REFINAMIENTO DE APTÁMEROS DE ADN: EL ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA NO SIEMPRE ES SUFICIENTE

Noemí de-los-Santos-Álvarez[1,2], Ana Díaz-Fernández[1,2], Dimas Suárez[1], Natalia Díaz[1], María Jesús Lobo-Castañón[1,2]

[1]Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Av. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, España.
[2] Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, 33011 Oviedo, España.
Email: santosnoemi@uniovi.es, https://www.unioviedo.es/electroanalysis/, IG@geuo_oviedo, LinkedIn@GEUO UniOvi, X@GEUO_oviedo

Abstract

Los aptámeros son receptores nucleicos con múltiples aplicaciones como agentes terapéuticos, en sistemas de liberación de fármacos, y como reactivos analíticos en métodos de diagnóstico. El proceso SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) de obtención de aptámeros produce secuencias con estructuras muy variadas que contienen regiones que no están involucradas en el enlace a la molécula diana. La identificación de estas zonas se realiza mediante un proceso de truncamiento empírico tedioso y costoso. Con el fin de agilizar y reducir el coste de este proceso, presentamos un protocolo computacional semiautomático que permite obtener la estructura 3D del aptámero a partir de la cual se puede predecir de forma rápida y fiable el truncamiento más adecuado, estudiar el efecto de los espaciadores y discriminar entre estructuras secundarias energéticamente similares. Estas predicciones se han validado mediante ensayos de enlace con detección por espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie (SPR) y cronoamperometría.

1. Introducción

Los aptámeros son ácidos nucleicos monocatenarios cortos, típicamente 40 nucleótidos (nt), que son capaces de reconocer y enlazarse a una gran variedad de moléculas por complementariedad química y geométrica [1,2]. Se seleccionan mediante un proceso iterativo *in-vitro* denominado SELEX a partir de una genoteca de al menos 10^{14} secuencias aleatorias que se pone en contacto con la molécula diana de interés [3]. Las secuencias que se unen a la diana se separan y amplifican por PCR. Haciendo las condiciones de interacción más restrictivas en cada nuevo ciclo de interacción-amplificación se consigue seleccionar únicamente las secuencias con mayor afinidad por la diana. Tras un proceso de clasificación y selección bioinformático, se eligen unas pocas secuencias cuya afinidad por la diana se caracteriza mediante técnicas muy diversas. Finalmente, se selecciona la secuencia con mejores características de selectividad y afinidad [4]. Una vez terminado el proceso SELEX, el aptámero puede refinarse para: i) mejorar su estabilidad en fluidos biológicos; ii) introducir grupos funcionales que faciliten su inmovilización sobre superficies o en sistemas de liberación de fármacos, o la inclusión de pequeñas moléculas (marcas) que permitan su uso en métodos de diagnóstico; iii) mejorar la afinidad mediante mutaciones puntuales; o, iv) reducir su tamaño mediante la eliminación de los nt no esenciales en el reconocimiento molecular (truncamiento) [4,5].

El truncamiento de los aptámeros ha sido, hasta el momento, un proceso fundamentalmente empírico basado en el análisis de la estructura secundaria del aptámero obtenida con servidores en línea (*online*) como *mfold* [6] o *NUPACK* [7]. Se ha observado que las regiones más proclives a unirse a la diana tienden a ser las más estructuradas (*e.g.,* cuartetos de guanina, horquillas, etc). Por ello, se suelen eliminar las regiones monocatenarias y/o reducir el tamaño de los tallos (*stems*) de las horquillas. Esta estrategia es lenta y cara, ya que exige probar numerosos truncamientos (prueba y error), aunque resulta útil en aptámeros fuertemente estructurados. Sin embargo, puede ser inadecuada en aptámeros con una estructura secundaria menos estable. Este es el caso de las secuencias Gli4 y Gli1 seleccionadas frente a la proteína desencadenante de la enfermedad celíaca, la gliadina [8,9]. Ambos aptámeros comparten unas secuencias cortas en zonas estructuradas, por lo que se decidió truncarlos conservando estas regiones consenso. Sin embargo, a pesar de las similitudes en secuencia y estructura secundaria, los estudios preliminares mostraron que solo la versión truncada de Gli4 mantiene su afinidad por la gliadina [10]. Este resultado inesperado sugiere que la estructura secundaria no proporciona suficiente información para identificar truncamientos exitosos.

La capacidad de un aptámero para reconocer y enlazarse específicamente a su diana depende de su estructura terciaria, que abarca tanto la disposición espacial de los distintos residuos como su flexibilidad para "encajar" (*aptus* en latín). Sin embargo, esta información

tridimensional es difícil de obtener experimentalmente. Por ejemplo, una búsqueda con el término "DNA *aptamer*" en el *Protein Data Bank* proporcionó solo 269 entradas (mayo 2025), varias para una misma secuencia de nucleótidos. En este contexto, la modelización computacional es una alternativa a las técnicas experimentales de determinación estructural. Así, en 2017, Jeddi y Saiz propusieron un primer protocolo computacional para generar modelos 3D realistas de aptámeros de ADN con estructura de horquilla [11]. Pero la información proporcionada por estos modelos puede ampliarse significativamente mediante un muestreo intensivo del espacio conformacional accesible a los aptámeros en disolución. Para facilitar la aplicación de las técnicas computacionales a este problema, hemos desarrollado un protocolo denominado APTAMD implementado en forma de programas (*scripts)* que automatizan las complejas tareas de edición, simulación y análisis requeridas para generar y caracterizar modelos 3D dinámicos de aptámeros [12]. A partir de estos modelos, en este artículo se resume cómo determinar y valorar la influencia estructural de las distintas regiones de la secuencia. De este modo, veremos que es posible proponer truncamientos de forma racional, lo que reduce significativamente el trabajo experimental asociado al refinamiento y optimización de los aptámeros.

2. Protocolo computacional

La modelización de un aptámero en disolución acuosa comienza con la obtención de su estructura secundaria a partir de la secuencia. En nuestro caso, utilizamos el programa *mfold* (Fig. 1-i), que combina múltiples motivos estructurales (e.g., *loops*, *stacks,* etc.) y calcula la estabilidad de las estructuras secundarias resultantes a una temperatura y fuerza iónica determinadas mediante un algoritmo termodinámico estadístico que opera con datos termodinámicos experimentales [6]. Posteriormente, empleamos un método bioinformático, *RNA-Composer* (Fig. 1-ii), que utiliza una base de datos estructurales de moléculas de ARN para traducir la estructura secundaria suministrada en una primera geometría 3D del aptámero de ARN equivalente [13].

La estructura 3D generada por *RNA-Composer* es el *input* necesario para aplicar el protocolo APTAMD, que emplea los potenciales de mecánica molecular (MM) y los programas que forman parte del paquete *AMBER,* ampliamente utilizado en la simulación de biomoléculas [14]. Con APTAMD editamos de modo automático la geometría proporcionada por *RNA-Composer*. Esta edición adapta la geometría a una secuencia de ADN, la coloca en el seno de una celda constituida por miles de moléculas de agua, incluye los contraiones (Na^+, Cl^-) necesarios para ajustar la fuerza iónica y escoge una representación MM óptima para cada componente (Fig. 1-iii).

Cabe destacar que los modelos potenciales MM predicen con buena exactitud los cambios en la energía potencial de biomoléculas debidos a las pequeñas variaciones en las distancias y ángulos de enlace, los cambios conformacionales y al efecto de las interacciones intermoleculares [15]. Así, mediante la aplicación de condiciones periódicas, dichos potenciales nos permiten simular el comportamiento dinámico en disolución de biomoléculas formadas por miles y decenas de miles de átomos. Por supuesto, esta capacidad puede y debe aprovecharse en la construcción de modelos 3D de aptámeros, ya que son moléculas relativamente flexibles por lo que es imprescindible explorar su espacio de fases conformacional.

En la actualidad, los servidores de cálculo científico equipados con tarjetas de procesamiento gráfico ejecutan, en unos pocos días, simulaciones de dinámica molecular (MD) de aptámeros en la escala de los μs. Estas simulaciones relajan energéticamente las geometrías de partida y, cuando son suficientemente extensas, predicen los confórmeros más importantes y caracterizan la flexibilidad local y global de los aptámeros.

El protocolo APTAMD contempla en primer lugar una simulación MD con muestreo reforzado, usando el algoritmo *Gaussian-accelerated* MD (GaMD) [16]. Esta técnica aplica un potencial armónico diseñado para acelerar los movimientos de torsión y promover las transiciones conformacionales. Pero para conocer cuáles son las conformaciones más favorables en ausencia de dicho potencial es necesario aplicar una técnica estadística conocida como *repesado*, que transforma la distribución de probabilidad GaMD en una distribución no sesgada. En la práctica, esta técnica da lugar a curvas o superficie de energía libre en función de parámetros estructurales seleccionados previamente (Fig. 1-iv). Los *scripts* de APTAMD se hacen cargo de estas tareas y encuentran la geometría más probable del aptámero producida por una simulación GaMD. La estructura seleccionada se toma como punto de partida de una segunda simulación MD, empleando ahora un algoritmo convencional (no sesgado) que efectúa un muestreo conformacional extenso en condiciones de equilibrio (Fig. 1-v).

La simulación MD convencional debe analizarse con cuidado para determinar el grado de convergencia y la extensión del muestreo conformacional. Para ello, APTAMD facilita varios *scripts* que calculan la evolución temporal de descriptores estructurales, energéticos y entrópicos. Esta información es clave para dividir la simulación en una primera fase de relajación y una fase posterior de equilibrio de la que se toman los datos para

caracterizar las propiedades dinámicas y energéticas del aptámero. En particular, la agrupación de las coordenadas en clústeres conformacionales usando las técnicas disponibles en el paquete AMBER tiene un papel crucial, ya que el número, los elementos estructurales y el grado de semejanza de los representantes de cada clúster describen la forma y flexibilidad del aptámero (Fig. 1-vi). Esta información, fruto de la simulación intensiva y del correspondiente tratamiento estadístico, permite valorar con cierta confianza la importancia relativa de distintos segmentos de la secuencia del aptámero.

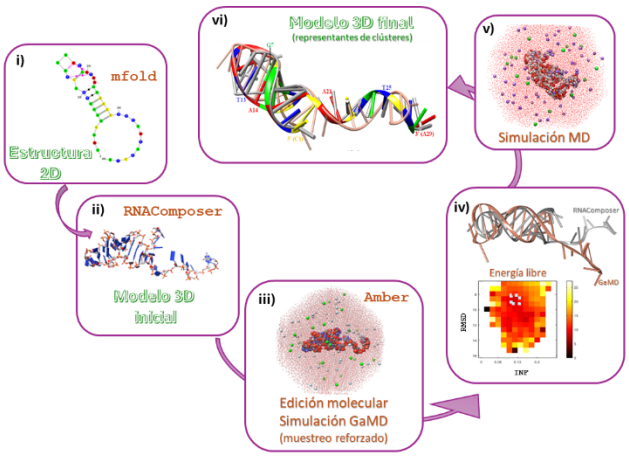

Fig. 1. Flujo de trabajo del protocolo APTAMD. i) Construcción del modelo 2D inicial; ii) modelo 3D preliminar; iii) simulación reforzada GaMD; iv) análisis estructural y construcción de los mapas de energía libre; v) simulación convencional; vi) clusterización y análisis de las trayectorias que conducen a los modelos 3D finales.

3. Modelización de los aptámeros Gli4 y Gli1

Como se ha comentado en la introducción, la estructura secundaria de los aptámeros Gli4 y Gli1 presentan dos regiones con secuencias consenso (motivos verde y rosa, Fig. 2A y B). A priori, esta coincidencia podría indicar que estas regiones son importantes para el enlace a la diana. Pero dado que el truncamiento de Gli4 y Gli1 manteniendo los motivos conservados no confirmó esta hipótesis, se decidió construir los modelos tridimensionales de los aptámeros completos a partir de las estructuras 2D predichas por *mfold*.

La estructura 2D de Gli4 presenta dos horquillas (Fig. 2A), una en cada mitad de la secuencia. Ambas horquillas se mantienen en la estructura 3D durante las simulaciones de dinámica molecular realizadas con APTAMD. No se observan contactos estables entre ellas y parecen evolucionar de forma independiente. El aptámero truncado seleccionado (Gli4T), 21 nt del extremo 3', conserva completamente la segunda horquilla y su capacidad de reconocimiento de la gliadina. De hecho, la modelización del aptámero truncado muestra una mayor estabilidad asociada al aumento de los contactos entre bases.

El caso del aptámero Gli1 es más complejo. *Mfold* predice dos modelos estructuralmente muy diferentes, pero energéticamente próximos (Fig. 2B). Se construyeron y analizaron los modelos 3D de ambas estructuras secundarias, confirmándose claramente la mayor estabilidad energética del modelo 1, que asumimos como el más probable para la secuencia Gli1. Este modelo 1 solo preserva la primera horquilla en el extremo 5' de las tres predichas por *mfold* (Fig. 2B, izquierda). El resto de la molécula, dónde se encuentran los motivos compartidos con Gli4, adopta una conformación helicoidal más extendida y flexible. Esta pérdida de estructura respecto al modelo 2D inicial permite explicar la falta de reconocimiento molecular de la gliadina por el aptámero truncado Gli1T$_{14\text{-}30}$.

A partir de la información estructural y dinámica obtenida para el modelo más estable de Gli1, se asumió que el reconocimiento de la gliadina tendría lugar en la región estructuralmente más estable, y se ensayó un nuevo truncamiento que elimina los nt 30-40 en el extremo 3' mucho más móvil (Fig. 2C). La estructura 2D de esta variante truncada Gli1T$_{1\text{-}29}$ conserva la horquilla del aptámero completo. Además, el modelo 3D confirma que esta estructura se estabiliza tras el truncamiento, lo que podría favorecer entrópicamente el reconocimiento de la diana.

4. Ensayos de unión a la gliadina

Para evaluar la aplicabilidad del protocolo APTAMD como estrategia para diseñar truncamientos racionales de aptámeros se obtuvieron las curvas de enlace a la gliadina de los aptámeros Gli1 (completo y truncado) mediante dos técnicas ortogonales: SPR y cronoamperometría.

En ambos casos se construyó una fase sensora sobre Au en la que se inmovilizó covalentemente estreptavidina sobre una monocapa autoensamblada (SAM) mixta formada por ácido mercaptoundecanoico y mercaptohexanol. Finalmente, se inmovilizó el péptido biotinilado 33-mer de la α-gliadina (diana de los aptámeros). Esta fase sensora se expuso a concentraciones crecientes del aptámero en estudio. En el caso del SPR, la unión del aptámero al péptido 33-mer produce un cambio de índice de refracción en la interfase que se manifiesta en un cambio en el ángulo al que se produce la resonancia de plasmón superficial (mínimo de reflectancia medida). Cuanto mayor sea la cantidad de aptámero sobre la superficie mayor será el cambio en el ángulo. En el caso de la cronoamperometría fue necesario utilizar un aptámero marcado con una

molécula pequeña (fluoresceína) para añadir luego un conjugado enzimático (fragmento Fab-peroxidasa). Cuanto mayor cantidad de aptámero se una a la superficie, mayor cantidad de enzima se inmovilizará, y, por tanto, mayor será la transformación del sustrato tetrametilbencidina en producto. La corriente generada por la reducción del producto es una medida de la cantidad de aptámero enlazada.

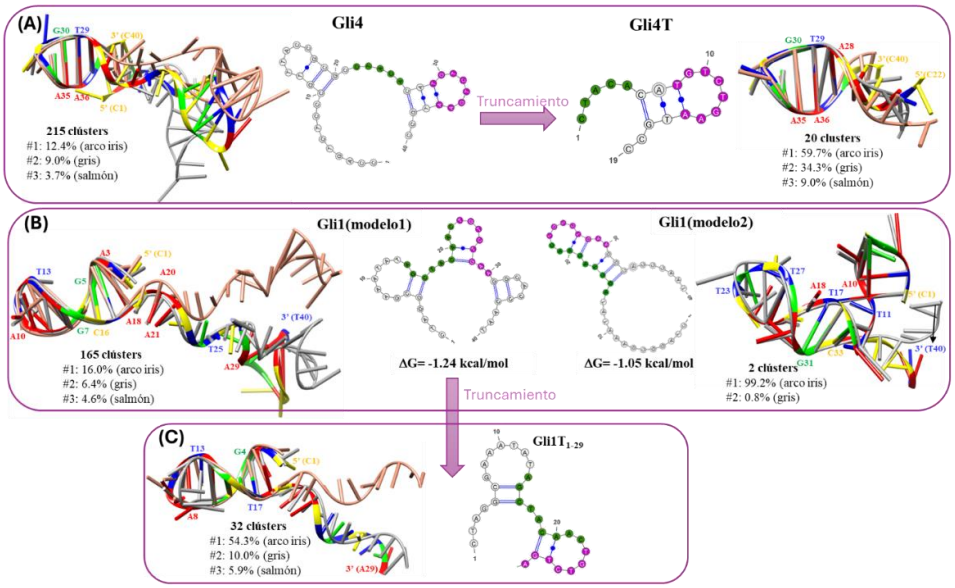

Fig. 2. Estructura secundaria obtenida con *mfold* y modelo 3D obtenido con APTAMD de los aptámeros Gli4 completo y truncado (A), estructuras 2D más estables del aptámero Gli1 y sus modelos 3D (B), estructura 2D del truncamiento de Gli1 propuesto tras el análisis de los modelos tridimensionales y su correspondiente estructura 3D (C).

Como se puede observar en la Fig. 3, tanto los ángulos (SPR) como las corrientes (cronoamperometría) aumentan conforme aumenta la concentración de aptámero Gli1 ensayada (curvas negras). Con el aptámero truncado propuesto en base a los modelos 3D (Gli1T$_{1\text{-}29}$), se obtuvieron curvas de enlace similares a las del aptámero completo en ambas técnicas (Fig. 3, curvas azules). Por tanto, este truncamiento conserva la capacidad del aptámero para reconocer y unirse a la gliadina, a diferencia de lo observado con el primer aptámero truncado propuesto tras analizar únicamente los motivos conservados en las secuencias y la estructura 2D.

Para preservar la afinidad de los aptámeros en aplicaciones analíticas se suelen utilizar regiones espaciadoras que alejen la secuencia de las marcas o los grupos funcionales que se añaden para su unión a superficies. Estos espaciadores pueden ser cadenas hidrogenadas, polietilenglicol o cadenas de timinas [17]. Este último tipo de espaciador es muy efectivo y fácil de sintetizar, por lo que su uso está muy extendido. En el aptámero truncado Gli1T$_{1\text{-}29}$ se introdujeron 5Ts en su extremo 5', observándose en la Fig. 3 (puntos rojos) que no hay cambio significativo en los ángulos de resonancia ni se generan corrientes distintas del blanco al aumentar la concentración de aptámero. Al modelizar dicho aptámero 5Ts-Gli1T$_{1\text{-}29}$, los modelos predicen que el espaciador pasa a integrarse en la región estructurada cambiándola por completo. Esto podría explicar la ausencia de unión a gliadina que muestran las curvas de enlace de la Fig. 3. Se confirma además la importancia de la estructura 3D en el reconocimiento de la diana y nos previene sobre el uso indiscriminado de este tipo de espaciador nucleico sin estudiar antes su influencia estructural y dinámica.

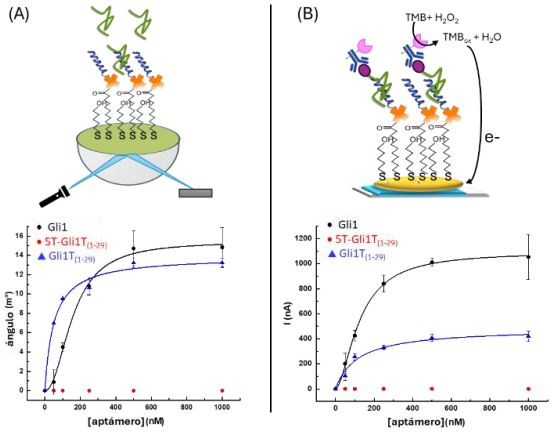

Fig 3. (A) Esquema de la plataforma sensora SPR (panel superior) y curvas de enlace de los aptámeros antigliadina (panel inferior). (B) Igual que en A pero para la plataforma sensora electroquímica.

A este respecto, es interesante comentar el caso del aptámero descrito por Savory *et al*. frente al antígeno específico prostático (PSA) [18], un biomarcador del cáncer de próstata. El aptámero obtenido por SELEX,

que consta de una región aleatoria de 24 nt se optimizó mediante el análisis de posibles mutaciones. La mutación seleccionada, donde una G se sustituyó por una A, se estabiliza tras la inclusión de 3 timinas en el extremo 3' en la estructura secundaria del aptámero (ΔG=-0,87 kcal/mol vs -4,74 kcal/mol) gracias a la formación de 3 nuevos contactos A-T canónicos en el tallo de la horquilla propuesta por el modelo 2D (Fig. 4, panel superior). Sin embargo, no es evidente el papel desempeñado por las 5 timinas que los autores decidieron añadir al extremo 5' (32 nt). La modelización 3D de los aptámeros (Fig. 4, panel inferior) muestra claramente la influencia de la adición de timinas en ambos extremos. El modelo 3D del aptámero que contiene únicamente la región aleatoria después de la mutación muestra estructuras que convergen en la zona del bucle, pero divergen en la posición del extremo 5' que sería una región flexible. La adición de las 3T en el extremo 3' estabiliza la estructura de horquilla debido a que la región hibridada se alarga. Además, se refuerzan otros contactos y se estabiliza también la región del bucle. Finalmente, la adición de 5T en el extremo 5' que parecería irrelevante, mantiene la estructura de horquilla e incluso la hace algo menos flexible, pudiendo favorecer el reconocimiento del PSA.

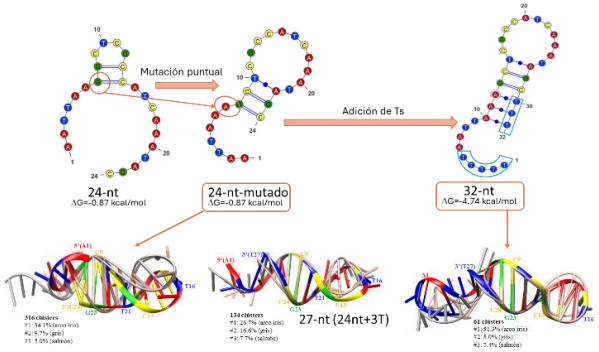

Fig. 4. Estructuras secundarias obtenidas con *mfold* del aptámero anti-PSA obtenido en SELEX (24 nt), del mutado (24-nt-mutado) y del aptámero completo (32 nt) (panel superior). Estructuras 3D obtenidas con el protocolo APTAMD del aptámero mutado, del aptámero con 3T en el extremo 3' (27 nt) y del aptámero completo (32 nt) (panel inferior).

Se obtuvieron las curvas de enlace tanto por SPR como por cronoamperometría con el aptámero de 32 nt y el aptámero de 24 nt al que se le añadieron 5T (no contiene las 3T en 3'). En este caso, la proteína PSA se unió directamente a la SAM covalentemente. Ambos aptámeros reconocen a la PSA, pero el aptámero que no tiene las 3T presentó una afinidad mucho menor. La constante de disociación medida por SPR con el aptámero completo (32-nt) es de 232±4 nM mientras que la del aptámero sin las 3T en 3' (29-nt) es de 545±24 nM. Esto puede ser debido a una penalización entrópica mayor para el complejo formado con el aptámero más flexible (el aptámero de 24 nt en los modelos 3D).

5. Modelización de aptámeros anti-PSA y anti-colágeno

Finalmente se presenta el análisis de posibles truncamientos realizados para otros tres aptámeros gracias a la información estructural y dinámica proporcionada por el protocolo APTAMD. Incluimos aquí el aptámero PSA-1 seleccionado para reconocer la región glicosilada de la glicoproteína que puede sufrir cambios aberrantes durante el desarrollo del tumor prostático [19], y dos aptámeros (D1 y B4) seleccionados frente a un péptido del colágeno XIα1, un potencial biomarcador del cáncer pancreático [20].

En el primer caso, la estructura secundaria muestra dos regiones estructuradas en horquilla en los extremos, por lo que a priori no es evidente cómo truncarlo. En el caso de los aptámeros anti-colágeno, ambos muestran una larga región monocatenaria que podría ser susceptible de truncamiento (Fig. 5, panel superior).

Las estructuras 3D muestran, sin embargo, diferencias significativas con los modelos 2D (Fig. 5, panel inferior). Durante las simulaciones de dinámica molecular, el aptámero PSA-1 pierde la horquilla en el extremo 5', lo que sugiere que su secuencia podría truncarse en al menos 14 nt en dicho extremo. El aptámero D1 presenta una estructura 3D más compacta, debido a que la extensa región monocatenaria del modelo inicial se pliega y contacta con el resto del aptámero durante la simulación. Este modelo 3D final sugiere que no es posible un truncamiento de D1 sin desestabilizar su estructura. Por el contrario, el aptámero B4 muestra un extremo en 5' muy flexible por lo que optamos por eliminar los primeros 10 nt.

Las curvas de enlace de los aptámeros completos y sus versiones truncadas demuestran que el truncamiento propuesto tras el análisis de las estructuras 3D efectivamente mantiene la afinidad por las dianas (Fig. 5 recuadros). Es más, en ambos casos, el truncamiento mejora la afinidad por la diana. La constante de afinidad del aptámero PSA-1 truncado pasa de 348±58 nM a 111±9 nM mientras que el aptámero B4 truncado pasa de 147±43 nM a 44±10 nM cuando se mide cronoamperométricamente.

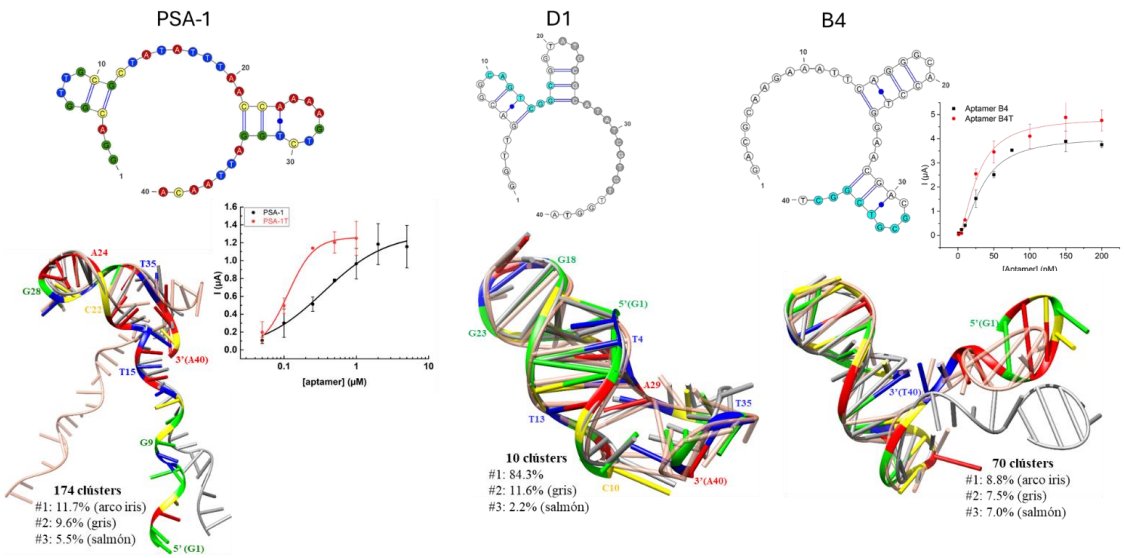

Fig 5. Panel superior: estructuras secundarias obtenidas con *mfold* para los aptámeros PSA-1, D1 y B4. Panel inferior: estructuras 3D obtenidas mediante el protocolo APTAMD de los mismos aptámeros. Recuadros: Curvas de enlace obtenidas mediante cronoamperometría de los aptámeros PSA-1 completo y truncado y B4 completo y truncado.

6. Conclusiones

En este trabajo se ha demostrado que la estructura secundaria más estable predicha por programas de acceso libre como *mfold* no siempre representa la conformación real de un aptámero. En algunos casos, las estructuras secundarias menos estables pueden desaparecer (casos del bucle interno de Gli1 y del extremo 5' de PSA-1). En otros casos, una región monocatenaria, en principio flexible, puede interaccionar con otras regiones del aptámero haciéndolo más compacto de lo previsto por la estructura secundaria (aptámero D1). Estas divergencias pueden llevar a proponer truncamientos inadecuados si solo se tiene en cuenta la estructura secundaria. Mediante el protocolo APTAMD hemos conseguido semiautomatizar la modelización computacional de estructuras 3D de aptámeros de ADN en tiempos razonables (2-3 semanas aproximadamente). La experiencia adquirida, además, confirma la necesidad de explorar el espacio conformacional de estas moléculas en la escala de los μs, con el fin de asegurar un muestreo amplio de su comportamiento dinámico y la obtención de modelos realistas.

En todos los casos estudiados, las predicciones inferidas de las estructuras tridimensionales modelizadas se han visto refrendadas por los resultados experimentales obtenidos mediante técnicas ópticas y electroquímicas. El protocolo APTAMD es una herramienta eficaz para: i) mejorar y acelerar la predicción de estructuras 3D de aptámeros de ADN para las que no hay datos estructurales previos; ii) evaluar la estabilidad de estructuras secundarias muy próximas energéticamente; iii) analizar el impacto de la adición de espaciadores; y, iv) distinguir claramente entre regiones rígidas y flexibles.

Agradecimientos

Este trabajo está financiado por el proyecto PID2021-123183OB-I00 MICIN/AEI/10.13039/501100011033/

FEDER, UE concedido por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, y por el proyecto IDE/2024/00067 concedido por el Gobierno del Principado de Asturias. ADF agradece al ISPA por el contrato postdoctoral.

Referencias

[1] A.D. Ellington, J.W. Szostak, In-vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, Nature 346 (1990) https://doi.org/818-822. 10.1038/346818a0.

[2] C. Tuerk, L. Gold, Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment - RNA ligands to bacteriophage-T4 DNA-polymerase, Science 249 (1990) 505-510. https://doi.org/10.1126/science.2200121.

[3] I. Manea, M. Casian, O. Hosu-Stancioiu, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, C. Cristea, A review on magnetic beads-based SELEX technologies: Applications from small to large target molecules, Anal. Chim. Acta 1297 (2024) 342325. https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342325.

[4] T. Wang, C. Chen, L.M. Larcher, R.A. Barrero, R.N. Veedu, Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development, Biotechnol.

Adv. 37 (2019) 28-50. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.001.
[5] T.K. Sharma, J.G. Bruno, A. Dhiman, ABCs of DNA aptamer and related assay development, Biotechnol. Adv. 35 (2017) 275-301. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.01.003.
[6] M. Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, Nucleic Acids Res. 31 (2003) 3406-3415. https://doi.org/10.1093/Nar/Gkg595.
[7] J.N. Zadeh, C.D. Steenberg, J.S. Bois, B.R. Wolfe, M.B. Pierce, A.R. Khan, R.M. Dirks, N.A. Pierce, NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems, J. Comput. Chem. 32 (2011) 170-173. https://doi.org/10.1002/jcc.21596.
[8] S. Amaya-González, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castañón, Aptamer binding to celiac disease-triggering hydrophobic proteins: A sensitive gluten detection approach, Anal. Chem. 86 (2014) 2733-2739. https://doi.org/10.1021/Ac404151n.
[9] R. Svigelj, N. Dossi, R. Toniolo, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, Selection of anti-gluten DNA aptamers in a deep eutectic solvent, Angew. Chem. Int. Ed. 57 (2018) 12850-12854. https://doi.org/10.1002/anie.201804860.
[10] R. Svigelj, N. Dossi, S. Pizzolato, R. Toniolo, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, Truncated aptamers as selective receptors in a gluten sensor supporting direct measurement in a deep eutectic solvent, Biosens. Bioelectron. 165 (2020) 112339. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112339.
[11] I. Jeddi, L. Saiz, Three-dimensional modeling of single stranded DNA hairpins for aptamer-based biosensors, Sci. Rep. 7 (2017) 1178. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01348-5.
[12] A. Díaz-Fernández, C.S. Ciudad, N. Díaz, D. Suárez, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, Refinement and truncation of DNA aptamers based on molecular dynamics simulations: Computational protocol and experimental validation, J. Chem. Inf. Model 65 (2025) 4128-4136. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5c00243.
[13] M. Popenda, M. Szachniuk, M. Antczak, K.J. Puzycka, P. Lukasiak, N. Bartol, J. Blazewicz, R.W. Adamiak, Automatd 3D structure composition for large RNAs, Nucleic Acids Res. 40 (2012) e112. https://doi.org/10.1093/nar/gks339.
[14] R. Salomon-Ferrer, D.A. Case, R.C. Walker, An overview of the Amber biomolecular simulation package, WIREs Comput. Mol. Sci. 3 (2013) 198-210. https://doi.org/10.1002/wcms.1121.
[15] I. Ivani, P.D. Dans, A. Noy, A. Pérez, I. Faustino, A. Hospital, J. Walther, P. Andrio, R. Goñi, A. Balaceanu, G. Portella, F. Battistini, J.L. Gelpí, C. González, M. Vendruscolo, C.A. Laughton, S.A. Harris, D.A. Case, M. Orozco, Parmbsc1: A refined forcé field for DNA simulations, Nature Meth. 13 (2016) 55-58. https://doi.org/10.1038/nmeth.3658.
[16] Y. Miao, V.A. Feher, J.A. McCammon, Gaussian accelerated molecular dynamics: Unconstrained enhanced sampling and free energy calculation, J. Chem. Theory Comput. 11 (2015) 3584-3595. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00436.
[17] B. Waybrant, T.R. Pearce, E. Kokkoli, Effect of polyethylene glycol, alkyl, and oligonucleotide spacers on the binding, secondary structure, and self-assembly of fractalkine binding FKN-S2 aptamer-amphiphiles, Langmuir 30 (2014) 7465-7474. https://doi.org/10.1021/la500403v.
[18] N. Savory, K. Abe, K. Sode, K. Ikebukuro, Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing, Biosens. Bioelectron. 26 (2010) 1386-1391. https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.057.
[19] A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, E. Fernández Rodríguez, M.J. Lobo-Castañón, Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer, Biosens. Bioelectron. 128 (2019) 83-90. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.040.
[20] R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, J.R. de-los-Toyos, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, Aptamers targeting a tumor-associated ECM component: the human mature collagen XIα1, Anal. Chim. Acta 1189 (2022) 339206. https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339206.