopelículas e incluso la degradación de biopelículas establecidas. CPX: ciprofloxacino; SWNTs: nanotubos de carbono.

alcalina y a nucleasas presentes en suero. Adicionalmente, los aptámeros se conjugan con AgNPs liberando su acción antimicrobiana específica frente a *S. aureus* de manera dependiente de SpA⁴⁶.

El uso de *nano keepers* como nanoportadores de antibióticos ha mostrado su utilidad, como la inmovilización de vancomicina en los poros de MSNs y su posterior conjugación con un aptámero anti-*S. aureus*, depositando el fármaco en el sitio preciso, lo que disminuye su concentración inhibitoria mínima y reduce su toxicidad frente a otras especies relacionadas⁴⁷.

Adicionalmente, el efecto antimicrobiano de las NPs se puede mejorar con el uso de diferentes aptámeros dirigidos frente al mismo patógeno, como lo descrito para *E. coli* donde la inmovilización de tres aptámeros sobre NPs de dióxido de titanio (TiO₂NPs) desactivó al 99,9% de las bacterias en 30 min, en contraste a TiO₂NPs unidas a un aptámero y TiO₂NPs en solitario que las desactivaron en 60 min⁴⁸.

Asimismo, los SWNTs han demostrado poseer actividad frente a biopelículas⁴⁹ (estrategia primaria utilizada por las bacterias para sobrevivir en distintos ambientes)⁵⁰ y se han utilizado para desarrollar un nanocompuesto anti-biopelículas de *P. aeruginosa*, mediante el uso de un aptámero selectivo frente a esta bacteria conjugado con ciprofloxacino (Apt-CPX) y SWNTs (Apt-SWNTs). Adicionalmente se generó una molécula conformada por los tres elementos (Apt-CPX-SWNTs) que en ensayos *in vitro* logró disminuir en un 90% la formación de biopelículas y degradar ~75% de biopelículas establecidas (fig. 4), indicando que estas herramientas se podrían emplear para el tratamiento eficaz de biopelículas⁴⁹.

Ensayos in vivo de terapias de erradicación bacteriana

De manera prometedora, se han utilizado aptámeros anti-*S. typhimurium* marcados con histidina y acoplados a AuNPs (AuNP-Apt^{His}), complejo a su vez conjugado a péptidos antimicrobianos marcados con hexahistidina (A3-APO^{His}), para erradicar infecciones intracelulares por *S. typhimurium*, demostrando su funcionamiento *in vitro*, al liberar a A3-APO^{His} dentro de células HeLa infectadas con la bacteria. Asimismo, en ensayos *in vivo* realizados en ratones infectados con dosis que causaban la muerte del animal en 4-5 días, la molécula permitió su supervivencia, al erradicar al patógeno, hecho que se comprobó por la disminución del número de células bacterianas viables en un ~93-98% en cultivos procedentes de los órganos infectados de cada ratón⁵¹, sugiriendo que el uso combinado de aptámeros, NPs e incluso otros compuestos

antimicrobianos puede ser útil para el desarrollo de terapias eficaces frente a infecciones causadas por bacterias.

Conclusiones

En los últimos años, la biomedicina nanométrica ha venido posicionándose como una herramienta prometedora para el diagnóstico, prevención y tratamiento de diversas enfermedades, donde los aptámeros y las NPs han demostrado su aplicabilidad para el diagnóstico y tratamiento de diferentes enfermedades. En las infecciones bacterianas, las pruebas de concepto del uso combinado de ambos elementos han permitido detectar células bacterianas individuales de manera rápida y específica, por lo que la implementación en un futuro de esas metodologías podría traducirse en diagnósticos precisos, que mejorarían el pronóstico de los pacientes infectados al recibir terapias específicas y precoces para la erradicación del agente infectante. Asimismo, los estudios *in vivo* de nanoestructuras complejas constituidas por NPs, aptámeros e incluso otros compuestos antimicrobianos han demostrado que podrían constituir una herramienta poderosa frente a la «crisis de resistencia a los antibióticos», permitiendo erradicar infecciones con dosis bajas de antimicrobianos al depositarlos multivalentemente en el sitio adecuado y durante el periodo de tiempo preciso, constituyendo una terapia ideal que no afectaría al microbioma de órganos o tejidos ni a las células del huésped. Estos avances tecnológicos sugieren que próximamente podrían existir herramientas rápidas y específicas basadas en NPs y aptámeros para el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Financiación

Juan Carlos Gutiérrez Santana es beneficiado con el apoyo de beca 2018-000068-02NACF-28106 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México, agradeciendo a este organismo su apoyo. Este trabajo está financiado por fondos federales, México, del Instituto Nacional de Pediatría, autorización 068/2019.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnology*. 2018;16:14.
2. Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release*. 2016;224:86–102.
3. Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Fazly Bazzaz BS. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb Pathog*. 2016;95:32–42.
4. Parisi OI, Scrivano L, Sinicropi MS, Puoci F. Polymeric nanoparticle constructs as devices for antibacterial therapy. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;36:72–7.
5. Park KS. Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections. *Biosens Bioelectron*. 2018;102:179–88.
6. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 2015;40:277–83.
7. Urmann K, Modrzejewski J, Scheper T, Walter JG. Aptamer-modified nanomaterials: principles and applications. *BioNanoMat*. 2017;18, 20160012201600217.
8. Davydova A, Vorobjeva M, Pyshnyu D, Altman V, Vlassov V, Venyaminova A. Aptamers against pathogenic microorganisms. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42:847–65.
9. Sun H, Zu YA. Highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules*. 2015;20:11959–80.
10. Duan N, Wu S, Dai S, Gu H, Hao L, Ye H, et al. Advances in aptasensors for the detection of food contaminants. *Analyst*. 2016;141:3942–61.
11. Sun H, Zhu X, Lu PY, Rosato RR, Tan W, Zu Y. Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3:e182.
12. Ruscito A, DeRosa MC. Small-molecule binding aptamers: selection strategies, characterization, and applications. *Front Chem*. 2016;4:14.
13. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. *Arab J Chem*. 2019;12:908–31, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabcj.2017.05.011>.
14. Li J, Tang M, Xue Y. Review of the effects of silver nanoparticle exposure on gut bacteria. *J Appl Toxicol*. 2019;39:27–37, <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3729>.
15. Benedetto G, Vestal CG, Richardson C. Aptamer-functionalized nanoparticles as 'smart bombs': the unrealized potential for personalized medicine and targeted cancer treatment. *Target Oncol*. 2015;10:467–85.
16. Kong RM, Zhang XB, Chen Z, Tan W. Aptamer-assembled nanomaterials for biosensing and biomedical applications. *Small*. 2011;7:2428–36.
17. Dwarakanath S, Bruno JG, Shastry A, Phillips T, John A, Kumar A, et al. Quantum dot-antibody and aptamer conjugates shift fluorescence upon binding bacteria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325:739–43.
18. Fowler CC, Navani NK, Brown ED, Li Y. Aptamers and their potential as recognition elements for the detection of bacteria. In: Zourob M, Sauna E, Turner APF, editors. *Principles of bacterial detection: Biosensors, recognition receptors and microsystems*. New York: Springer-Verlag; 2008. p. 689–714.
19. Kim LH, Yu HW, Kim YH, Kim IS, Jang A. Potential of fluorophore labeled aptamers for *Pseudomonas aeruginosa* detection in drinking water. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2013;56:165–71.
20. Ansari N, Yazdian-Robati R, Shahdordizadeh M, Wang Z, Ghazvini K. Aptasensors for quantitative detection of *Salmonella Typhimurium*. *Anal Biochem*. 2017;533:18–25.
21. Wang L, Wang R, Wei H, Li Y. Selection of aptamers against pathogenic bacteria and their diagnostics application. *World J Microbiol Biotechnol*. 2018;34:149.
22. Wang R, Xu Y, Zhang T, Jiang Y. Rapid and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using aptamer-conjugated carbon dots as fluorescence probe. *Anal Methods*. 2015;7:1701–6.
23. Labib M, Zamay AS, Kolovskaya OS, Reshetneva IT, Zamay GS, Kibbee RJ, et al. Aptamer-based impedimetric sensor for bacterial typing. *Anal Chem*. 2012;84:8114–7.
24. Oh SY, Heo NS, Shruti S, Cho H-J, Vilian ATE, Kim J, et al. Development of gold nanoparticle-aptamer-based LSPR sensing chips for the rapid detection of *Salmonella typhimurium* in pork meat. *Sci Rep*. 2017;7:10130.
25. Yoo SM, Lee SY. Optical biosensors for the detection of pathogenic microorganisms. *Trends Biotechnol*. 2016;34:7–25.
26. Yoo SM, Kim DK, Lee SY. Aptamer-functionalized localized surface plasmon resonance sensor for the multiplexed detection of different bacterial species. *Talanta*. 2015;132:112–7.
27. Park JY, Jeong HY, Kim MII, Park TJ. Colorimetric detection system for *Salmonella typhimurium* based on peroxidase-like activity of magnetic nanoparticles with DNA aptamers. *J Nanomater*. 2015;2015, 5271265271269.
28. Chang YC, Yang C-Y, Sun R-L, Cheng Y-F, Kao W-C, Yang P-C. Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Sci Rep*. 2013;3:1863.
29. Abbaspour A, Norouz-Sarvestani F, Noori A, Soltani N. Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of *Staphylococcus aureus*. *Biosens Bioelectron*. 2015;68:149–55.
30. Duan N, Wu S, Zhu C, Ma X, Wang Z, Yu Y, et al. Dual-color upconversion fluorescence and aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Anal Chim Acta*. 2012;723:1–6.
31. Wu S, Duan N, Shi Z, Fang C, Wang Z. Simultaneous aptasensor for multiplex pathogenic bacteria detection based on multicolor upconversion nanoparticles labels. *Anal Chem*. 2014;86:3100–7.
32. Borsa BA, Tuna BG, Hernandez FJ, Hernandez LI, Bayramoglu G, Arica MY, et al. *Staphylococcus aureus* detection in blood samples by silica nanoparticle-oligonucleotides conjugates. *Biosens Bioelectron*. 2016;86:27–32.
33. Cheng D, Yu M, Fu F, Han W, Li G, Xie J, et al. Dual recognition strategy for specific and sensitive detection of bacteria using aptamer-coated magnetic beads and antibiotic-capped gold nanoclusters. *Anal Chem*. 2016;88:820–5.
34. Duan N, Wu S, Chen X, Huang Y, Xia Y, Ma X, et al. Selection and characterization of aptamers against *Salmonella typhimurium* using whole-bacterium systemic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *J Agric Food Chem*. 2013;61:3229–34.
35. Qiao J, Meng X, Sun Y, Li Q, Zhao R, Zhang Y, et al. Aptamer-based fluorometric assay for direct identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples. *J Microbiol Methods*. 2018;153:92–8.
36. Yang M, Peng Z, Ning Y, Chen Y, Zhou Q, Deng L. Highly specific and cost-efficient detection of *Salmonella Paratyphi A* combining aptamers with single-walled carbon nanotubes. *Sensors*. 2013;13:6865–81.
37. Chung J, Kang JS, Jung JS, Jung JH, Kim BC. Fast and continuous microorganism detection using aptamer-conjugated fluorescent nanoparticles on an optofluidic platform. *Biosens Bioelectron*. 2015;67:303–8.
38. Duan N, Gong W, Wang Z, Wu S. An aptasensor based on fluorescence resonance energy transfer for multiplexed pathogenic bacteria determination. *Anal Methods*. 2016;8:1390–5.
39. Yu M, Wang H, Fu F, Li L, Li J, Li G, et al. Dual-recognition Förster resonance energy transfer based platform for one-step sensitive detection of pathogenic bacteria using fluorescent vancomycin-gold nanoclusters and aptamer-gold nanoparticles. *Anal Chem*. 2017;89:4085–90.
40. Jin B, Wang S, Lin M, Jin Y, Zhang S, Cui X, et al. Upconversion nanoparticles based FRET aptasensor for rapid and ultrasensitive bacteria detection. *Biosens Bioelectron*. 2017;90:525–33.
41. Lavu PSR, Mondal B, Ramlal S, Murali HS, Batra HV. Selection and characterization of aptamers using a modified whole cell bacterium SELEX for the detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *ACS Comb Sci*. 2016;18:292–301.
42. Chang T, Wang L, Zhao K, Ge Y, He M, Li G. Duplex identification of *Staphylococcus aureus* by aptamer and gold nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016;16:5513–9.
43. Kim YJ, Kim H-S, Chon J-W, Kim D-H, Hyeon J-Y, Seo K-H. New colorimetric aptasensor for rapid on-site detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken carcass samples. *Anal Chim Acta*. 2018;1029:78–85.
44. Kavoosi F, Modaresi F, Sanaei M, Rezaei Z. Medical and dental applications of nanomedicines. *APMIS*. 2018;126:795–803.
45. Gao W, Chen Y, Zhang Y, Zhang Q, Zhang L. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;127:46–57.
46. Friedman AD, Kim D, Liu R. Highly stable aptamers selected from a 2'-fully modified fGmH RNA library for targeting biomaterials. *Biomaterials*. 2015;36:110–23.
47. Kavruk M, Celikbicak O, Ozalp VC, Borsa BA, Hernandez FJ, Bayramoglu G, et al. Antibiotic loaded nanocapsules functionalized with aptamer gates for targeted destruction of pathogens. *Chem Commun*. 2015;51:8492–5.
48. Song MY, Jung J, Park YK, Kim BC. An aptamer cocktail-functionalized photocatalyst with enhanced antibacterial efficiency towards target bacteria. *J Hazard Mater*. 2016;318:247–54.
49. Wang S, Mao B, Wu M, Liang J, Deng L. Influence of aptamer-targeted anti-biofilm agents for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018;111:199–208.
50. Flynn KM, Dowell G, Johnson TM, Koestler BJ, Waters CM, Cooper VS. Evolution of ecological diversity in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by altered cyclic diguanylate signaling. *J Bacteriol*. 2016;198:2608–18.
51. Yeom JH, Lee B, Kim D, Lee J-K, Kim S, Bae J, et al. Gold nanoparticle-DNA aptamer conjugate-assisted delivery of antimicrobial peptide effectively eliminates intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biomaterials*. 2016;104:43–51.