

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Anclaje de balizas moleculares a soportes sólidos mediante química click. Aplicación a la detección de microRNAs asociados a cáncer y estudio de prestaciones.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: NAZARET PEÑA GIL

TUTORA: MARÍA JOSÉ BAÑULS POLO

CODIRECTOR: DANIEL GONZÁLEZ-LUCAS

Curso Académico: 2017-2018

VALENCIA, 18 de junio de 2018

Reserva de todos los derechos

Anclaje de balizas moleculares a soportes sólidos mediante química click. Aplicación a la detección de microRNAs asociados a cáncer y estudio de prestaciones.

Resumen

Este trabajo se ha realizado en el marco del proyecto europeo SAPHELY (H2020-ICT-644242), que pretende desarrollar un dispositivo de tipo “*point-of-care*” (POC) que permita un diagnóstico temprano de diferentes enfermedades mediante la detección ultrasensible de microRNA (miRNA). En este caso se quiere detectar miRNA-155, marcador de cáncer de colon y de mama. El sistema está basado en un sensor nanofotónico de guías de onda de SOI (*silicon on insulator*), en las que los cambios en la señal óptica transmitida están relacionados con la masa que se sitúa en la superficie. Para garantizar la especificidad se emplean *molecular beacons* (MB), que cambian de conformación al hibridar con la cadena complementaria. Estos MBs están acoplados a nanopartículas (NPs) con alto índice de refracción, por lo que el cambio en la señal óptica registrado es mayor.

Así se plantea estudiar y caracterizar el anclaje de MBs a un soporte sólido y conocer su respuesta frente a la hibridación con su cadena complementaria cuando tienen acopladas o no NPs. Con este objetivo se realizan ensayos en formato *microarray* y en la microbalanza de cristal cuarzo (QCM). La inmovilización covalente de MBs sobre la superficie es llevada a cabo mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno, que es regioselectiva, biocompatible y con alto rendimiento.

Los materiales empleados (vidrio en formato *microarray* y óxido de silicio en chips de la QCM) permiten trasladar fácilmente los resultados obtenidos al sistema nanofotónico.

Los estudios llevados a cabo en este TFG demuestran que los cambios conformacionales en los MBs anclados dependen en gran medida de si el MB está unido a una NP, a una proteína, o libre, y que no presentan el comportamiento que inicialmente se esperaba en ellos. Por otro lado, los desarrollos realizados en formato *microarray* han permitido corroborar la correcta inmovilización de los MBs y su capacidad para hibridar una vez anclados.

Palabras clave: *microarray*, QCM, *molecular beacons*, acoplamiento tiol-eno, foto-click-chemistry, derivatización de superficies, miRNA, hibridación.

Molecular beacons attachment to solid supports by click-chemistry. Application to cancer microRNA detection and performance analysis.

Abstract

This work has been carried out within the framework of the European project SAPHELY (H2020-ICT-644242) which aims to develop a point of care device (POC) that allows early diagnosis of different diseases through ultrasensitive detection of microRNA (miRNA). In this case, it is aimed to detect miRNA-155, marker of colon and breast cancer. The system is based on a nanophotonic sensor with waveguides made out of SOI (silicon on insulator), on which the changes in optical signal is related to the mass that is present on the surface. So as to ensure the specificity molecular beacons (MB) are employed, that change their conformation when hybridizing with their complementary chain. These MBs are coupled with nanoparticles (NPs) with high refraction index, so the change in optical signal is higher.

Thus, it is raised the study and characterization of the attachment of MBs to a solid support and their response to hybridization with their complementary chain when whether they have NPs coupled to them. With this goal, essays in microarray format and quartz crystal microbalance (QCM) are performed. The covalent immobilization of MBs in the surface is carried out by means of thiol-ene coupling (TEC) reaction, which is regioselective, biocompatible and high yield reaction.

The materials employed (glass in microarray format and silicon oxide in QCM) allow an easy translation of the results to the nanophotonic system.

The studies carried out in this TFG demonstrate that the conformational changes that the attached MBs greatly depend on whether the MBs is coupled with a NP, protein or free, and that they do not present the behaviour that initially was expected. On the other hand, the developments performed in microarray format have allowed to corroborate the correct immobilization of the MBs and their capacity to hybridize once there are attached.

Key words: microarray, QCM, molecular beacons, thiol-ene coupling, photo-click-chemistry, surface derivatization, microRNA, hybridization

Alumna: Nazaret Peña Gil

Valencia, junio 2018

Tutor: María José Bañuls Polo

Codirector: Daniel González-Lucas

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi tutora **María José Bañuls** por ofrecerme la posibilidad de llevar a cabo este trabajo con el que tanto he aprendido, y por su dedicación y preocupación por mí durante todo este tiempo.

Agradecer a **Dani** todo su apoyo y ayuda en el laboratorio, sin el cual este trabajo no habría sido posible. Gracias por intentar transmitirme todos tus conocimientos y tener tanta paciencia conmigo. Y por supuesto a mis compañeros de laboratorio por hacer todo este tiempo mucho más ameno.

Como no, a mi **familia y amigos**, por estar siempre ahí y ayudarme en todo lo que he necesitado.

A **Rubén**, por todo su cariño y comprensión.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CÁNCER Y MIRNA	1
1.2 DETECCIÓN	3
1.2.1 <i>Microarray</i>: características generales	3
1.2.2 QCM: características generales	3
1.2.3 Factores a considerar en la puesta a punto de un ensayo	5
1.2.3.1 Elección del material de soporte.....	5
1.2.3.2 Elección de la sonda.....	5
1.2.3.3 Método inmovilización.....	6
1.2.3.3.1 Inmovilización covalente fotoinducida: acoplamiento tiol-eno.....	8
1.2.3.4 Detección.....	9
1.2.3.4.1 Con marcaje.....	10
1.2.3.4.2. Sin marcaje.....	10
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 REACTIVOS	13
3.2 INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE	13
3.3 MÉTODOS	14
3.3.1 Funcionalización de la superficie y preparación de reactivos	14
3.3.1.1 Funcionalización de chips de vidrio y QCM.....	14
3.3.1.2 Funcionalización de nanopartículas.....	14
3.3.1.3 Acoplamiento covalente entre nanopartículas y <i>molecular beacons</i>	15
3.3.2 Inmovilización covalente de sondas	16
3.3.2.1 Inmovilización covalente sobre chips de vidrio.....	16
3.3.2.2 Inmovilización covalente sobre chips de QCM.....	16
3.3.3 Ensayos de reconocimiento	17
3.3.3.1 Ensayos de reconocimiento con estreptavidina.....	17
3.3.3.2 Hibridación con sonda complementaria en chips de vidrio.....	17
3.3.3.3 Hibridación de sonda complementaria en chips de QCM.....	17
3.3.3.4 Hibridación de sonda complementaria en disolución con MB-NP.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1 FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES Y CARACTERIZACIÓN	18

4.2 OPTIMIZACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE MB PARA FORMATO <i>MICROARRAY</i> Y QCM.....	18
4.2.1 Tiempo de irradiación.....	19
4.2.2 Longitud de onda de irradiación.....	20
4.3 ENSAYOS EN FORMATO <i>MICROARRAY</i>.....	21
4.3.1. Ensayo de inmovilización con MB marcados fluorescentemente.....	21
4.3.2 Ensayos de especificidad en la hibridación y optimización del tampón de hibridación.....	22
4.3.3 Determinación del rendimiento de hibridación.....	23
4.3.4 Ensayo de reconocimiento de sondas biotiniladas empleando estreptavidina.....	25
4.4 ENSAYOS CON QCM.....	27
4.4.1. Estudios de hibridación con MB biotinilados.....	27
4.4.2. Estudios de hibridación con MB unidos a nanopartículas.....	29
4.4.2.1 Funcionalización de nanopartículas.....	29
4.4.2.2. Acoplamiento covalente de NPs con MB.....	31
4.4.2.3 Ensayo de hibridación en QCM de MB conjugados a NPs.....	34
5. CONCLUSIÓN.....	37
6. BIBLIOGRAFÍA.....	38
7. ANEXO.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Representación gráfica de los 10 tipos de cáncer que más muertes causan en el mundo.....	1
Figura 2. Imagen de un <i>microarray</i>	3
Figura 3. Esquema del efecto piezoeléctrico.....	4
Figura 4. Imagen de un chip de QCM.	4
Figura 5. Cambio conformacional del MB tras la hibridación con una secuenciacomplementaria.....	6
Figura 6. Tipos de impresiones de muestras sobre chips para la fabricación de un <i>microarray</i>	6
Figura 7. Representación de la inaccesibilidad de las sondas ancladas para hibridar con la secuencia complementaria.....	7
Figura 8. Técnicas de inmovilización de sondas sobre superficies.....	7
Figura 9. Acoplamiento tiol-eno.....	9
Figura 10. Estructura rutilo de TiO ₂	11

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 11. Estructura química de trietoxivinilsilano y superficie funcionalizada con grupos vinilo.....	14
Figura 12. Pasos simplificados seguidos en el acoplamiento de NP-MB.	16

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 13. Funcionalización de superficies con organosilano.....	18
Figura 14. Experimento de optimización de tiempo de irradiación de MB.....	19
Figura 15. Valores de fluorescencia tras irradiar frente a diferentes concentraciones de MB y recta de calibrado de MB.....	21
Figura 16. Valores de fluorescencia tras lavar frente a diferentes concentraciones de MB y valores de densidades de inmovilización frente a diferentes concentraciones de MB.....	22
Figura 17. Experimento de optimización de concentración de tampón y especificidad de MB.....	23

Figura 18. Valores de fluorescencia frente a diferentes concentraciones de la sonda complementaria.....	24
Figura 19. Valores de fluorescencia frente a diferentes concentraciones de la sonda complementaria correspondientes a la zona lineal.....	24
Figura 20. Valores de fluorescencia frente a densidad de inmovilización de sonda complementaria en la zona lineal.....	24
Figura 21. Experimento de reconocimiento específico de estreptavidina marcada.....	25
Figura 22. Experimento de hibridación de sonda complementaria con MB unido a estreptavidina.....	6
Figura 23. Pasos seguidos en el experimento de QCM en el que se fluye sonda complementaria y estreptavidina.....	27
Figura 24. Valores de masa que se adhiere al chip de QCM frente a tiempo.....	8
Figura 25. Pasos seguidos en la funcionalización de las NPs con DHBA.....	30
Figura 26. Espectro de infrarrojo de NP funcionalizadas con DHBA y sin funcionalizar.....	30
Figura 27. Pasos seguidos en el acoplamiento de NP-MB.	31
Figura 28. Absorbancias de las soluciones que contienen NP y MB a diferentes tiempos tras el acoplamiento EDC/NHS.....	31
Figura 29. Experimento de especificidad de sonda complementaria con NP-MB.....	34
Figura 30. Pasos seguidos en el experimento de QCM en el que se realizan ciclos de hibridación con sonda complementaria y deshibridación.....	35
Figura 31. Valores de masa que se adhiere al chip de QCM frente a tiempo.....	35
4. ANEXO	
Figura anexo 1. Corte transversal de chip de QCM obtenida por FIB.....	41
Figura anexo 2. Valores de disipación frente al tiempo al fluir la sonda complementaria y estreptavidina.	41

ÍNDICE DE TABLAS

1. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados con sus respectivas secuencias y modificaciones.....13

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2. Experimento de optimización de tiempo de irradiación.....20

Tabla 3. Valores de fluorescencia de diferentes MB frente a concentración de SSC.....23

Tabla 4. Valores de fluorescencia tras la hibridación con sonda complementaria cuando hay o no estreptavidina unida al MB.....26

Tabla 5. Valores de fluorescencia de sobrenadantes y complejo NP-MB tras el acoplamiento.....32

Tabla 6. Valores de fluorescencia de sobrenadantes, controles y complejo NP-MB o NPs tras incubar con sonda complementaria.....32

3. ANEXO

Tabla anexo 1. Modificaciones del ADN y sus respectivas modificaciones de la superficie.....41

ABREVIATURAS

CCD	Dispositivo de carga acoplada
cDNA	ADN complementario
DHBA	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico
DPI	Interferometría de polarización dual
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
FIB	<i>Focused ion beam</i>
LFS	Lector de fluorescencia de superficies
MB	<i>Molecular beacon</i>
miRNA	microRNA
mRNA	ARN mensajero
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanesulfónico
NHS	N-hidroxisuccinimida
NPs	Nanopartículas
PBS-T	Tampón fosfato salino
POC	<i>Point of care</i>
QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo
SOI	<i>Silicon on insulator</i>
SPR	Resonancia de plasmón superficial
SSC	Tampón citrato sódico salino
TEC	Acoplamiento tiol-eno
UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer y microRNA

Los microRNA (miRNA) son pequeños RNA no codificantes que tienen entre 18 y 24 nucleótidos. Juegan un papel muy importante en diversos procesos biológicos ya que modulan la expresión de al menos el 60% de los genes humanos y están involucrados en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Seven *et al*, 2014). Sin embargo, una desregulación de estos puede llegar a causar anomalías cromosómicas, cambios en la transcripción, cambios epigenéticos y defectos en la maquinaria de biogénesis de miRNA. Estos cambios están relacionados con diversas enfermedades, entre las que se encuentra el cáncer, ya que también regulan la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores (Reddy *et al*, 2015).

El cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo a pesar de los grandes avances conseguidos en su detección y diagnóstico (Zhang *et al*, 2007). Entre los tipos de cáncer más comunes, se encuentran el cáncer de colon y de mama. En la figura 1, puede observarse que la organización mundial de la salud estimó que, en 2012, del total de muertes debidas al cáncer en todo el mundo, un 8,5% eran debidas al cáncer de colon (693933), y un 6,4% al cáncer de mama (521907). Estos números aumentan más todavía si se tienen en cuenta únicamente a las mujeres, en las que el cáncer de mama es la principal causa de muerte de mujeres que padecen algún tipo de cáncer, seguida del cáncer de pulmón y de colon (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

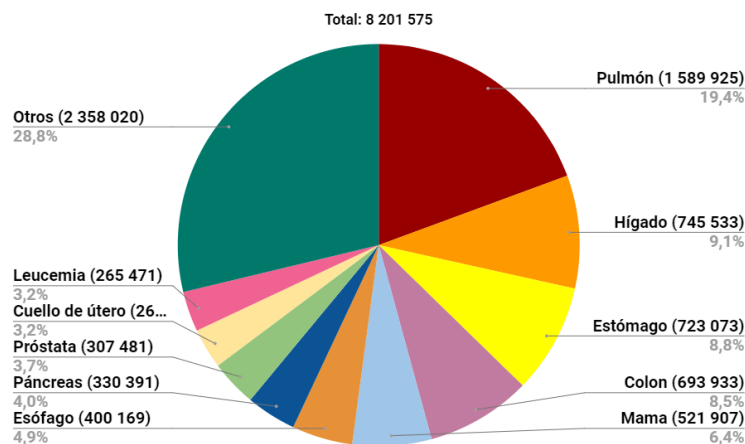


Figura 1. Representación de los 10 tipos de cáncer que más muertes causan en el mundo en hombres y mujeres según la estimación de la organización mundial de la salud en 2012.

Diversos estudios han demostrado que miRNA-155 se encuentra sobreexpresado en personas que padecen cáncer de mama (Hui *et al*), (Yan *et al*). El alto nivel de expresión de este miRNA, a diferencia de otros 29 cuyos niveles de expresión están reprimidos en personas que sufren este cáncer, indica que miRNA-155 tiene un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama (Liu *et al*, 2015). De igual modo, este miRNA también se encuentra sobreexpresado en personas que padecen cáncer de colon (Al-Haidari *et al*, 2018).

Los miRNA actúan uniéndose a ARN mensajeros (mRNA) específicos, lo que causa su degradación. De este modo, miRNA 155 se une a mRNA de los genes SOCS1, FOXO3a y RhoA entre otros (Higgs y

Slack, 2013), (Jing Liu *et al*, 2015). Entre las principales funciones de estos genes se encuentran la regulación negativa de la inflamación, regulación de apoptosis, proliferación, migración y diferenciación celular. Diversos estudios muestran que estos genes se encuentran reprimidos en personas que padecen cáncer de mama y colon, habiendo por tanto una relación en el aumento de expresión de miRNA-155 y disminución de SOCS1, FOXO3a y RhoA.

Puesto que miRNA-155 juega un papel crucial en la expresión de estos y otros genes cuya represión está relacionada con el avance del cáncer de colon y de mama, se hace necesario desarrollar un dispositivo que permita detectar este miRNA de manera temprana, lo que aumenta las probabilidades de ofrecer un tratamiento satisfactorio (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2018).

En este contexto se desarrolla el trabajo a realizar en el proyecto europeo SAPHELY (*Self-amplified photonic biosensing platform for microRNA-based early diagnosis of diseases*), financiado por Horizon 2020. SAPHELY, dentro del cual se enmarca este TFG, tiene como objetivo el desarrollo de un dispositivo de tipo *point of care* (POC), compacto, rápido, *label-free*, mínimamente invasivo y de bajo precio basado en la tecnología nanofotónica para su aplicación en diagnóstico temprano de diferentes enfermedades mediante la detección ultrasensible de miRNA.

El método de detección se basa en un sensor nanofotónico de guías de onda fabricadas con SOI (*silicon on insulator*). Los cambios en la señal óptica transmitida por la guía de ondas están relacionados con la masa que se sitúa en la superficie, donde la especificidad viene dada por el empleo de biorreceptores específicos, en nuestro caso *molecular beacons* (MB) que serán explicados posteriormente. En el proyecto, los MBs tienen nanopartículas (NPs) de alto índice de refracción ancladas. Tras la hibridación con el miRNA complementario, los MBs sufren cambios conformacionales que alejan a la NP de la superficie amplificando el cambio en la señal óptica. Los MBs son inmovilizados sobre superficies previamente funcionalizadas con grupos alqueno de un modo covalente gracias a la reacción de acoplamiento tiol-eno (TEC), que también se explicará en detalle más adelante.

Así, uno de los objetivos de SAPHELY es la inmovilización efectiva de los MBs sobre la superficie del sensor y el estudio de los cambios conformacionales producidos tras la hibridación. por ello, en este trabajo se plantea el uso de dos metodologías diferentes y complementarias: *microarrays* para estudiar y caracterizar el anclaje de los MBs sobre la superficie y el uso de microbalanza de cuarzo (QCM) para estudiar el comportamiento del MB, con y sin NPs tras la hibridación.

En la tecnología de *microarrays* las sondas utilizadas están marcadas con fluoróforos, y puesto que se trabaja en vidrio, es fácil transferir la metodología optimizada al óxido de silicio que compone los chips de QCM. En el caso de la QCM, no se requiere marcaje y los chips están recubiertos del mismo material que las guías de onda, por lo que también es fácil trasladar los resultados al sistema nanofotónico de SAPHELY.

1.2 Detección de miRNA

1.2.1 *Microarrays*

Los *microarrays* consisten en la inmovilización adecuada de moléculas sobre un soporte sólido, siendo estas ADN, ARN, proteínas u otros. El formato de matriz permite realizar múltiples análisis a la vez en un espacio reducido, disminuyendo así el tiempo empleado, reactivos y materiales. Tras ello, el *microarray* se incuba con una disolución del analito de interés. Si en esta se encuentran moléculas que interaccionan con las previamente ancladas, esta interacción es posteriormente detectada de un modo u otro en función del marcaje de la muestra (López *et al*, 2002).

Se pueden encontrar múltiples tipos de *microarrays* en función del tipo de molécula que es anclada sobre la superficie de los chips, siendo los más comunes aquellos de ADN y de proteínas. Entre las principales aplicaciones de los *microarrays* de ADN se encuentran análisis de expresión genética, de mutaciones y de diagnóstico. Puesto que la expresión de ARN mensajero y de proteínas no están necesariamente relacionadas debido a las modificaciones postraduccionales que sufren estas últimas, surgió la necesidad del desarrollo de *microarrays* de proteínas. Estos permiten obtener información de las funciones de las proteínas, estudiar interacciones entre proteínas o entre proteínas con otras moléculas y facilitar y acelerar el descubrimiento de fármacos y dianas terapéuticas (Templin *et al*, 2002).

La técnica de *microarray* presenta grandes ventajas frente a otras técnicas, ya que requiere poca cantidad de muestra y los experimentos se pueden miniaturizar, a diferencia de otros métodos tradicionales como ELISA. Gracias a la miniaturización se pueden estudiar miles de muestras en paralelo, lo que le dota de una alta capacidad de trabajo (Figura 2) (Weinrich *et al*, 2009).

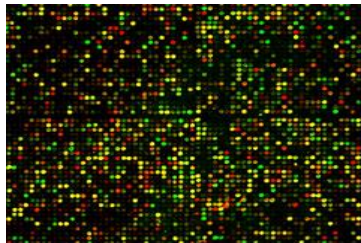


Figura 2. Imagen de un *microarray*.

Como se ha dicho anteriormente, en los *microarrays* se pretende caracterizar y optimizar el anclaje de los MBs sobre la superficie conociendo los parámetros óptimos para una correcta inmovilización. Además, también se estudia la hibridación, el reconocimiento entre proteínas, y se determina si este reconocimiento inhibe la hibridación o el comportamiento normal de los MBs en superficie.

1.2.2 Microbalanza de cristal de cuarzo

Por otro lado, la QCM es un dispositivo, basado en el efecto piezoeléctrico, desarrollado por Jacques y Pierre Curie en el siglo XIX. El efecto piezoeléctrico consiste en la generación de un dipolo eléctrico cuando un material determinado es comprimido mecánicamente. Sin embargo, este fenómeno

también puede ser invertido, ya que el material puede deformarse mecánicamente tras la aplicación de un voltaje (Figura 3). De este modo, cuando se aplica un voltaje alterno tiene lugar una oscilación mecánica sobre el cristal. La frecuencia de estas oscilaciones es medida en tiempo real por la QCM (Pohanka, 2017).

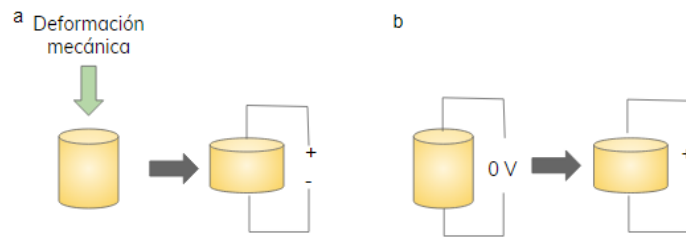


Figura 3. Efecto piezoeléctrico cuando a) el voltaje es generado debido a una deformación mecánica b) la deformación mecánica es causada por la aplicación de voltaje

Así, la hibridación de la sonda que está inmovilizada en la superficie del chip con una secuencia complementaria causa la variación de la frecuencia de oscilación del cristal, que cambia proporcionalmente con la masa que se ha unido sobre el chip. La variación de frecuencia medida por la QCM se relaciona con la masa que interacciona con la superficie del chip gracias a la ecuación de Sauerbrey (ecuación 1).

$$\Delta f = C_f \cdot \Delta m \quad (1)$$

En ella, Δf es el cambio de frecuencia (Hz), C_f es el factor de sensibilidad del cristal de cuarzo empleado, y Δm es el cambio de masa por unidad de área (Bragazzi *et al*, 2015).

Los materiales que tienen propiedades piezoeléctricas son aquellos que no tienen centro de simetría, entre los que se pueden destacar el cristal de cuarzo, sal de Rochelle, cristales de topacio y turmalina y titanato de bario entre otros (Pohanka *et al*, 2017). Los chips que se emplean en este caso están compuestos de cristal de cuarzo con electrodos de oro (Figura 4). El cuarzo es uno de los materiales más usados en los biosensores debido a su fiabilidad y buena disponibilidad. En el caso de los chips utilizados en el presente estudio, la superficie está cubierta de óxido de silicio, en el cual se puede llevar a cabo la química del tiol-eno. La figura anexo 1 presenta un corte transversal de un chip de QCM empleado en este trabajo, obtenida por FIB (*focused ion beam*).



Figura 4. Chip empleado en los experimentos de QCM.

En este trabajo se emplea una QCM que monitoriza la disipación, por lo que también se obtiene información acerca de las propiedades viscoelásticas de las moléculas que se sitúan sobre el chip, y que podrían ayudar al estudio de los cambios conformacionales producidos tras la hibridación.

Las medidas se realizan en tiempo real sin necesidad de marcar las sondas a diferencia de los *microarrays* (Bragazzi *et al*, 2015). Permite detectar cambios en masa del orden de nanogramos, y además los cristales son reutilizables (Campás y Katakis, 2004). Gracias a la QCM se puede estudiar el

comportamiento de los MBs al inmovilizar NPs en uno de los extremos, así como estudiar las diferencias en la hibridación entre MBs con y sin NPs. Así se realiza el estudio y la optimización del proceso de hibridación de MBs con NPS para su posible aplicación en biosensado.

1.2.3 Factores a considerar en la puesta a punto de un ensayo

1.2.3.1 Elección de material de soporte

El material del soporte empleado en los ensayos es de gran importancia, ya que influirá en el resultado final del experimento. Esto es así ya que la estructura física, la arquitectura de la superficie, la hidrofilia, hidrofobicidad y el control de espacio entre sondas influyen en el rendimiento de los *microarrays*, estando estas características determinadas por las propiedades de la superficie del soporte (Jin *et al*, 2006).

Diversos materiales como vidrio, plástico y membranas de nylon son algunos de los más utilizados en la fabricación de *microarrays* (López *et al*, 2002). De entre todos ellos, el vidrio es el material más empleado por su bajo coste, resistencia química contra disolventes, estabilidad mecánica y baja fluorescencia intrínseca (Jin *et al*, 2006).

En cuanto a los materiales empleados en los chips de QCM, en el mercado se pueden encontrar chips de cuarzo cubiertos con aluminio, cobalto, oro o dióxido de silicio entre muchos otros (BIOLINSIENTIFIC, 2018). En función de la aplicación deseada, se emplea uno u otro.

Los materiales escogidos en el presente trabajo son vidrio en el caso de *microarrays* y óxido de silicio en los chips de QCM, ya que satisfacen las características deseadas puesto que ambos pueden ser funcionalizados con grupos vinilo, permitiendo de este modo el anclaje de los MBs tiolados. Por otro lado, se facilita el traslado de las técnicas y resultados obtenidos al futuro sensor nanofotónico con guías de onda cuya superficie está compuesta de óxido de silicio.

1.2.3.2 Elección de la sonda

Una vez se ha determinado el tipo de soporte que será empleado en los ensayos, se debe decidir el tipo de sonda. En primer lugar, la sonda escogida debe ser específica, es decir, debe ser capaz de distinguir secuencias con un alto grado de similitud. Por ello, se deben evitar sondas que sean ambiguas (interaccionen con varias secuencias diferentes) (Liu *et al*, 2007).

Si se trata de *microarrays* de ADN, se pueden emplear oligonucleótidos o fragmentos de ADN complementario (cDNA) como sondas. El uso de los oligonucleótidos es más común debido a que suelen presentar mayor especificidad que los cDNA, evitando el problema descrito anteriormente. Las sondas pueden ser diseñadas y sintetizadas por casas comerciales con una alta pureza e incluyendo un amplio abanico de marcajes y/o modificaciones.

Por otra parte, cuando se trabaja con *microarrays* de proteínas se pueden inmovilizar sobre la superficie antígenos, anticuerpos, proteínas, o aptámeros entre otros (Templin *et al*, 2002).

Puesto que en el presente proyecto se pretende detectar miRNA, la sonda escogida para su inmovilización en un chip fotónico es un oligonucleótido, en concreto MBs. Los MBs son

oligonucleótidos de cadena simple con estructura de horquilla gracias a la complementariedad de las bases en ambos extremos de la secuencia, que sufren un cambio conformacional al hibridar con una secuencia complementaria al formar la doble hélice de ADN (Epstein *et al*, 2002). La manera más común de explotación de MBs es la incorporación de un fluoróforo y un *quencher* en cada uno de los extremos, por lo que cuando se encuentra en estructura de horquilla (cadena simple) no se observa fluorescencia. Tras unirse con la secuencia complementaria, los extremos se separan y por tanto se restaura la fluorescencia (Figura 5) (Tyagi y Kramer, 2012).

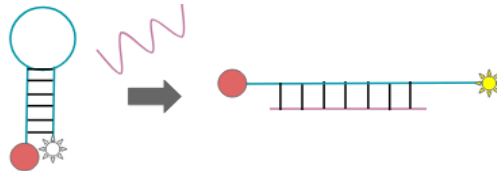


Figura 5. Generación de señal del MB. En estructura de horquilla, debido a la proximidad del *quencher* y el fluoróforo no se genera señal. Tras la hibridación con la sonda complementaria, el MB cambia de conformación, alejando el *quencher* y el fluoróforo, generando de este modo señal fluorescente.

Los MB empleados en este estudio presentan un grupo tiol en un extremo en lugar de *quencher* o fluoróforo, además de grupos $-NH_2$ o biotina cerca del otro extremo. Los grupos $-NH_2$ son empleados en el acoplamiento covalente de los MB con NPs, mientras que la biotina en ensayos de reconocimiento con estreptavidina, para examinar las posibles mejoras que se pueden obtener en la detección de miRNA-155 cuando tiene lugar la separación de la superficie de la molécula acoplada al MB tras la hibridación por la apertura de la horquilla. El grupo tiol es necesario para permitir la inmovilización de la sonda sobre el soporte.

1.2.3.3 Método de inmovilización

Un aspecto importante en el diseño de los *microarrays* en cuanto a la inmovilización de la sonda es el modo en el que se realiza. Para ello, las sondas se pueden depositar sobre la superficie o se pueden sintetizar *in situ*.

A la hora de depositar las sondas previamente sintetizadas, se puede realizar una impresión con contacto (Figura 6a) o sin contacto (Figura 6b) gracias a un dispensador automático. En cuanto a los primeros, una aguja transfiere una pequeña cantidad de la solución que contiene la muestra, siendo liberada cuando el extremo de la aguja toca la superficie del chip mientras que en el caso de los segundos se pueden utilizar inyectores piezoeléctricos o jeringas solenoides (López *et al*, 2002).

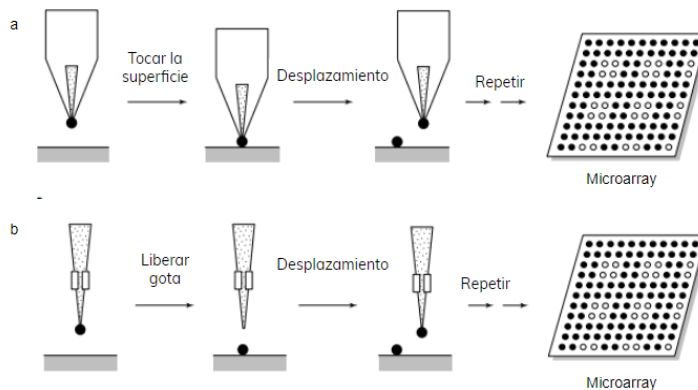


Figura 6. Tipos de impresiones de muestras sobre chips para la fabricación de un *microarray*: a) con contacto, b) sin contacto (Schna *et al*, 1998).

Por último, la síntesis *in situ* mediante fotolitografía consiste en la formación de oligonucleótidos gracias a la adición de nucleótidos sobre el propio chip.

En este trabajo, las sondas con sus respectivas modificaciones son comerciales y se depositan mediante una impresión sin contacto.

Por otra parte, se debe tener en cuenta el método de inmovilización escogido, ya que determinará el éxito del experimento. Uno de los factores que se deben considerar a la hora de anclar sondas a la superficie es que la inmovilización debe ser estable a lo largo del ensayo, se deben alcanzar densidades de inmovilización altas sin alcanzar la saturación de manera que se bloquee la hibridación por impedimentos estéricos, y además las sondas deben ser funcionales después del anclaje, estando ancladas con la orientación y configuración apropiadas para el biorreconocimiento (Campás y Katakis, 2004)(Escorihuela *et al*, 2014).

El objetivo principal es obtener el máximo número de sondas, espaciadas en la superficie a una distancia tal que permita una gran eficiencia de hibridación. Si la distancia entre las sondas no es lo suficientemente grande, estas no podrán participar en la hibridación ya que no son accesibles (Figura 7) (Dufva, 2005).

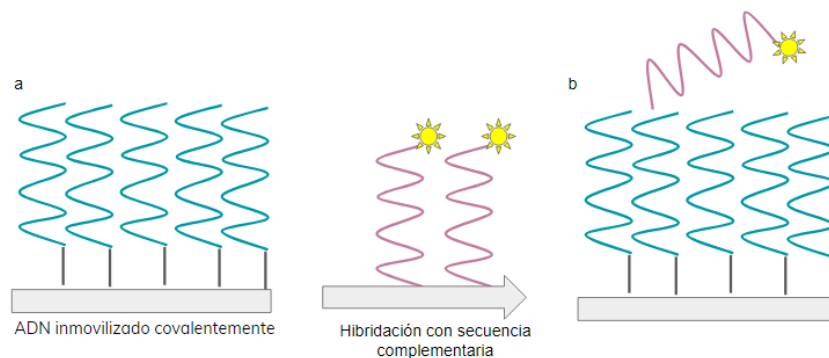


Figura 7. Representación de la inaccesibilidad a las sondas ancladas sobre la superficie para hibridar con la secuencia complementaria debido a la proximidad entre las sondas (Dufva, 2005).

Las diferentes formas de inmovilización se basan en tres mecanismos principales: adsorción física, unión covalente e inmovilización mediada por bioafinidad. La adsorción física se produce a través de una interacción entre cargas o fuerzas de Van der Waals, la unión covalente mediante unión química, y la inmovilización mediante bioafinidad se basa en la interacción específica entre dos moléculas, como biotina y estreptavidina, representados en la figura 8.

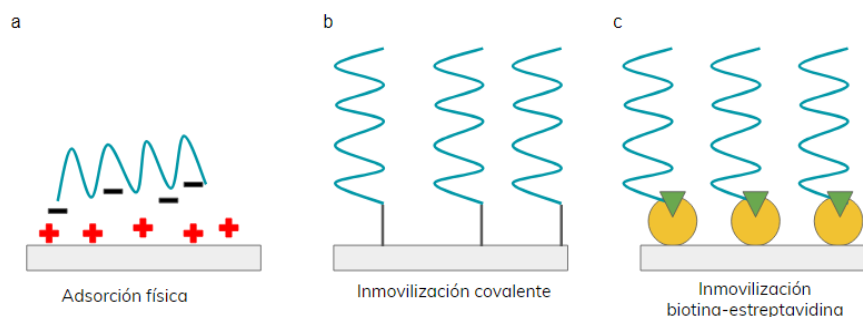


Figura 8. Técnicas de inmovilización de sondas sobre superficie mediante a) adsorción física, b) enlaces covalentes, c) bioafinidad empleando biotina y estreptavidina (Dufva, 2005).

La adsorción física no requiere modificación del ADN y se basa en interacciones iónicas entre los grupos cargados negativamente del ADN y la carga positiva encontrada en la superficie. Es una técnica muy sencilla cuya principal desventaja que presenta este mecanismo es que la orientación de las sondas es heterogénea y que el anclaje del ADN a la superficie es débil. Debido a esta última desventaja, las sondas podrían ser eliminadas al emplear algunos tampones o detergentes (Nimse *et al*, 2014). Además, el acceso a las sondas puede ser bajo debido a su orientación aleatoria, dando lugar a bajos rendimientos en la hibridación (Campás y Katakis, 2004).

Por otra parte, la inmovilización mediante anclaje covalente requiere la modificación química de la superficie para obtener grupos funcionales y de este modo conseguir una inmovilización homogénea sobre la superficie. También es necesario introducir grupos funcionales en el ADN que será inmovilizado. Debido a ello, la orientación de las sondas inmovilizadas no es al azar y es muy estable. En este tipo de inmovilización, la accesibilidad de las sondas es alta, lo que permite mayores rendimientos en la hibridación.

Por último, la interacción entre biotina y estreptavidina es ampliamente usada debido a la gran afinidad existente entre ambas, pudiendo emplearse para inmovilizar ADN a una superficie. Para ello, el ADN es biotinilado mientras que la estreptavidina se encuentra previamente inmovilizada en la superficie del chip. Es por ello que la orientación de las sondas ancladas a la superficie está controlada. (Campás y Katakis, 2004).

El método de inmovilización seleccionado en los experimentos llevados a cabo en chips de vidrio y de QCM es la inmovilización covalente, ya que permite conseguir una distribución homogénea y ordenada de las moléculas sobre la superficie, además de tener en cuenta la experiencia previa del grupo en el que se desarrolló el trabajo, donde se tiene amplia experiencia en el diseño e implementación de formas anclaje covalente aplicadas a formato *microarray*.

El ADN puede ser modificado con diferentes grupos funcionales o moléculas, requiriendo de este modo la superficie una modificación determinada. Algunas de las modificaciones del ADN y sus respectivas modificaciones de la superficie necesarias para una correcta inmovilización se recogen en la tabla anexo 2 del anexo.

1.2.3.3.1 Inmovilización covalente fotoinducida: acoplamiento tiol-eno

Para llevar a cabo la inmovilización covalente de los MBs se ha optado por utilizar la reacción TEC, una reacción fotoinducida (figura 9) que consiste en la adición de tioles a grupos vinilo para formar enlaces tioéter inducido por luz. La fotoinmovilización permite anclar covalentemente moléculas orgánicas sobre un chip al generar radicales de tiol que son muy reactivos frente a grupos alqueno (Ito, 2006).

El acoplamiento tiol-eno puede categorizarse dentro del grupo de reacciones conocido como *click chemistry*, las cuales están caracterizadas por ofrecer altos rendimientos, ser regioselectivas, no estar afectadas por oxígeno o agua y además las condiciones de la reacción son biocompatibles (Hoyle y Bowman, 2010).

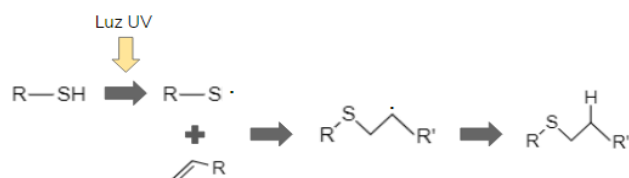


Figura 9. Acoplamiento tiol-eno. Se forma un radical del grupo tiol tras ser irradiado con luz UV, el cual reacciona con el grupo alqueno, generando un enlace tioéter (Weinrich *et al*, 2009).

Para llevarlo a cabo la superficie debe estar previamente funcionalizada con grupos vinilo mientras que los MBs presentan un grupo tiol terminal. Tras la deposición del MB sobre la superficie tiene lugar la inmovilización covalente por la irradiación con luz ultravioleta (UV). El anclaje se produce en una un sólo paso, obteniendo un buen rendimiento, reproducibilidad, altas densidades de inmovilización de oligonucleótidos sobre la superficie, y además no requiere el empleo de *crosslinkers* a diferencia de otras técnicas anteriores. Por otra parte, se minimizan las adsorciones inespecíficas por lo que también minimiza el uso de agentes de bloqueo en la superficie. El grupo de investigación en el que se desarrolla este TFG ha sido pionero en la utilización de este tipo de estrategias para obtener *microarrays* de altas prestaciones.

De este modo, las sondas estarán ancladas en la orientación correcta y con suficiente espacio entre ellas, de modo que pueden hibridar con sus secuencias complementarias, evitando el problema de inaccesibilidad explicado anteriormente.

1.2.3.4 Detección

Tras la elección de la superficie, la sonda que se va a emplear y el método de inmovilización se debe determinar el marcaje que será utilizado. La detección de la hibridación de un modo sensible y discriminatorio es esencial en cualquier ensayo, existiendo estrategias con y sin marcaje. Las estrategias en las que no es necesario marcar la muestra simplifican el análisis y preparación de la muestra. Sin embargo, el coste de la instrumentación al igual que los requerimientos operacionales son mayores. Ambas técnicas presentan ventajas e inconvenientes, por lo que, en función de las necesidades, se emplean unas u otras.

En este trabajo, se emplean sondas marcadas fluorescentemente al trabajar con *microarrays* permitiendo hacer multiplexado y analizar de manera rápida y sencilla gran cantidad de muestras. Al emplear la QCM no se usa marcaje, dando información en tiempo real acerca de los cambios conformacionales.

1.2.3.4.1 Con marcaje

En cuanto al *microarray*, la detección de la hibridación se realiza mediante la utilización de marcaje del analito de interés. Las técnicas más usadas son las ópticas, en las que se destacan el empleo enzimas y fluoróforos.

En cuanto al uso de enzimas, estas son ancladas a las moléculas de interés que interaccionarán con la sonda inmovilizada en la superficie. Esta técnica requiere el uso de cromógenos, moléculas que

sirven como sustrato del enzima, siendo el producto final de la reacción coloreado. Las enzimas más empleadas son la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina (Espina *et al*, 2004).

Por otra parte, se encuentran los fluoróforos. Las sondas fluorescentes son estables, fáciles de manipular y ofrecen buena sensibilidad y resolución. Lo más habitual en los sistemas de *microarrays* es utilizar las sondas complementarias marcadas con fluoróforos, siendo las cianinas Cy3 y Cy5 los más empleados. Tras la hibridación, la fluorescencia se mide con un escáner confocal o una cámara CCD (dispositivo de carga acoplada) (Epstein *et al*, 2002).

La fluorescencia es el método de detección escogido en el presente trabajo cuando se emplean *microarrays*, encontrando además la ventaja de la baja fluorescencia intrínseca encontrada en el vidrio que se utiliza como soporte generando altas relaciones señal/ruido. Los *microarrays* con sondas marcadas fluorescentemente son empleados como estrategia de optimización en el presente trabajo. Sin embargo, podría desarrollarse como dispositivo POC en el caso de emplear un marcaje colorimétrico.

1.2.3.4.2 Sin marcaje

Las técnicas de detección que no requieren marcaje presentan grandes ventajas ya que disminuyen el tiempo de análisis, suprimen algunos efectos indeseados como la inestabilidad del marcaje o la modificación de la actividad de la molécula marcada y además presentan menores límites de detección que los obtenidos cuando se emplea marcaje. Sin embargo, como se ha dicho anteriormente, presentan mayores costes y requerimientos operacionales.

Entre las técnicas que trabajan sin necesidad de marcaje más habituales se encuentran la espectrometría de masas, resonancia de plasmón superficial (SPR) y QCM, siendo esta última la empleada en el presente trabajo. En cuanto a la espectrometría de masas, esta permite la detección de moléculas gracias a su patrón de masas tras una digestión. SPR consiste en incidir luz sobre la superficie con un ángulo determinado y la posterior captura de la luz reflejada (Syahir *et al*, 2015).

Se destaca el uso de la QCM en la detección sin marcaje. La QCM, ya explicada anteriormente, estudia las interacciones que tienen lugar en la superficie del chip mediante la monitorización de los cambios en la frecuencia de oscilación, basado en el efecto piezoeléctrico del cristal de cuarzo (Syahir *et al*, 2015). Para aumentar la sensibilidad de esta técnica, se puede recurrir al acoplamiento de NPs para aumentar de este modo al aumentar la señal detectada (Ertekin *et al*, 2016), (Liu *et al*, 2007). El sistema NP-MB desarrollado en este trabajo puede ser empleado en fotocatalisis, equipos optoelectrónicos, sensores químicos y materiales dieléctricos entre otros (Hoang *et al*, 2007). También se pueden acoplar las NPs con oligonucleótidos con el objetivo de funcionar como nanodispositivos que podrían entrar en células y ejercer su función *in vivo* e *in situ* ya que son inocuas (Paunesku *et al*, 2003).

En el trabajo presentado, las NPs se acoplan a los MBs. Cuando estos hibridan con la sonda complementaria, sufren un cambio conformacional y alejan las NPs de la superficie, aumentando la señal obtenida en el detector. Es por ello que en este trabajo se pretende profundizar en el conocimiento de los procesos que ocurren durante la hibridación del MB con su sonda complementaria cuando forma un complejo con una NP en experimentos realizados en QCM que permite detectar la hibridación en tiempo real y sin necesidad de marcar la muestra.

Las NPs empleadas en el presente trabajo son de TiO_2 . Las NPs de TiO_2 pueden encontrarse en diferentes formas polimórficas, como amorfas, anatasa o rutilo en función de las condiciones de fabricación y tratamientos posteriores (Hoang *et al*, 2007), siendo la estructura rutilo la forma estructural más estable termodinámicamente (Figura 10) (Bak *et al*, 2011).

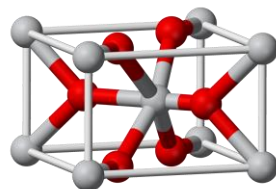


Figura 10. Estructura rutilo de TiO_2 .

Una de las principales características de dichas NPs son las imperfecciones que presentan en su superficie. Cuando las nanopartículas presentan tamaños menores a 50 nm, una gran parte de átomos Ti que constituyen la NP están localizados en la superficie, ajustando su coordinación de octaedro a pirámide de base cuadrada, lo que origina una compresión en el enlace Ti-O para acomodarse a la curvatura de la NP. Estas imperfecciones poseen una mayor reactividad y pueden unirse a algunas moléculas como derivados de benceno, ligandos enediol donadores de electrones y ácidos mercapto-carboxílicos.

En función del tamaño de las NPs, estas tendrán un número determinado de Ti^{2+} en su superficie, por los que se unen las moléculas a las NPs. El tamaño de las NPs empleadas es 2 ± 1 nm, por lo que el número de imperfecciones que contienen es pequeño. Debido a ello, cada NP contendrá únicamente una molécula o ninguna tras llevar a cabo la funcionalización. Este hecho es de gran importancia para poder conseguir un acoplamiento 1:1 con el MB y que así contengan una única NP. En función del número de imperfecciones que posean las NPs en su superficie, el número de MBs que tendrán acoplados será uno u otro. Serán estos complejos NP-MB los que serán inmovilizados en los chips de la QCM para estudiar la posible mejora de la señal obtenida tras la hibridación con la sonda complementaria (Jankovic *et al*, 2009).

2. OBJETIVOS

El desarrollo de dispositivos que permitan un diagnóstico rápido y sensible de una determinada enfermedad en el punto de necesidad es una de las demandas actuales en el ámbito del diagnóstico *in vitro*. En este contexto, el proyecto SAPHELY pretende poner a punto un dispositivo de tipo POC basado en fotónica integrada para la detección con alta sensibilidad de miRNAs asociados a distintos tipos de cáncer. Los bioreceptores específicos a utilizar son de tipo MB, que cambian su conformación tras la hibridación, y que han de ser inmovilizados de manera eficiente en la superficie. En torno a este trabajo de inmovilización de los MB y en sus cambios conformacionales tras la hibridación se articula este TFG.

Así, el principal objetivo de este TFG consiste en optimizar la inmovilización covalente de los MBs y estudiar su capacidad para hibridar, una vez inmovilizados, haciendo uso de la tecnología de *microarray* de fluorescencia y de la microbalanza de cristal de cuarzo. Los resultados de este trabajo tienen como fin último su transferencia a los sensores fotónicos del proyecto SAPHELY.

Este objetivo se desglosa en los siguientes objetivos particulares:

- Funcionalización y caracterización de superficies de vidrio y chips de QCM con grupos alqueno.
- Puesta a punto de ensayos en *microarrays*, determinando las condiciones óptimas de hibridación: tiempo y longitud de onda de irradiación, concentración adecuada de tampón de hibridación, MB y sonda.
- Funcionalización de NPs para su posterior acoplamiento con MB.
- Analizar las señales obtenidas tras hibridación del MB y su sonda complementaria, examinando su posible aplicabilidad a dispositivos que permitan la detección del cáncer.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

Trietoxivinilsilano para la funcionalización de las superficies fue obtenido de Sigma-Aldrich, (España, www.sigmaaldrich.com). y fue usado sin purificaciones extra.

Los tampones empleados fueron SSC (NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM, pH7), PBS (10mM fosfato de sodio, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH 7.4; se añadió un 0.5% Tween 20 para obtener PBST). Agua ultrapura milli-Q se utilizó para la preparación de disoluciones madre de sondas.

Las nanopartículas de óxido de titanio fueron obtenidas de PlasmaChem, (Alemania, www.plasmachem.com) y se usaron a partir del sólido seco.

Los oligonucleótidos marcados y funcionalizados fueron adquiridos de Eurofins Genomic (Europa, www.eurofinsgenomics.eu). Fueron usados sin ninguna modificación. Las secuencias y funcionalizaciones correspondientes se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados con sus respectivas modificaciones y secuencias

Nombre	Extremo 5'	Extremo 3'	Otros	Secuencia (5'-3')
MB1	SH	Cy5	Biotina	ATCGACACCCCTATCACGATTAGCATTAAAGZTCGAT
MB2	SH		Biotina	ATCGACACCCCTATCACGATTAGCATTAAAGZTCGAT
MB3	SH	Fluoresceína	NH ₂	ATCGACACCCCTATCACGATTAGCATTAAAGZTCGAT
MB4	SH		Biotina	ATGCACTCGAACACTGTACTGGAAGATGGZTGCAT
MB5	SH			ATTCACTCAACATCAGTCTGGTAAGCTAGTGAAT
Diana 1	Cy5			UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
Diana 2	Cy5			CAUCUCCAGUACAGUGUUGGA

*Z indica que el nucleótido anterior tiene la modificación especificada en "Otros"

3.2 Instrumentación y software

En la impresión de los *microarrays* se utilizó el equipo AD1500 de Biodot Inc. (Irvine, CA, EE. UU), cuyo sistema de impresión es de no contacto con punta cerámica.

La fotoinmovilización se llevó a cabo con una lámpara ultravioleta con emisión de lámpara de mercurio a 254 o 371 nm, (6 mW cm⁻², Jelight Irvine, CA, USA) colocando el chip a una distancia fija de la misma ~0.5 cm).

Para la detección de la fluorescencia se empleó un sistema casero basado en una cámara CCD de alta sensibilidad Retiga EXi de Qimaging Inc, (Burnaby, Canadá, EE. UU) situada ortogonalmente para la lectura de la fluorescencia (Mira *et al.*, 2004), con LEDs Toshiba TLOH157P como fuente de excitación ($\lambda=633$ nm) (Llorente *et al.*, 2004). Las medidas se realizaron por acumulación de luz emitida por las muestras durante 5 segundos utilizando una ganancia del dispositivo CCD igual a 5.

Para el análisis y posterior cuantificación de las imágenes de los *microarrays* obtenidos se utilizó el paquete informático GenePix Pro 4.0 suministrado por Molecular Devices, Inc. (Sunnyvale, CA, EEUU).

Las medidas en la QCM se realizaron con el sensor Q-sense (5 MHz, QSX 301, Biolin Scientific) utilizando el paquete informático propio del equipo. La variación de la frecuencia y disipación fue monitorizada empleando un dispositivo Q-sense E1, equipado con una configuración de celda de flujo. Los experimentos se llevaron a cabo en tampón citrato salino (SSC) 2X, pH 7, con una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 25 $^{\circ}\text{C}$.

Las mediciones del ángulo de contacto se realizaron con un microscopio digital Dino-lite (modelo AM-413ZT de Dino-Lite Europa, www.dino-lite.com) y procesadas con el software Dinocapture 1.5.0.

Espectros de infrarrojo fueron medidos con un espectrómetro Bruker Tensor 27 FT-IR.

Las medidas de absorbancia fueron tomadas en un espectrómetro (Nanodrop 2000/2000c, Thermo Fischer Scientific).

3.3 Métodos

3.3.1 Funcionalización de la superficie y preparación de reactivos

3.3.1.1 Funcionalización de chips de vidrio y QCM

Para el acoplamiento de MBs tiolados a la superficie mediante química del tiol-eno han de introducirse previamente grupos vinilo sobre la superficie. Los chips son tratados con luz ultravioleta a 254 nm durante 10 minutos para activar la superficie. A continuación, se funcionalizan por inmersión en una solución que contiene tolueno y un 2% en volumen de trietoxivinilsilano (Figura 11a), el cual genera los grupos vinilo a las superficies funcionalizadas (Figura 11b). Se incuban durante 2 horas en agitación suave, siendo lavados posteriormente con acetona y secados con aire a presión. Se curan en una estufa a 90 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.

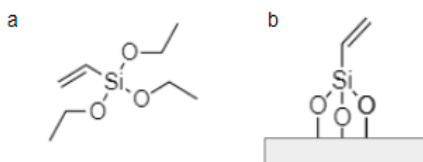


Figura 11. a) Estructura química de trietoxivinilsilano, b) superficie funcionalizada con trietoxivinilsilano

Para comprobar la correcta funcionalización de los chips, se procede a medir el ángulo de contacto de estos, siendo dicho ángulo el formado entre el chip y una gota de agua miliQ de 4 μL . Este ángulo debe ser mayor que el obtenido en chips sin funcionalizar, ya que la superficie se vuelve más hidrófoba al tener los grupos vinilo, apolares (Purcar *et al*, 2013).

3.3.1.2 Funcionalización de nanopartículas

El objetivo de la funcionalización de NPs es la introducción de grupos ácidos, en este caso mediante reacción con ácido 3,4-dihidroxibenzoico (DHBA), para su posterior acoplamiento con los grupos amino presentes en el MB correspondiente. Para ello, se pesan 4,8 mg de DHBA y se disuelven en 810 μL de agua destilada para conseguir una concentración de 4 mg/mL. El DHBA se disuelve empleando ultrasonido y calor. A continuación, se pesan 6,48 mg de NPs de TiO₂ con estructura rutilo y se disuelven en 810 μL de agua destilada en un microtubo de 2 mL previamente tarado. Este segundo microtubo se coloca en un agitador magnético y se añade un imán durante 2 minutos para

asegurar una suspensión homogénea de nanopartículas. Pasado este tiempo, se añade la solución que contiene DHBA y se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se alcaliniza usando NaOH 0,1 M, de modo que se desprotona el grupo ácido del DHBA, formando la sal correspondiente, soluble en agua. Se comprueba el cambio de pH empleando papel indicador y situando sobre el mismo gotas de 0.5 μL de la solución, hasta que se observe un color azul intenso, indicador de un pH 12. Se deja equilibrar el sistema durante 1 hora y se vuelve a medir el pH para comprobar que no ha cambiado. Se centrifuga a 10000 rpm durante 2 minutos, pasando el sobrenadante a otro microtubo de 2 mL. El sobrenadante contiene las NPs que han reaccionado con DHBA y el precipitado las NPs sin funcionalizar. Esto es debido a que las NPs que no han sido funcionalizadas son insolubles en agua, mientras que aquellas que han sí han sido funcionalizadas con DHBA (con grupos $-\text{COONa}$) son solubles. El tubo que contiene las NPs sin funcionalizar se deja secar y se pesa, siendo este dato empleado en el posterior cálculo del rendimiento de la reacción.

Posteriormente se disminuye el pH empleando HCl 0,1 M hasta conseguir pH 2. De este modo, al protonar los grupos ácido, las NPs funcionalizadas serán insolubles ($-\text{COONa} \rightarrow -\text{COOH}$). Se deja en agitación durante 1 hora y se mide de nuevo el pH para comprobar que no ha cambiado. Para la purificación, se centrifuga a 10000 rpm durante 2 minutos, y se elimina el sobrenadante conteniendo las impurezas. El precipitado, que contiene NPs funcionalizadas se resuspende con agua miliQ y se repiten más ciclos de centrifugación, eliminación de sobrenadante y resuspensión para obtener NPs funcionalizadas con la mayor pureza posible. A este precipitado se le añade la cantidad de agua miliQ necesaria para alcanzar la concentración deseada formando una suspensión homogénea.

El rendimiento de la reacción es calculado por diferencia de peso entre las NPs iniciales (6,48 mg), y las que se recuperan sin funcionalizar, suponiendo que la pérdida de NPs en la purificación es mínimo.

Finalmente, se caracterizan las NPs mediante espectroscopía infrarroja. En el caso de las no funcionalizadas, se emplea una gota de la solución que las contiene y se deja secar antes de proceder a obtener su espectro de infrarrojo. Puesto que las funcionalizadas ya están secas, se emplea una pequeña cantidad de la masa obtenida.

3.3.1.3 Acoplamiento covalente entre nanopartículas y *molecular beacons*

El MB que se unirá covalentemente a las NPs empleando el acoplamiento mediante la formación del éster activo usando EDC/NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida/N-hidroxisuccinimida) contiene un grupo amino cerca del extremo 3', que está involucrado en la formación del éster, además de fluoresceína en el extremo 3' gracias a la cual se puede monitorizar la conjugación del MB y NPs y un grupo tiol en el extremo 5', que es empleado en la inmovilización covalente del MB sobre la superficie.

Para unir covalentemente el MB y las NPs previamente funcionalizadas se emplea EDC/NHS (Figura 12). Para llevar a cabo el acoplamiento se mezclan las NPs funcionalizadas y previamente purificadas a 2 mg/mL diluidas en agua miliQ, la sonda de interés a 5 μM en agua miliQ, 50 mg de EDC, 40 mg de NHS y se disuelven en tampón MES 0.1 M (ácido 2-(N-morfolino)etanesulfónico) hasta obtener un volumen total de 200 μL . Se mide la absorbancia y se deja en agitación durante toda la noche.

Pasado este tiempo, se mide de nuevo la absorbancia. Se llevan a cabo varios ciclos de centrifugación, eliminación del sobrenadante y resuspensión en tampón MES 0.1 M para purificar las NPs acopladas covalentemente a MBs (MB-NP). Las centrifugaciones se realizan a 13000 rpm durante 2 minutos, pasando el sobrenadante conteniendo el MB no unido a NPs a otro tubo y añadiendo tampón MES para resuspender el precipitado y centrifugar de nuevo. A continuación, se mide la absorbancia y fluorescencia de la serie de sobrenadantes obtenidos, así como de la disolución de NPs con el complejo MB-NP.

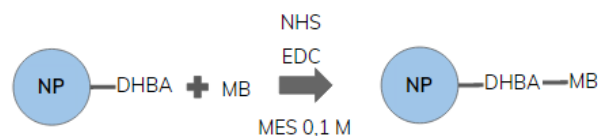


Figura 12. Esquematación de los pasos seguidos en el acoplamiento de NP-MB. Las NPs funcionalizadas con DHBA y purificadas son diluidas en el tampón MES 0,1 M con NHS, EDC y el MB3, resultado en la formación del complejo NP-MB.

3.3.2 Inmovilización covalente de sondas

3.3.2.1 Inmovilización covalente sobre chips de vidrio

Los oligonucleótidos de interés que se pretenden inmovilizar mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno, sobre los chips de vidrio, poseen un grupo tiol en su extremo 5' o 3'. Son diluidos en agua miliQ a la concentración deseada (desde 0,313 μM hasta 100 μM según el experimento) e impresos sobre chips funcionalizados, usando un dispensador automático que imprime 30 nL de cada muestra, creando micromatrices de 4 réplicas (4 columnas) de cada muestra impresa por el número de muestras que se imprimen (filas). Todos los experimentos sobre chips de vidrio se realizaron por duplicado. Los chips son expuestos a luz UV (254 nm, 6 mW/cm²) durante 30 minutos, lavados con tampón fosfato salino (PBS-T) y agua destilada, y secados con aire a presión.

Para los ensayos de inmovilización se utilizaron sondas marcadas con un fluoróforo (Cy5) en el extremo 5'. Dichas sondas se usaron para demostrar, y cuantificar, la inmovilización de los oligos/MBs. Para ello, se procede a la medida de la fluorescencia usando un lector de fluorescencia de superficies (LFS) de fabricación casera basado en una cámara CCD y un sistema LED de iluminación desarrollada por Mira *et al* en el año 2004 (Mira *et al*, 2004). Posteriormente, se analizaron las imágenes y se trataron los datos con el programa GenePix.

3.3.2.2 Inmovilización covalente sobre chips de QCM

Al igual que en el caso de los chips de vidrio, los MBs, con un grupo tiol en su extremo 3' son inmovilizados gracias a la reacción de acoplamiento tiol-eno. Se dispensan 5 μL de la sonda de interés a la concentración deseada (10 μM) en agua miliQ sobre un chip de QCM con una capa de SiO₂. A continuación, se cubre con un cubreobjetos de cuarzo y se irradian con luz UV (371 nm) durante 30 minutos, después son lavados con PBS-T y agua y secados con aire a presión.

Tras las inmovilizaciones se mide el ángulo de contacto para comprobar que es inferior al obtenido tras funcionalizar la superficie, ya que esta se vuelve más hidrófila al inmovilizar la sonda. Esto es así ya que se reduce el número de grupos vinilo expuestos en la superficie del chip (apolares) y se han

inmovilizado cadenas de ADN (polares). Sin embargo, la superficie no se vuelve totalmente hidrófila ya que quedan grupos vinilo sin modificar.

3.3.3 Ensayos de reconocimiento

3.3.3.1 Ensayos de reconocimiento con estreptavidina

Para los chips que tienen inmovilizada sonda con una funcionalización de tipo biotina próxima al extremo 3' de la secuencia, se extienden sobre los *microarrays* en chips de vidrio 10 μL de una solución que contiene estreptavidina, con o sin marcar con Cy5 (según el ensayo) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en SSC 1X que contiene Tween 20 al 0.5%. Los chips se cubren con un cubreobjetos y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavan con SSC 0.1X. Se registra la fluorescencia con el LFS y las imágenes se analizan empleando el software GenePix.

3.3.3.2 Hibridación con sonda complementaria en chips de vidrio

Se depositan, sobre chips que tienen los MB de interés inmovilizados en formato *microarray* 10 μL de la sonda complementaria 0.5 μM en tampón SSC. La disolución se extiende con ayuda de un cubreobjetos y se incuba durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se lava con SSC 0.1X. Si alguna de las sondas es fluorescente, se procede a la medida de la fluorescencia, usando el LFS y analizando las imágenes con el programa GenePix.

3.3.3.3 Hibridación de sonda complementaria en chips de QCM

Para detectar la hibridación de la sonda complementaria se emplea la QCM. Para ello, se prepara una solución de 600 μL de la sonda complementaria a una concentración de 0.5 μM en SSC2X. En primer lugar, se fluye el mismo tampón SSC usado para la preparación de la solución de la sonda complementaria. A continuación, se fluyen los 600 μL sonda de interés en dicho tampón, y posteriormente SSC otra vez hasta su estabilización. Durante todo el ensayo se utiliza un flujo constante de 30 $\mu\text{L}/\text{minuto}$.

3.3.3.4 Hibridación de sonda complementaria en disolución con MB-NP

Para llevar a cabo una hibridación entre un MB-NP previamente obtenido mediante acoplamiento covalente EDC/NHS y su sonda complementaria se mezclan ambas soluciones en un microtubo y se incuban en un termobloque a 37 °C durante 1 hora asegurando así una temperatura homogénea en el mismo. Pasado ese tiempo se realizan una serie de centrifugaciones para eliminar la sonda complementaria que no ha hibridado y que no precipita. El precipitado final que contiene la sonda hibridada a su MB complementario que tiene acopladas NPs se resuspende en tampón MES 0.1 M.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Funcionalización de superficies y caracterización

El primer paso en la puesta a punto del ensayo fue la modificación de las superficies tanto del formato *microarray* como de los chips de QCM. Para ello, en primer lugar, se activaron las superficies mediante irradiación con luz UV (254 nm). Esta activación aumenta los grupos -OH de las superficies, lo que mejora el rendimiento de la silanización. Posteriormente, se lleva a cabo el curado durante 1 hora en una estufa a 90 °C para favorecer la condensación de los organosilanos sobre la superficie.

Las superficies empleadas en este estudio son hidrofílicas inicialmente (vidrio y chip de QCM), presentando un ángulo de contacto de agua de $19,92 \pm 0,03^\circ$ y $27,75^\circ$ respectivamente. Tras la irradiación con luz UV, el ángulo de contacto de los chips de vidrio disminuye hasta $8,75 \pm 0,04^\circ$, mostrando así el aumento de grupos -OH que ha tenido lugar. Tras la funcionalización con un 2% de trietoxivinilsilano en tolueno, se forma una monocapa de organosilano sobre los chips en la cual hay grupos vinilo (Figura 13). La reacción conlleva reacciones de hidrólisis y condensación. Debido a la apolaridad que presentan estos grupos, los ángulos de contacto aumentan hasta $80,27 \pm 0,46^\circ$ en el caso de los chips de vidrio y $80,29 \pm 0,23^\circ$ en el caso de los chips de QCM, ya que aumentan su hidrofobicidad debido a la presencia de grupos vinilo en su superficie tal y como se ha explicado anteriormente.

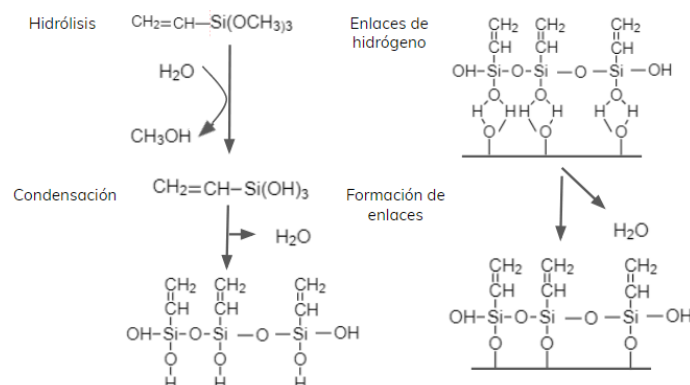


Figura 13. Reacciones de hidrólisis y condensación llevadas a cabo durante la funcionalización de superficies con organosilano.

Por otra parte, tras inmovilizar el MB sobre la superficie del chip de QCM previamente funcionalizado, la hidrofobicidad de la superficie debe disminuir por la presencia de ADN. El ángulo de contacto obtenido es $78,86 \pm 0,21^\circ$ para el MB, siendo $75,08 \pm 0,28^\circ$ en el caso de inmovilizar el complejo NP-MB. Estas variaciones en el ángulo de contacto indican que las sucesivas modificaciones se han ido produciendo con éxito.

4.2 Optimización de la inmovilización de MB para formato *microarray* y QCM

Una vez funcionalizada la superficie, el paso siguiente es la inmovilización de la sonda tiolada mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno. Para ello, con el fin de obtener las mejores

prestaciones en la inmovilización se realizó un estudio de optimización de parámetros que influyen en el rendimiento del anclaje de las sondas.

4.2.1 Tiempo de irradiación

Es necesario conocer el tiempo adecuado al que irradiar los chips. Este será aquel que permita obtener la mayor inmovilización posible del MB de interés y por tanto observar una mayor fluorescencia del MB tras lavar. Para ello, se imprime sobre chips de vidrio que han sido previamente funcionalizados con grupos vinilo el MB tiolado y marcado con Cy5 (MB1) a una concentración de 5 μM , siendo posteriormente irradiados con una lámpara de 254 nm de potencia 6 mW/cm^2 durante diferentes tiempos. Los resultados de fluorescencia tras lavar los chips se observan en la figura 14.

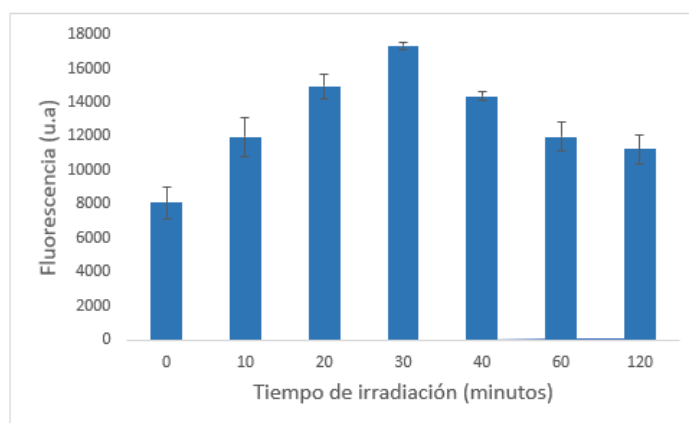


Figura 14. Relación entre tiempo de irradiación e intensidad de fluorescencia del MB impreso en chips de vidrio tras lavar.

En la figura puede observarse que el tiempo óptimo de irradiación es 30 minutos, ya que los demás presentan rendimientos de inmovilización menores. Además, también se observa que, si no se irradia, el MB prácticamente es eliminado de la superficie del chip tras lavar, mostrando así la necesidad de la fotoactivación y por tanto apuntando hacia la unión covalente de la sonda mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno. Si no se llevara a cabo este acoplamiento, la intensidad observada en los chips sería debida a adsorciones inespecíficas.

Tiempos de irradiación superiores a los 30 minutos disminuyen la fluorescencia observada, probablemente debido a un efecto de *photobleaching* o desactivación del fluoróforo por exposición a la radiación (The Molecular Probes® Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies). Es por esto que calcular el tiempo óptimo de irradiación es tan importante.

También se comprueba cuál es el tiempo óptimo de irradiación cuando se trata de MB que ha sido extendido sobre la superficie del chip en lugar de impreso. Es necesario conocer el tiempo adecuado en este caso ya que es el procedimiento que se llevará a cabo para biofuncionalizar los chips de QCM.

Con este objetivo, se extiende sobre chips de vidrio una solución que contiene MB tiolado (MB2) diluido en agua miliQ a una concentración de 10 μM , empleando así el mismo MB y concentración que será usado en los experimentos llevados a cabo en chips de QCM. Se emplea esta concentración para asegurar la inmovilización homogénea del MB sobre toda la superficie del chip. Esta solución es cubierta con cuarzo e irradiada a diferentes tiempos con una lámpara de 371 nm y potencia de 6 mW/cm^2 . Tras ello, los chips son lavados e hibridados con la sonda complementaria fluorescente,

diluida en SSC 1X a una concentración de 0,5 μM . Finalmente, se analiza la fluorescencia obtenida de la sonda complementaria, comparando sus intensidades en función del tiempo de irradiación. Los datos de fluorescencia se encuentran recogidos en la tabla 2.

Tabla 2. Relación entre tiempo de irradiación e intensidad de fluorescencia de sonda complementaria hibridada con MB inmovilizado en la superficie total de chips de vidrio

Tiempo de irradiación (min)	Intensidad de fluorescencia (u.a)
15	9279 \pm 154
30	11010 \pm 416
45	10677 \pm 830

Como puede observarse, la mayor intensidad de fluorescencia, que está directamente relacionada con el mayor rendimiento de hibridación del MB inmovilizado, se encuentra en el caso en el que se irradian los chips durante 30 minutos, mismo tiempo en el caso de *microarray*, habiendo una reducción de fluorescencia si se irradia durante más o menos tiempo, atribuible a las razones anteriormente indicadas.

4.2.2 Longitud de onda de irradiación

Al igual que en el caso del tiempo, se hace necesario conocer cuál es la longitud de irradiación adecuada que permitirá obtener mayores rendimientos en la inmovilización del MB cuando se lleva a cabo la química del tiol-eno. Para ello, se extiende sobre chips de vidrio 10 μL de MB que contiene Cy5 (MB1) a una concentración de 10 μM , la misma que será usada en chips de QCM. Se tapa con cuarzo y se irradia a 254 nm o a 371 nm durante 30 minutos. Pasado este tiempo, los chips de vidrio se lavan con PBS-T y agua destilada, y se mide su fluorescencia.

La fluorescencia observada en el caso de llevar a cabo la irradiación con la lámpara cuya longitud de onda es 254 nm es de 7122 \pm 2736 u.a, mientras que la observada si se emplea una lámpara de 371 nm es de 14968 \pm 2485 u.a.

Este aumento en la intensidad de fluorescencia cuando se emplea una lámpara de menor energía como es el caso de aquella de 371 nm puede ser debido a que daña menos el ADN que cuando se emplea una mayor energía (254 nm), evitando la formación de radicales y por ello el *photobleaching* (Molecular Probes™ Handbook A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies 11th Edition (2010)).

Por tanto, en vista de los resultados obtenidos, se emplearán lámparas de 371 nm cuando se realicen experimentos con chips de QCM en los que el MB se extiende sobre su superficie.

Los resultados obtenidos en formato *microarrays* al comparar diferentes longitudes de onda daban resultados similares, por lo que se optó por emplear una longitud de onda de 254 nm cuando se trata de chips de vidrio.

Por otra parte, puede observarse que la fluorescencia obtenida tras irradiar y lavar el MB que ha sido extendido sobre la superficie es menor que si se imprime directamente el MB sobre un chip a pesar de encontrarse a mayor concentración. Dandy et (2007) al estudiaron este fenómeno y determinaron que esto es así ya que al disminuir el área en el que se encuentra el MB (emplear *microarray* con tamaños de punto menores en lugar de extender la solución con el MB de interés sobre una superficie), hace que el MB esté extendido de un modo más uniforme sobre la superficie y beneficie ampliamente la respuesta del sistema.

4.3 Ensayos en formato *microarray*

4.3.1. Ensayo de inmovilización con MB marcados fluorescentemente

Con las condiciones óptimas establecidas arriba, se procedió a determinar la cantidad de MB que resultaba en la superficie del soporte tras el proceso de inmovilización.

Para ello, en primer lugar, se lleva a cabo la obtención de una recta de calibrado del MB1, que contiene Cy5 en el extremo 3' y un grupo tiol en el extremo 5', empleado para la inmovilización sobre los chips funcionalizados con grupos vinilo. El objetivo de esta recta es permitir conocer el rendimiento de inmovilización mediante interpolación. Para ello, el MB1 se imprime a concentraciones desde 15 hasta 0,313 μM sobre chips de vidrio, formando una matriz de 4x12, teniendo cada concentración 4 réplicas. Las imágenes obtenidas son analizadas con un lector LFS tras irradiar y lavar los chips, y a continuación se estudian las intensidades de fluorescencia del *microarray*. Con los datos de fluorescencia tras irradiar (figura 15a) se puede establecer una relación entre el valor de la densidad de inmovilización y la intensidad de fluorescencia observada (figura 15b), ya que conocemos el área de punto del *microarray*, el volumen dispensado y la concentración, por lo que se puede determinar la cantidad de MB/cm² que hay en la superficie. Tras establecer esta relación, los chips son lavados y se registra nuevamente la fluorescencia. Tras este lavado, la fluorescencia será únicamente debida a la sonda inmovilizada, pudiendo determinarse su densidad a partir de la interpolación en la recta construida anteriormente.

Los diferentes experimentos llevados a cabo en chips de vidrio se realizan por duplicado, además de tener cada uno de ellos 4 réplicas (4 *spots*) de la misma concentración de MB.

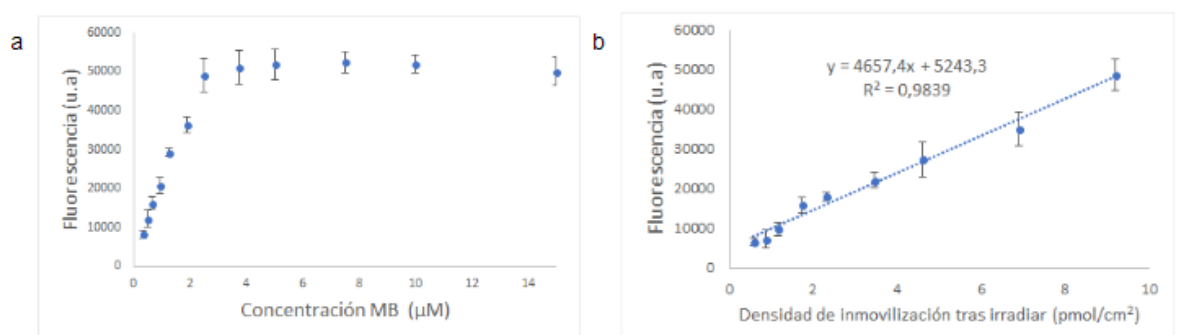


Figura 15. a) Relación entre intensidad de fluorescencia tras irradiar y concentración del MB el chip de vidrio. b) Relación entre intensidad de fluorescencia y densidad de inmovilización tras irradiar en la zona lineal.

Puede observarse que la figura 15a no sigue una tendencia lineal a partir de una cierta concentración. Esto es debido a que tiene lugar la saturación del LFS con el que se mide la fluorescencia, habiendo de este modo un límite máximo de cuantificación por las limitaciones del sensor cuando se tratan de medir altas concentraciones de sonda marcada. En este caso, la concentración de MB irradiado a partir de la cual se alcanza la saturación del LFS es 5 μM .

Tras lavar, únicamente permanecen en el chip los MBs que han sido inmovilizados mediante la química del tiol-eno, eliminando aquellos que se encuentran sobre la superficie sin estar unidos covalentemente. Es por ello que se observa una disminución de fluorescencia tras lavar, siendo esta del 30 %. Debido a esto, se debe emplear la ecuación de la recta de la gráfica anterior para conocer la concentración de MB que se corresponde con una intensidad de fluorescencia determinada.

Para ello, se sustituyen los valores de fluorescencia obtenidos en el chip tras lavar (figura 16a) en la ecuación de la recta de la figura 15b obteniendo de este modo la densidad de MB conseguida en la superficie para cada concentración dispensada en la zona lineal de la gráfica (figura 16b).



Figura 16. a) Relación entre intensidad de fluorescencia tras lavar y concentración del MB. b) Relación entre densidad del MB tras lavar y su concentración correspondiente.

La máxima densidad de inmovilización obtenida es de 9,19 pmol/cm^2 , que se corresponde con una concentración de MB de 7,5 μM . Este máximo de densidad de inmovilización es mayor que la obtenida en estudios previos (6 pmol/cm^2) (Escorihuela *et al*, 2014), pudiendo deberse a los diferentes tiempos o energía de irradiación.

4.3.2 Ensayos de especificidad en la hibridación y optimización del tampón de hibridación

Tras conocer las condiciones óptimas de la inmovilización de las sondas se procede a evaluar la efectividad de estas sondas inmovilizadas frente a la hibridación de su cadena complementaria. Por tanto, se lleva a cabo un experimento para comprobar que el MB y la sonda complementaria se unen específicamente, además de comprobar cómo influye en las hibridaciones, diferentes concentraciones del tampón SSC. Para ello, se imprimen 8 chips de vidrio con dos MB complementarios a la sonda de interés (MB2 y MB3), un MB no específico (MB4), y otro marcado con Cy5 para comprobar que la inmovilización es correcta (MB1). Los MB se encuentran a una concentración de 2,5 μM . Tras irradiar y lavar los chips, se analiza la fluorescencia, apareciendo únicamente en el MB1, que contiene Cy5 (figura 17a). Tras ello, se hibridan 2 chips con la sonda

complementaria a 0,5 μM en SSC 1X, otros 2 en SSC 2X, otros 2 en SSC 5X y los últimos con la sonda complementaria al MB3 (Diana 2).

Las sondas complementarias están marcadas con Cy5. Se espera que cada sonda hibride con su MB complementario de manera específica, además de observar mayores intensidades de fluorescencia a medida que se aumenta la concentración de sales del tampón en la solución que contiene la sonda complementaria al hibridar, ya que las sales que se encuentran en este reducen la repulsión electrostática que existe entre el MB y su sonda complementaria (Fuchs *et al*, 2010). Los resultados de fluorescencia se muestran en la figura 17.

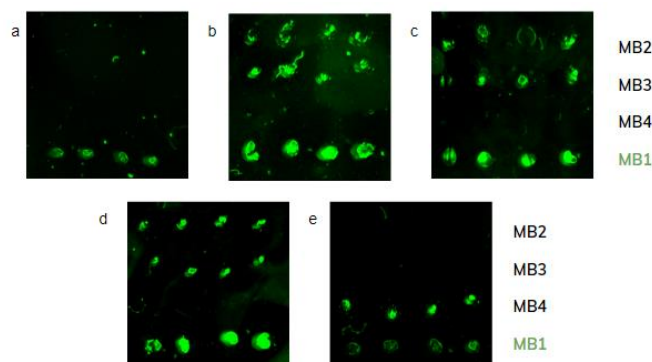


Figura 17. Imágenes de fluorescencia de chips de vidrio sobre los que se ha impreso MB2, MB3, MB4 y MB1, siendo los dos primeros complementarios a la sonda de interés. a) Chip irradiado y lavado b) Chip hibridado con la sonda complementaria a los MB2 y MB3 en tampón SSC 1X. c) Chip hibridado con la sonda complementaria a los MB2 y MB3 en tampón SSC 2X. d) Chip hibridado con la sonda complementaria a los MB2 y MB3 en el tampón SSC 5X. e) Chip hibridado con la sonda complementaria (diana 2) al MB4 en tampón SSC 2X.

Se observa que las intensidades de fluorescencia aumentan a medida que lo hace la concentración del tampón (Tabla 3). De este modo se comprueba que la hibridación entre el MB y su sonda complementaria es específica en todo el rango de concentraciones del tampón usadas, siendo mejor cuando se emplea mayor concentración de SSC. Tal y como se observa en la figura 17d, el MB4 interacciona únicamente con su sonda específica (diana 2), obteniendo una intensidad de fluorescencia de 37738 ± 1042 . Sin embargo, a pesar de que la mayor intensidad de fluorescencia se observa cuando se emplea SSC 5X, se usará SSC 2X en los experimentos a realizar en la QCM para evitar posibles inespecificidades al usar altas concentraciones de sales (McCarthy *et al*, 1970).

Tabla 3. Intensidades de fluorescencia de chips de vidrio al hibridar con las diferentes sondas y diferentes concentraciones de tampón.

		SSC 1X	SSC 2X	SSC 5X
Intensidad de fluorescencia (u.a)	MB2	17370 ± 666	30425 ± 1087	33420 ± 2431
	MB3	24522 ± 3618	29080 ± 6464	34386 ± 1384
	MB4	-	-	-
	MB1	29130 ± 7087	31117 ± 2493	45655 ± 2112

4.3.3 Determinación del rendimiento de hibridación

Con el fin de determinar la cantidad de secuencia diana que hibrida con la sonda anclada a la superficie, y de manera análoga a lo descrito en la sección 4.3.1, se construye una recta de calibrado de la sonda complementaria al MB1. Para ello, se imprimen diferentes concentraciones de la diana

sobre un chip de vidrio funcionalizado y se analiza la fluorescencia del *microarray* tras ello, ya que la diana tiene marcaje fluorescente Cy5 en el extremo 5'. De este modo se obtiene la relación de la figura 18.

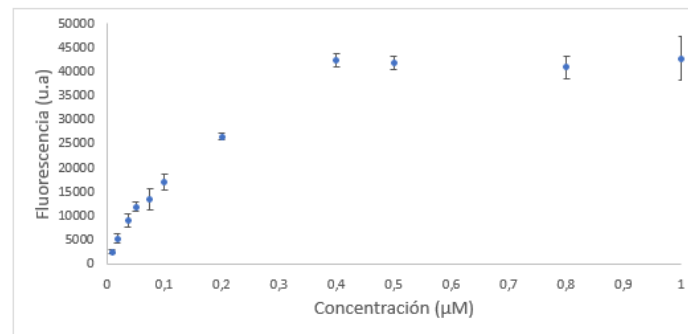


Figura 18. Relación entre concentración y fluorescencia de la sonda complementaria tras imprimir

Puede observarse que la máxima intensidad de fluorescencia es observada a partir de concentraciones mayores de 0,4 μM, siendo 0,5 μM la concentración usada en los posteriores experimentos, asegurando de este modo la máxima fluorescencia posible.

Al igual que en el caso del calibrado del MB, la gráfica no sigue una tendencia lineal a partir de 0,4 μM, punto a partir del cual se llega a la saturación del lector LFS. Al representar la zona lineal de la gráfica, en la que la fluorescencia observada es proporcional a la concentración de sonda que se ha inmovilizado sobre el chip, se obtiene la figura 19.

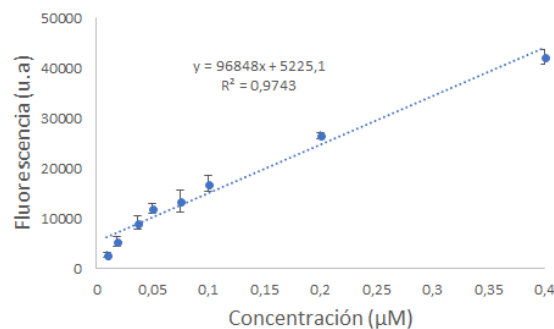


Figura 19. Representación de zona lineal de la relación de intensidad de fluorescencia y concentración de sonda complementaria impresa.

Por otra parte, se calcula la densidad de inmovilización que se corresponde con cada concentración de sonda complementaria impresa, representando en la figura 20 la fluorescencia que se corresponde con cada densidad de inmovilización.

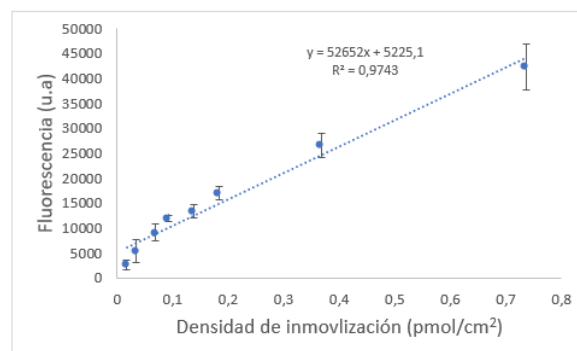


Figura 20. Relación entre fluorescencia y densidad de inmovilización de la sonda complementaria.

A partir de la ecuación de la recta, se sustituyen los valores de fluorescencia obtenidos en el experimento del apartado 4.3.2 correspondientes a los MB2 y MB3 cuando se emplea SSC 2X. De este modo, se obtienen densidades de inmovilización de 0,47 y 0,45 pmol/cm² correspondientes a los MB2 y MB3 respectivamente. Puesto que la concentración de MB empleada es de 2,5 μM, gracias a la ecuación de la recta que representa la relación existente entre concentración de MB y densidad de inmovilización obtenida en el apartado 4.3.1, se puede determinar que se corresponde con 3,38 pmol/cm². Al dividir los valores de densidad de inmovilización de la sonda complementaria y el del MB se puede conocer el porcentaje de MB inmovilizado que ha hibridado con la sonda complementaria, siendo este del 14%. Este valor es más bajo de lo esperado, pudiendo ser debido a las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento, o a un exceso de MB inmovilizado.

4.3.4 Ensayo de reconocimiento de sondas biotiniladas empleando estreptavidina

Alguno de los MB empleados tienen unida una molécula de biotina próxima al extremo 3' (MB1, MB2), por ello se realiza un experimento para comprobar si es reconocida por parte de la estreptavidina y conocer si tiene lugar la hibridación entre el MB y su sonda complementaria en esta situación. Este hecho es de gran importancia ya que permitiría unir otros tipos de moléculas a los MBs al ofrecer un punto de anclaje tan fuerte como lo es la unión biotina - estreptavidina. Esta propiedad se podría utilizar para mejorar las prestaciones en los sistemas de detección óptica basados en campo evanescente como se pretende en el proyecto SAPHELY, pues el cambio conformacional producido tras la hibridación en un MB con una estreptavidina debería afectar a la señal en mayor proporción a como lo hace el MB solo.

Para ello, se imprimen diferentes MB sobre chips de vidrio a una concentración de 2,5 μM. Uno de los MB tiene biotina (MB2) y es complementario a la sonda posteriormente empleada en la hibridación, otro no tiene biotina ni es complementario a la sonda (MB5) empleado como control negativo y el último tiene biotina, es complementario a la sonda y además contiene el marcaje fluorescente Cy5 (MB1) empleado como control de una correcta inmovilización.

Tras la impresión y posterior comprobación de la correcta inmovilización mediante la medida de fluorescencia del MB1, los chips se incuban con diferentes soluciones. Dos chips se incuban con estreptavidina marcada con Cy5 a una concentración de 10 μg/mL en el tampón SSC 1X con Tween 20 0,5%. De este modo podía comprobarse que el reconocimiento entre la estreptavidina y la biotina que tiene el MB2 es específico, no habiendo interacción con el MB2. El resultado se muestra en la figura 21.

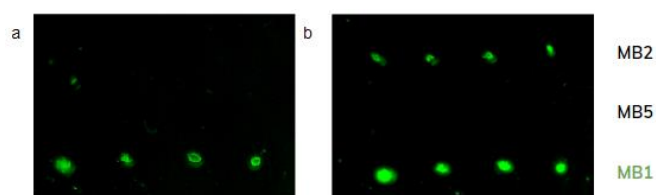


Figura 21. *Microarray* sobre chip de vidrio que contiene MB2, MB5 y MB1 a) tras lavar b) incubado con estreptavidina marcada con Cy5.

Otros dos chips, tras lavar y comprobar la correcta inmovilización de los MB impresos (Figura 22a), se incuban en primer lugar con la sonda complementaria marcada con Cy5 del MB1 y MB2 en SSC 1X a una concentración 0,5 μ M, detectando la hibridación específica y analizando las intensidades de fluorescencia, mostrado en la figura 22b.

Posteriormente se procede a la deshibridación de la sonda mediante la inmersión de los chips de vidrio en agua destilada durante 2 horas (figura 22c). Una vez se demuestra la deshibridación de los chips, se incuban de nuevo con estreptavidina sin marcar, y a continuación se realiza otra hibridación con la sonda complementaria marcada (figura 22d). Finalmente, se comparan las intensidades de fluorescencia tras la hibridación de la sonda complementaria y tras la hibridación de la sonda una vez ha tenido lugar el reconocimiento con la estreptavidina.

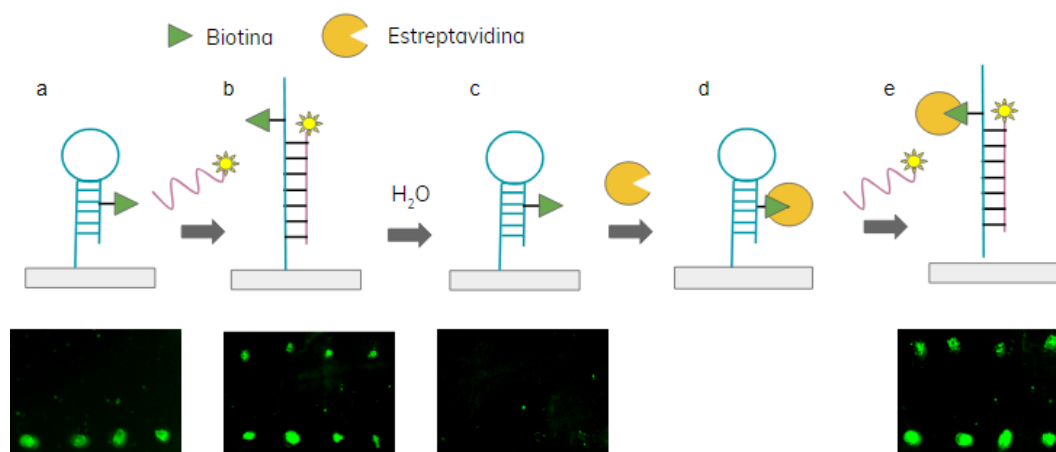


Figura 22. Representación de los datos seguidos en el ensayo de reconocimiento de estreptavidina y sus respectivas imágenes de fluorescencia. a) En primer lugar se mide la fluorescencia del MB impreso, b) a continuación, el MB hibrida con la sonda complementaria y se mide la fluorescencia c) posteriormente, se deshibrida con agua, d) después se añade estreptavidina que reconoce a la biotina, y e) finalmente, el MB con estreptavidina hibrida con la sonda complementaria, comparando la fluorescencia obtenida en este caso con aquella en la que no había estreptavidina unida. Las moléculas representadas no están a escala.

Los resultados de fluorescencia se encuentran recogidos en la tabla 4. En ella se observa que la intensidad es mayor en el caso de la hibridación del MB2 y su sonda complementaria sin estreptavidina. Esta fluorescencia disminuye cuando la estreptavidina está unida al MB. De este modo, la diferencia en la intensidad de fluorescencia es del 19%, mostrando así que el MB unido a estreptavidina, a pesar de disminuir el rendimiento de la interacción entre el MB y su sonda complementaria, mantiene la capacidad de hibridación.

Tabla 4. Intensidades de fluorescencia obtenidos en chip de vidrio tras la hibridación del MB2 y su la sonda complementaria en presencia o no de estreptavidina.

	Fluorescencia
Sonda complementaria	28598 \pm 2172
Estreptavidina + sonda complementaria	23208 \pm 565

Por otra parte, se observa que no hay fluorescencia para MB5 en el chip en el que se ha deshibridado la sonda complementaria con agua (figura 22c), pero no se ha eliminado el MB de la superficie del

chip ya que al hibridar con la sonda complementaria (figura 22d) sí se observa fluorescencia. Esto puede ser deberse a la pérdida del fluoróforo causada por la energía o el tiempo de irradiación.

4.4 Ensayos con QCM

4.4.1. Estudios de hibridación con MB biotinilados

Tras confirmar que la presencia de estreptavidina no impide la hibridación del MB con su sonda complementaria, se estudian los cambios conformacionales de los MBs unidos a estreptavidina que tienen lugar durante la hibridación. De este modo se analiza su posible aplicabilidad y explotación en biosensado, además de corroborar y ampliar el estudio llevado a cabo por González-Lucas *et al* (González-Lucas *et al*, 2017) en DPI (interferometría de polarización dual).

Para ello, se inmoviliza sobre un chip de QCM el MB2 que contiene una biotina próxima al extremo 3' a una concentración superior al máximo de inmovilización (10 μM) para asegurar una inmovilización homogénea sobre toda la superficie. A continuación, se lleva a cabo un experimento en la QCM en el que se preparan soluciones de la sonda complementaria al MB a una concentración de 0,5 μM diluido en SSC 2X y estreptavidina a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluida en SSC 2X con Tween 20 al 0,5%. Tween 20 es añadido para reducir las posibles interacciones inespecíficas que puedan darse (Brogan *et al*, 2004), ya que es un surfactante y mantiene aquellas específicas (biotina-estreptavidina), más fuertes, que no son eliminadas con Tween 20. De este modo, al añadir el surfactante se evita que la estreptavidina se una a la superficie de manera inespecífica, lo que podría alterar los resultados observados.

En base a los resultados obtenidos en *microarray*, se diseñó un experimento en el cual, en primer lugar, se fluye la solución que contiene la sonda complementaria. Así, hibridará con el MB que se encuentra inmovilizado en la superficie del chip. A continuación, se fluye la solución que contiene estreptavidina, que se unirá a la biotina del MB. Posteriormente se fluye agua miliQ, que deshibridará la sonda complementaria, no influyendo en la unión entre la estreptavidina y la biotina del MB. Los pasos están representados en la figura 23.

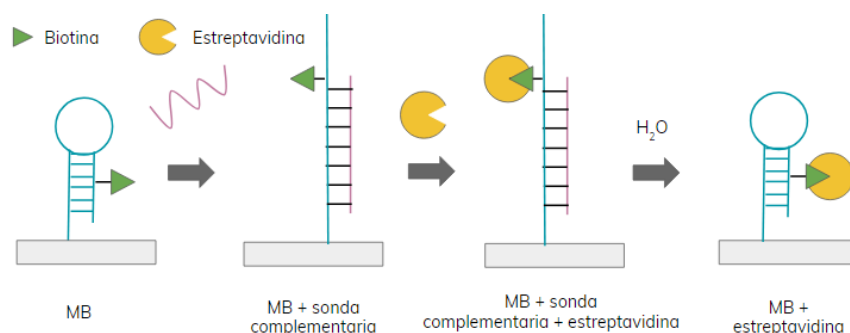


Figura 23. Representación de los pasos seguidos en el experimento de QCM. El MB inmovilizado sobre la superficie hibrida con la sonda complementaria, sufriendo un cambio conformacional. A continuación, se fluye estreptavidina que interacciona con la biotina presente en el MB. Finalmente, se fluye agua que deshibrida la sonda complementaria unida al MB, adquiriendo este de nuevo la conformación de horquilla. Las moléculas representadas no están a escala.

Antes de añadir cada disolución se fluye SSC 2X como tampón de transporte ya que es el mismo empleado en la preparación de las disoluciones de sonda y estreptavidina, para detectar cambios en masa que sean debidos únicamente a la sonda y a la estreptavidina, respectivamente, y no al cambio en el índice de refracción del agua y SSC. Además, eluye las disoluciones que han sido fluidas previamente hasta llegar a la estabilidad y elimina aquellas moléculas que no están fuertemente unidas al chip.

Se llevan a cabo más ciclos de hibridación de la sonda complementaria y deshibridación con agua para comprobar si se observan hibridaciones entre MB y sonda. Los resultados mostrados en función de la masa se encuentran en la figura 24, obtenidos a partir de la ecuación de Saurbrey ($\Delta f = C_f \cdot \Delta m$, ecuación 1).

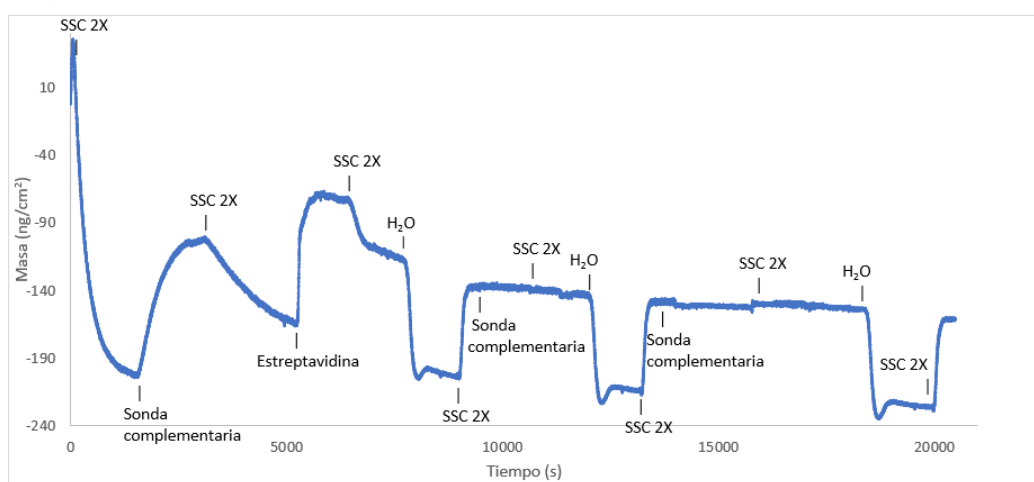


Figura 24. Relación entre el tiempo y la variación de masa tras fluir la sonda complementaria y estreptavidina sobre el chip de cuarzo.

Como puede observarse, al fluir la sonda complementaria hay un salto en masa de $37,45 \text{ ng/cm}^2$ ($4,95 \text{ pmol/cm}^2$, calculado gracias a la masa molecular de la sonda complementaria, $7554,5 \text{ g/mol}$) tras fluir SSC 2X que elimina las posibles interacciones inespecíficas, ya que hibrida con el MB que se encuentra en la superficie del chip explicando de este modo el aumento de masa. Al comparar estos datos con la máxima densidad de inmovilización obtenida en la recta de calibrado del MB ($9,19 \text{ pmol/cm}^2$) se comprueba que no toda la sonda inmovilizada ha hibridado con la sonda complementaria fluida, lo que se corresponde con un 54% de rendimiento. Al comparar con el rendimiento obtenido en formato *microarray* (14%) se esperaría que el obtenido en la QCM fuera menor que este por encontrar menores densidades de inmovilización de MB o por la presencia de flujo. Sin embargo, se obtiene el resultado contrario, ya que los menores rendimientos de hibridación se encuentran en el formato *microarray*. Estos bajos rendimientos pueden haber sido debidos a las bajas densidades de inmovilización obtenidas.

Al fluir estreptavidina, que interacciona con la biotina que tiene el MB, también tiene lugar un aumento de masa de $45,05 \text{ ng/cm}^2$ ($5,96 \text{ pmol/cm}^2$) siendo ambos saltos en masa del mismo orden. Del mismo modo, al comparar con la densidad de inmovilización del MB, se obtiene un rendimiento del 65%.

Al fluir agua, se deshibrida la sonda que estaba unida al MB, pero la estreptavidina continúa unida a la biotina. Es por esto que al fluir de nuevo SSC 2X no se llega a la masa observada tras fluir SSC 2X

por primera vez, cuando no habría nada unido al MB. Esta diferencia de masa debe corresponderse al aumento de masa causado por la adición de la sonda complementaria. La sonda causa un aumento de 37,45 ng/cm², mientras que la masa que disminuye tras deshibridar es 18,08 ng/cm². Así se observa que se ha eliminado el 48% de la sonda que se había unido, por lo que, en las posteriores hibridaciones, únicamente el 48% del MB anclado está disponible para hibridar de nuevo.

Tras ello, se realizan ciclos en los que se fluye de nuevo la sonda complementaria del MB y se deshibrida con agua, pero en esta ocasión no se observan cambios en masa. Puede deberse a que el MB no puede adquirir la conformación de horquilla tras la deshibridación de la sonda complementaria y de algún modo impide la detección de la hibridación. Este mecanismo es desconocido, pero coincide con resultados previos del grupo de trabajo en los que la hibridación de una sonda lineal anclada sobre la superficie del chip con su cadena complementaria no era detectada. Esto parece indicar que el hecho de presentar la sonda de manera lineal dificulta la detección de la hibridación.

Por otra parte, es importante prestar atención a la disipación observada al fluir tanto la sonda como la estreptavidina, ya que proporciona información acerca de las propiedades viscoelásticas de la capa que se encuentra sobre la superficie del chip. Tras fluir la sonda complementaria, la disipación aumenta $0,4 \cdot 10^{-6}$ (Anexo figura 25a), mientras que tras fluir estreptavidina este aumento es de $2,5 \cdot 10^{-6}$ (Anexo figura 25b). Una vez ha tenido lugar la hibridación con la sonda complementaria la doble hélice resultante es menos rígida que el MB en conformación de horquilla. Sin embargo, tras la unión de la estreptavidina, que posee un alto peso molecular (378,709 g/mol), el complejo se vuelve rígido, siendo esta la causa del aumento de la disipación.

4.4.2. Estudios de hibridación con MB unidos a nanopartículas

4.4.2.1 Funcionalización de nanopartículas

Al igual que la estreptavidina influye en la masa y el modo de interaccionar del MB con la sonda complementaria, se espera que el acoplamiento del MB con NPs también influya, incluso de un modo mucho más notable puesto que el MB con NPs tiene una mayor densidad y un cambio en el índice de refracción. Este estudio permite una futura aplicación en sistemas de sensado, como puede ser incluyendo NPs de oro para SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering), CdS sobre TiO₂ en electroquímica (Li *et al*, 2015), etc.

Para comprobarlo, las NPs se funcionalizan con ácido 3,4-dihidroxibenzoico, DHBA (Figura 25). Para ello, las NPs son mezcladas con DHBA, añadiendo NaOH 0,1 M a continuación para formar una sal soluble en agua que queda en el sobrenadante tras centrifugar. Seguidamente se añade HCl 0,1 M, protonando así los grupos ácido. Tras centrifugar, las NPs funcionalizadas quedan en el precipitado. La adición de DHBA permitirá el acoplamiento de NPs y MB entre los grupos carboxílicos de las NPs así funcionalizadas y el grupo amina que contiene el MB.

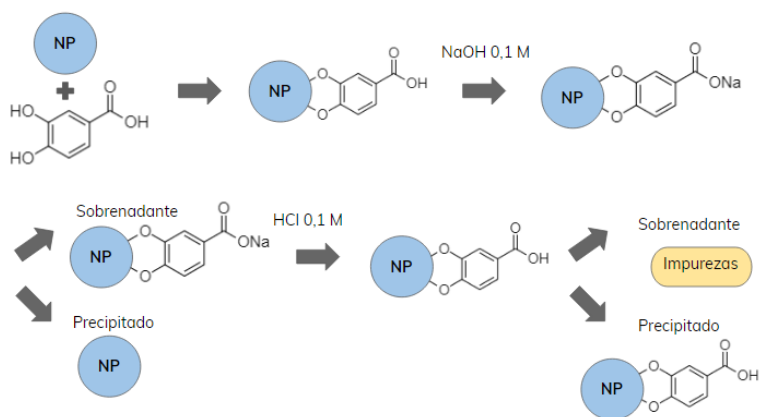


Figura 25. Esquematación de los pasos seguidos en la funcionalización de las NPs con 3,4 DHBA. Se mezclan las NPs con DHBA. Se añade NaOH 0,1 M obteniendo una sal, que queda en el sobrenadante tras centrifugar, eliminando las NPs no funcionalizadas en el precipitado. Se añade HCl 0,1 M, protonando los grupos ácidos. Tras centrifugar, las NPs funcionalizadas y purificadas se encuentran en el precipitado.

Tras la funcionalización de NPs, se calcula el rendimiento de la reacción como se explicó anteriormente. Se pesa el tubo previamente tarado que contiene las NPs sin funcionalizar, siendo este 4,42 mg. Puesto que la masa de NPs de la que se parte es 6,48 mg, el total de NPs que han sido funcionalizadas es de 2,06 mg, es decir, el 32%.

A continuación, se realiza un espectro de infrarrojo para detectar si la funcionalización ha sido correcta. Se obtienen espectros de NP sin funcionalizar y NPs funcionalizadas con DHBA. El espectro de infrarrojo obtenido se muestra en la figura 26.

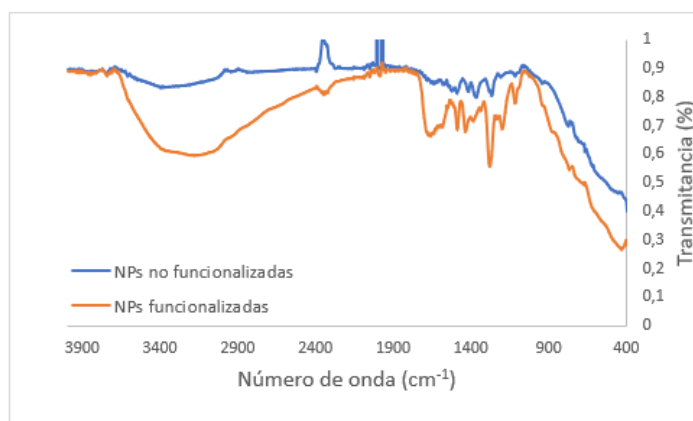


Figura 26. Espectro de infrarrojo de NP funcionalizadas con DHBA y sin funcionalizar

En la gráfica se observan diferencias en el espectro infrarrojo en función de si las NPs están o no funcionalizadas. Si las NPs están funcionalizadas con DHBA, se observan bandas en las zonas de 1600-1700 y 3300 cm^{-1} , a diferencia de NPs sin funcionalizar. Las bandas encontradas en la región de 1600-1700 cm^{-1} son debidas a la presencia de los enlaces C=O del grupo carboxílico del ácido (Jankovic *et al*, 2009). La banda de la región de 3300 cm^{-1} es debida a los enlaces hidroxilo de DHBA.

Gracias a las diferencias observadas en las regiones del infrarrojo explicadas anteriormente, se puede determinar que la funcionalización de NPs con 3-4 DHBA para su posterior acoplamiento covalente con MB se ha llevado a cabo con éxito.

4.4.2.2. Acoplamiento covalente de NPs con MB

A continuación, se lleva a cabo el acoplamiento de las NP con el MB3 que contiene un grupo amina cercano al extremo 3' y fluoresceína en el extremo 3' (máximo de absorción de la fluoresceína es de 496 nm, Ou *et al*, 2001), mediante la reacción de formación del éster activo con EDC/NHS y posterior desplazamiento con el grupo amino del MB para dar lugar a la formación de un enlace tipo amida (Figura 27). Para ello, las NPs funcionalizadas, NHS, MB3 y EDC son diluidos en tampón MES 0,1 M, obteniendo finalmente las NPs acopladas a los MBs.

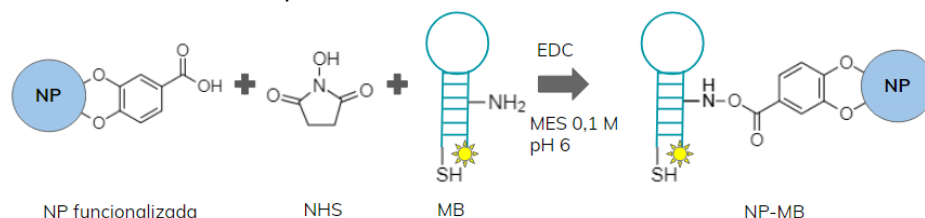


Figura 27. Esquematización de los pasos seguidos en el acoplamiento de NP-MB. Las NPs funcionalizadas con DHBA y purificadas son diluidas en el tampón MES 0,1 M con NHS, EDC y el MB3, resultado en la formación del complejo NP-MB.

Una vez finalizado el acoplamiento, se procede a purificar las NPs como se ha descrito anteriormente. Para comprobar si el acoplamiento ha sido realizado correctamente se realizan medidas de absorbancia de la disolución de acoplamiento antes de la reacción ($t = 0$ h), al acabar la reacción ($t = 20$ h) y a los sobrenadantes retirados tras realizar centrifugaciones para purificar las NP con MB. Se espera que en el primer sobrenadante se encuentre MB que no se ha unido a las NP y se observe absorbancia en la zona de 493 nm, longitud de onda en la cual se encuentra el máximo de absorción de fluoresceína, y que esta cantidad disminuya según se realizan centrifugaciones. Los resultados se muestran en la figura 28.

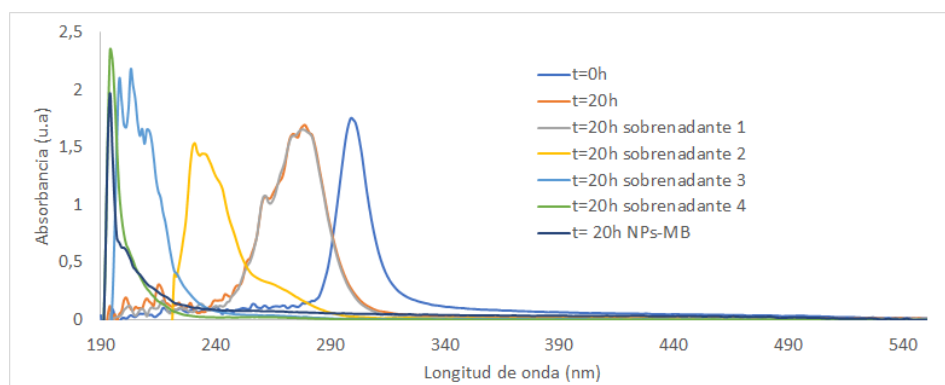


Figura 28. Absorbancias de las soluciones que contienen NP y MB a diferentes tiempos tras el acoplamiento EDC/NHS.

Lo primero que llama la atención es que no se observa absorbancia correspondiente a la fluoresceína, lo cual puede deberse a que el complejo NP-MB modifica las propiedades ópticas de la fluoresceína, pudiendo ser debido a su interacción con el complejo NP-MB (Rajh *et al*, 2004).

En la figura se observa un máximo de absorbancia a 300 nm antes de llevar a cabo la reacción ($t=0$ h), mientras que esta longitud de onda es de 280 nm una vez que se ha realizado el acoplamiento NP-MB ($t=20$ h). Tras los ciclos de centrifugación, eliminación de sobrenadante y resuspensión, las NPs quedan en el precipitado y el MB no unido así como el resto de EDC/NHS y subproductos de reacción se eliminan en los sobrenadantes. Por tanto, se observa una absorbancia de 194 nm en el precipitado

final correspondiente a las NPs unidas a MB (t=20h NP-MB). En el primer y segundo sobrenadante quedan los MB sin acoplar (absorbancia en torno a 270-280 nm y 240 para las NPs muy diluidas). En el tercer y cuartos sobrenadantes se observa una absorbancia muy similar a las NPs por lo que se demuestra la eliminación de cualquier remanente de MB no unido a las NPs.

Los análisis de absorbancia no parecen ser concluyentes por lo que se realizarán ensayos de fluorescencia para demostrar el acoplamiento entre NPs y MB.

El MB acoplado a las NPs está marcado con fluoresceína por lo que a continuación, para corroborar el acoplamiento, se realizan medidas de fluorescencia a 493 nm (máximo de absorción de la fluoresceína, longitud de onda a la cual no absorben las NPs) presente en las soluciones anteriores para comprobar si el MB está unido a las NPs, mostrando los resultados en la tabla 5.

Tabla 5. Medidas de fluorescencia a 500 nm de los sobrenadantes obtenidos tras el acoplamiento EDC/NHS y la solución final que contiene NP y MB.

	Fluorescencia (u.a)
Sobrenadante 1	2674
Sobrenadante 2	262
Sobrenadante 3	200
Sobrenadante 4	174
NP+MB	272

Se puede observar que la cantidad de MB presente en los sobrenadantes disminuye drásticamente según se realizan centrifugaciones, mientras que la solución que contiene el precipitado resuspendido en tampón MES tiene una mayor emisión que los últimos sobrenadantes. Estos resultados sí parecen confirmar la presencia de NPs unidas a MB, ya que aparece fluorescencia en el precipitado resuspendido en MES conteniendo las NPs unidas a MB que tiene fluoresceína. También se demuestra que se ha eliminado el MB libre en disolución al haber una fluorescencia muy baja en los últimos sobrenadantes; por tanto, la fluorescencia solo puede venir dada por la fluoresceína de los MBs que han quedado anclados a las NPs que han sido precipitadas mediante la centrifugación.

Sin embargo, la fluorescencia es más baja de lo esperado, lo que puede ser debido a interacciones con moléculas a través del ADN, afectando negativamente a la fluorescencia, ya que estudios anteriores (Dimitrijevic *et al*, 2003) mostraron que otros complejos basados en NPs similares eran capaces de reducir plata.

Se realiza otro experimento para demostrar la unión NP-MB, que consiste en hibridar estas NPs con MB con la sonda complementaria a una concentración de 0.5 μ M en SSC 1X y comprobar su fluorescencia. Tras llevar a cabo la hibridación, se realizan ciclos de centrifugación, eliminación de sobrenadante y resuspensión. Finalmente, se analiza la fluorescencia de los sobrenadantes, al igual que la de la solución que contiene NP-MB tras la hibridación con la sonda complementaria. Además, se añade un control positivo (sonda complementaria) y un control negativo (NP-MB). Los resultados se muestran en la tabla 6a.

El mismo experimento fue llevado a cabo, pero en lugar de con el complejo NP-MB, con las NPs funcionalizadas y purificadas para demostrar de este modo que la fluorescencia observada tras la hibridación de la sonda complementaria con el MB acoplado a NP no es debida a adsorciones inespecíficas sobre las NPs. Los resultados de fluorescencia de los sobrenadantes, control negativo

(NPs), control positivo (sonda complementaria) y precipitado que contiene las NPs y la sonda complementaria que se pueda haber adsorbido sobre ella se recogen en la tabla 6b.

Tabla 6. Resultados de fluorescencia de los sobrenadantes, controles negativos y positivos y a) de la hibridación del complejo NP-MB con la sonda complementaria, b)

a	Fluorescencia (u.a)	b	Fluorescencia (u.a)
Sobrenadante 1	37175	Sobrenadante 1	40159
Sobrenadante 2	7263	Sobrenadante 2	11274
Sobrenadante 3	2094	Sobrenadante 3	1946
Sobrenadante 4	1774	Sobrenadante 4	1408
Control - (NP+MB)	1651	Control - (NPs)	358
Control + (sonda complementaria)	53492	Control + (sonda complementaria)	51335
NP+MB+sonda complementaria	29115	NPs + sonda complementaria	1727

En ambos casos los resultados de los sobrenadantes coinciden con los esperados, ya que la sonda con el fluoróforo se va eliminando en los sobrenadantes, y los controles negativos del complejo NP-MB o NPs sin sonda complementaria no presentan fluorescencia diferenciable del ruido. Cuando la hibridación tiene lugar, la fluorescencia de la sonda complementaria no está afectada por el complejo NP-MB. Sin embargo, la de la fluoresceína sí que se está afectada como se ha visto en el experimento anterior, pudiendo esto ser debido a que la presencia de un enlace covalente entre el MB y las NPs genera interacciones energéticas. Puesto que en el caso de la hibridación no se encuentran estos enlaces covalentes, la fluorescencia de la sonda complementaria no disminuye.

En el control positivo de las dos tablas que contiene únicamente la sonda complementaria marcada se observa fluorescencia, indicando que no se ha producido ningún error en la medida de las fluorescencias.

Por su parte, la solución que contiene el complejo NP-MB que ha hibridado con la sonda complementaria presenta una fluorescencia de 29115 u.a, lo que indica, junto con los experimentos anteriores, que el acoplamiento se ha realizado correctamente. En este caso, el MB unido a las NPs es capaz de hibridar con la sonda complementaria, observándose fluorescencia en las NPs que se han purificado tras la hibridación en disolución.

En cuanto a la tabla 6b, puede observarse una fluorescencia de 1727 u.a cuando se incuban las NPs con la sonda complementaria, no diferenciable del ruido. De este modo se demuestra que no tiene lugar una adsorción inespecífica de la sonda complementaria sobre las NPs que pueda interferir en los resultados mostrados en los experimentos realizados en la QCM.

Así, se demuestra que el MB acoplado con NPs es capaz de hibridar con la sonda complementaria en disolución, pero también debe demostrarse que esta hibridación es posible cuando el complejo NP-MB está inmovilizado covalentemente sobre una superficie, ya que posteriormente se llevará a cabo un experimento en la QCM. Para ello, se imprimen sobre un chip de vidrio previamente funcionalizado diferentes MB a una concentración de 2,5 μM , además de NPs y el complejo NP-MB. Estos MB son el MB3 (el mismo que está acoplado con las NPs y por tanto complementario a la sonda

de interés), MB5 que no es complementario a la sonda y MB1 como control de una correcta inmovilización ya que posee el fluoróforo Cy5 en el extremo 5', siendo también complementario a la sonda de interés. A continuación, el chip se irradia y se lava. La imagen de fluorescencia en la que solo se observa fluorescencia en el MB1 se encuentra en la figura 29a.

Tras la inmovilización, el chip se hibrida con la sonda complementaria diluida en SSC 1X a una concentración de 0.5 μ M. Las imágenes de fluorescencia se encuentran en la figura 29b.

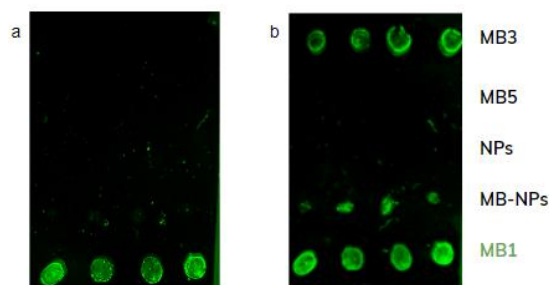


Figura 29. Imágenes de fluorescencia de chip de vidrio que contienen MB3, MB5, NPs, NP-MB y MB1 a) tras lavar b) tras hibridar con la sonda complementaria.

Se comprueba que el MB3 hibrida con la sonda complementaria, obteniendo una intensidad de fluorescencia de $15670,10 \pm 1230,76$ u.a. También se observa que no tiene lugar hibridación con el MB5, no complementario de la sonda, ni con las NPs. Por otra parte, el complejo NP-MB sí hibrida con la sonda, obteniendo una intensidad de fluorescencia de $20247,33 \pm 3113,55$ u.a, demostrando así que el complejo NP-MB es capaz de interactuar con la sonda complementaria cuando está anclado a una superficie. Finalmente, se observa una intensidad de fluorescencia de $19201,20 \pm 4181,37$ u.a en el MB1, demostrando que la inmovilización ha sido correcta.

4.4.2.3 Ensayo de hibridación en QCM de MB conjugados a NPs

Se estudia en la QCM el cambio conformacional del MB acoplado a las NPs dado por la hibridación. Se espera ver diferencias en la variación de masa comparado con la respuesta obtenida por el MB solo. Esta diferencia en la masa sería debida al cambio conformacional sufrido por el MB tras la hibridación con la cadena complementaria. Esto supone la apertura de la horquilla, alejando de este modo las NPs de la superficie del chip, disminuyendo así la masa cercana a la superficie del sensor, modificando así la señal registrada por la QCM.

Para ello se funcionaliza un chip de QCM con grupos vinilo y se inmoviliza el MB3 acoplado con NPs. A continuación, se fluye una solución que contiene la sonda complementaria a 0,5 μ M en SSC 2X, seguido de deshibridaciones con agua destilada e hibridaciones de nuevo con la sonda (figura 30).

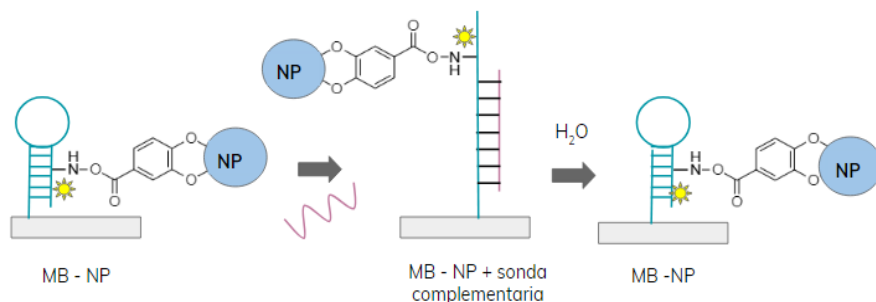


Figura 30. Representación de los pasos seguidos en el experimento realizado en la QCM. El complejo NP-MB anclado a la superficie hibrida con la sonda complementaria, sufriendo un cambio conformacional. A continuación, se deshibrida con agua. Las moléculas representadas no están a escala.

Previo a la adición de la sonda complementaria se fluye SSC 2X, el mismo que ha sido empleado en la preparación de la solución que contiene la sonda complementaria. El resultado se muestra en la figura 31.

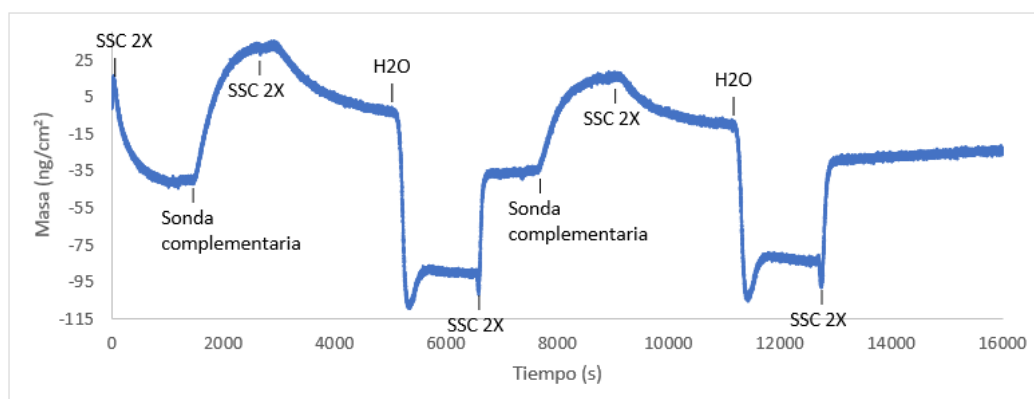


Figura 31. Relación entre el tiempo y el cambio de masa observado tras fluir la sonda complementaria sobre un chip de cuarzo que tiene inmovilizado MB acoplado con NP.

Tras la estabilización del sensor en SSC 2X se fluye la solución que contiene la sonda complementaria, observando un salto en masa de $36,33 \text{ ng/cm}^2$ ($4,91 \text{ pmol/cm}^2$). Este salto de masa es calculado después de restar la masa eliminada de la superficie del chip tras fluir SSC 2X, que elimina las moléculas que se han podido unir inespecíficamente. Este aumento es similar al observado en el caso de fluir la sonda sobre una superficie que únicamente tiene MB ($37,45 \text{ ng/cm}^2$, realizado en el ensayo con estreptavidina) a diferencia de una que contiene MB acoplado a NPs y la diferencia se considera despreciable. Se esperaría que la masa fuera mayor ya que, tras el cambio de conformación sufrido por el MB tras la hibridación con la sonda complementaria, las NPs se alejan de la superficie, lo que aumentaría la señal.

Por otra parte, al comparar la densidad de inmovilización obtenida con respecto a la máxima densidad observada en la recta de calibrado del MB, siendo esta $9,19 \text{ pmol/cm}^2$, se puede comprobar que no todo el MB inmovilizado ha hibridado con la sonda complementaria fluida, obteniendo un rendimiento del 52,32%.

Después de deshibridar con agua, se fluye SSC 2X. La pérdida de masa observada es de $33,53 \text{ ng/cm}^2$, siendo muy similar a aquella obtenida tras fluir la sonda complementaria. De este modo se muestra que la deshibridación ha sido satisfactoria volviendo el sistema al punto inicial.

A continuación, se hibrida de nuevo con la sonda complementaria y se deshibrida con agua. Esto contrasta con lo observado en el experimento anterior en el que la estreptavidina estaba unida a la biotina del MB2, en el que no se observaban nuevas hibridaciones tras deshibridar con agua, pudiendo deberse a la imposibilidad de restaurar la conformación de horquilla cuando hay una proteína unida a los MBs.

En cuanto a la disipación, el aumento observado tras fluir la sonda complementaria es de $0.4 \cdot 10^{-6}$, el mismo que si no hubiera NPs presentes (en el experimento previo con estreptavidina). Se esperaría que la disipación en el caso de encontrar NPs ancladas al MB fuera mayor, ya que las propiedades viscoelásticas del complejo inmovilizado sobre la superficie son diferentes debido a la presencia de las NPs en los MB.

El hecho de observar que los saltos en masa cuando hay o no NPs presentes sean iguales, que se observen hibridaciones tras deshibridar con agua y que la disipación sea la misma que cuando no hay NPs presentes parece indicar que las NPs se han desconjugado del complejo o que exista otro efecto que hace que las NPs no den la señal esperada en QCM ya que se observan comportamientos similares a los encontrados cuando el MB está inmovilizado sobre la superficie sin formar ningún complejo.

Es por ello que se podría realizar un análisis en SEM o AFM de los chips tras realizar el experimento en la QCM para comprobar si las NPs están presentes. En caso negativo se deberían investigar formas diferentes de anclar las NPs a los MB que sean más resistentes para de este modo poder conocer los efectos que tienen las NPs en la amplificación o no de la señal observada en la QCM tras la hibridación del MB con su cadena complementaria.

5. CONCLUSIÓN

Después de estudiar los parámetros óptimos necesarios para la correcta inmovilización de los MBs sobre las superficies tanto de vidrio como de los chips de QCM, se llevaron a cabo diversos ensayos en formato *microarray* para conocer la máxima densidad de inmovilización que se puede obtener de los MBs y los rendimientos de hibridación alcanzados (14% en el caso de trabajar en formato *microarray* y 54% con QCM). En este formato también se estudió la respuesta obtenida en la hibridación entre un MB con estreptavidina, unida gracias a una biotina próxima a su extremo 3', y su cadena complementaria, conociendo así que la presencia de estreptavidina no impide la hibridación entre ambos.

Sin embargo, al llevar a cabo este experimento en la QCM no se observaron hibridaciones cuando la estreptavidina está unida al MB, pudiendo deberse a que esta dificulta la restauración de la conformación de horquilla tras la deshibridación de la sonda con agua, lo que impide de algún modo observar señal en la QCM como se observa para oligonucleótidos lineales.

Por otra parte, también se realizaron experimentos en los que se acoplaron NPs y MBs, siendo a continuación inmovilizados sobre chips vidrio y comprobando que tiene lugar la hibridación entre el MB y su sonda complementaria. Posteriormente, se inmovilizó el complejo NP-MB sobre la superficie de un chip de QCM, y se realizaron ciclos de hibridación con la sonda complementaria y deshibridación con agua. Los resultados obtenidos pueden indicar que ha tenido lugar la desconjugación de las NPs ya que no parecen estar presentes.

En base a los resultados obtenidos, se deberían realizar futuros estudios para conocer el por qué no se observan hibridaciones cuando el MB inmovilizado sobre los chips de QCM se encuentra de modo lineal. Además, se pueden investigar nuevas formas de acoplar las NPs a los MBs que sean más resistentes y no tenga lugar la desconjugación.

6. BIBLIOGRAFÍA

Al-Haidari, A., Algaber, A., Madhi, R., Syk, I., & Thorlacius, H. (2018). MiR-155-5p controls colon cancer cell migration via post-transcriptional regulation of Human Antigen R (HuR). *Cancer Letters*, 421, 145–151.

Bak, T., Nowotny, J., Sucher, N. J., & Wachsman, E. (2011). Effect of Crystal Imperfections on Reactivity and Photoreactivity of TiO₂ (Rutile) with Oxygen, Water, and Bacteria. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(32), 15711–15738.

Bragazzi, N. L., Amicizia, D., Panatto, D., Tramalloni, D., Valle, I., & Gasparini, R. (2015). Quartz-Crystal Microbalance (QCM) for Public Health. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 149–211.

Brogan, K. L., Shin, J. H., & Schoenfisch, M. H. (2004). Influence of Surfactants and Antibody Immobilization Strategy on Reducing Nonspecific Protein Interactions for Molecular Recognition Force Microscopy. *Langmuir*, 20(22), 9729–9735.

Campàs, M., Katakis, I. (2004). DNA biochip arraying, detection and amplification strategies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(1), 49–62.

Dandy, D. S., Wu, P., & Grainger, D. W. (2007). Array feature size influences nucleic acid surface capture in DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), 8223–8228.

Dimitrijevic, N. M., Saponjic, Z. V., Bartels, D. M., Thurnauer, M. C., Tiede, D. M., & Rajh, T. (2003). Revealing the Nature of Trapping Sites in Nanocrystalline Titanium Dioxide by Selective Surface Modification†. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(30), 7368–7375.

Dufva, M. (2005). Fabrication of high quality microarrays. *Biomolecular Engineering*, 22(5-6), 173–184.

Early detection of cancer. (2016, January 21). World Health Organization. Retrieved from <http://www.who.int/cancer/detection/en/>

Epstein, J. R., Biran, I., Walt, D. R. (2002). Fluorescence-based nucleic acid detection and microarrays. *Analytica Chimica Acta*, 469(1), 3–36.

Ertekin, Ö., Öztürk, S.; Öztürk, Z. (2016). Label Free QCM Immunobiosensor for AFB1 Detection Using Monoclonal IgA Antibody as Recognition Element. *Sensors*, 16(8), 1274.

Escorihuela, J., Bañuls, M.-J., Grijalvo, S., Eritja, R., Puchades, R., & Maquieira, Á. (2014). Direct Covalent Attachment of DNA Microarrays by Rapid Thiol–Ene “Click” Chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, 25(3), 618–627.

Espina, V., Woodhouse, E. C., Wulfkühle, J., Asmussen, H. D., Petricoin, E. F., & Liotta, L. A. (2004). Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies. *Journal of Immunological Methods*, 290(1-2), 121–133.

Fuchs, J., Fiche, J.-B., Buhot, A., Calemczuk, R., & Livache, T. (2010). Salt Concentration Effects on Equilibrium Melting Curves from DNA Microarrays. *Biophysical Journal*, 99(6), 1886–1895.

- Hanada, T., Kobayashi, T., Chinen, T., Saeki, K., Takaki, H., Koga, K., Minoda, Y., *et al.* (2006). IFN γ -dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(6), 1391–1397.
- He, L.-Y., Wei, X., Du, L., Liu, L., Xu, F., Min, J., Li, C., *et al.* (2013). Remarkably reduced expression of FoxO3a in metaplastic colorectum, primary colorectal cancer and liver metastasis. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 33(2), 205–211.
- Higgs, G., Slack, F. (2013). The multiple roles of microRNA-155 in oncogenesis. *Journal of Clinical Bioinformatics*, 3(1), 17.
- Hoang, V. V., Zung, H., Trong, N. H. (2007). Structural properties of amorphous TiO₂ nanoparticles. *The European Physical Journal D*, 44(3), 515–524.
- Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. (2010). Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(9), 1540–1573.
- Ito, Y. (2006). Photoimmobilization for Microarrays. *Biotechnology Progress*, 22(4), 924–932.
- Janković, I. A., Šaponjić, Z. V., Čomor, M. I., & Nedeljković, J. M. (2009). Surface Modification of Colloidal TiO₂ Nanoparticles with Bidentate Benzene Derivatives. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(29), 12645–12652.
- Johnson, I.; Spence, M. T. Z. (2010). *The molecular probes handbook a guide to fluorescent probes and labeling technologies*. Life Technologies.
- Kong, W., He, L., Coppola, M., Guo, J., Esposito, N. N., Coppola, D., & Cheng, J. Q. (2010). MicroRNA-155 Regulates Cell Survival, Growth, and Chemosensitivity by Targeting FOXO3 in Breast Cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17869–17879.
- Li, S., Wang, Y., Gao, C., Ge, S., Yu, J., & Yan, M. (2015). “Signal-off” photoelectrochemical DNA sensing strategy based on target dependent DNA probe conformational conversion using CdS quantum dots sensitized TiO₂ nanorods array as photoactive material. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 759, 38–45.
- Liu, F., Su, X.-L., Li, Y. (2006). Detection of Escherichia coli O157:H7 using a QCM Immunosensor with Nanoparticle Amplification. *2006 Portland, Oregon, July 9-12, 2006*.
- Liu, H. (2010). Microarray probes and probe sets. *Frontiers in Bioscience*, E2(1), 325–338.
- Liu, J., Huang, W., Yang, H., Luo, Y. (2015). Expression and function of miR-155 in breast cancer. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(5), 840–843.
- López, M.; Vega, M. (2002). Microarrays y biochips de ADN, Informe de Vigilancia Tecnológica. Genoma España-CIBT-FGUAM.
- López, M.; Mallorquín, P.; VEGA, M. (2005). Aplicaciones de los microarrays y biochips en salud humana. Genoma España-CIBT-FGUAM.
- Mccarthy, B. J., & Church, R. B. (1970). The Specificity of Molecular Hybridization Reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 39(1), 131–150.

- Nimse, S., Song, K., Sonawane, M., Sayyed, D., & Kim, T. (2014). Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications. *Sensors*, *14*(12), 22208–22229.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4619–4626.
- Paunesku, T., Rajh, T., Wiederrecht, G., Maser, J., Vogt, S., Stojićević, N., Protić, M., *et al.* (2003). Biology of TiO₂-oligonucleotide nanocomposites. *Nature Materials*, *2*(5), 343–346.
- Pohanka, M. (2017). The Piezoelectric Biosensors: Principles and Applications, a Review. *International Journal of Electrochemical Science*, 496–506.
- Purcar, V., Cinteza, O., Ghiurea, M., Balan, A., Caprarescu, S., & Donescu, D. (2014). Influence of hydrophobic characteristic of organo-modified precursor on wettability of silica film. *Bulletin of Materials Science*, *37*(1), 107–115.
- Rajh, T., Saponjic, Z., Liu, J., Dimitrijevic, N. M., Scherer, N. F., Vega-Arroyo, M., Zapol, P., *et al.* (2004). Charge Transfer Across the Nanocrystalline-DNA Interface: Probing DNA Recognition. *Nano Letters*, *4*(6), 1017–1023.
- Reddy, K. B. (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell International*, *15*(1).
- Rodrigues, P., Macaya, I., Bazzocco, S., Mazzolini, R., Andretta, E., Dopeso, H., Mateo-Lozano, S., *et al.* (2014). RHOA inactivation enhances Wnt signalling and promotes colorectal cancer. *Nature Communications*, *5*(1).
- Sasi, W., Jiang, W. G., Sharma, A., & Mokbel, K. (2010). Higher expression levels of SOCS 1,3,4,7 are associated with earlier tumour stage and better clinical outcome in human breast cancer. *BMC Cancer*, *10*(1).
- Schena, M. (1998). Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends in Biotechnology*, *16*(7), 301–306.
- Scientific, B. (n.d.). Biolin Scientific. *Measurements*. Retrieved from <https://www.biolinscientific.com/>
- Seven, M., Karatas, O. F., Duz, M. B., & Ozen, M. (2014). The role of miRNAs in cancer: from pathogenesis to therapeutic implications. *Future Oncology*, *10*(6), 1027–1048.
- Syahir, A., Usui, K., Tomizaki, K.-Y., Kajikawa, K., & Mihara, H. (2015). Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays. *Microarrays*, *4*(2), 228–244.
- Templin, M. F., Stoll, D., Schrenk, M., Traub, P. C., Vöhringer, C. F., & Joos, T. O. (2002). Protein microarray technology. *Drug Discovery Today*, *7*(15), 815–822.
- Tyagi, S; Kramer, F. R. (2012). Molecular Beacons in Diagnostics. *F1000 Medicine Reports*, *4*.
- Weinrich, D., Köhn, M., Jonkheijm, P., Westerlind, U., Dehmelt, L., Engelkamp, H., Christianen, P. C. M., *et al.* (2009). Preparation of Biomolecule Microstructures and Microarrays by Thiol-ene Photoimmobilization. *ChemBioChem*, *11*(2), 235–247.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, *302*(1), 1–12.

7. ANEXO

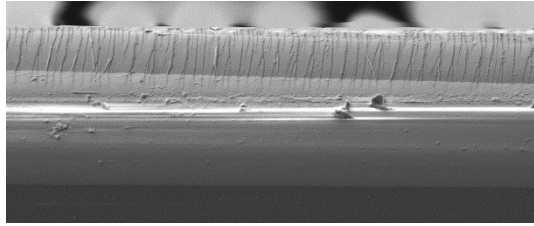


Figura anexo 1. Corte transversal de chip de QCM obtenida por FIB.

Tabla anexo 1. Modificaciones del ADN y sus respectivas modificaciones de la superficie necesarias para llevar a cabo la inmovilización correspondiente, junto con el tipo de inmovilización relacionado.

Modificación de ADN	Modificación de la superficie	Tipo de inmovilización
Ninguna	Polilisina Amina Epoxy Membrana Película de agarosa	Física
Tiol (-SH)	Oro Mercaptosilano Maleimida Iodoacetil	Covalente
Amina (-NH ₂)	Aldehído Epoxy Isotiocianato	Covalente
Fosfatos (PO ₃)	Sustratos aminados	Covalente
Biotina	Estreptavidina	Bioafinidad

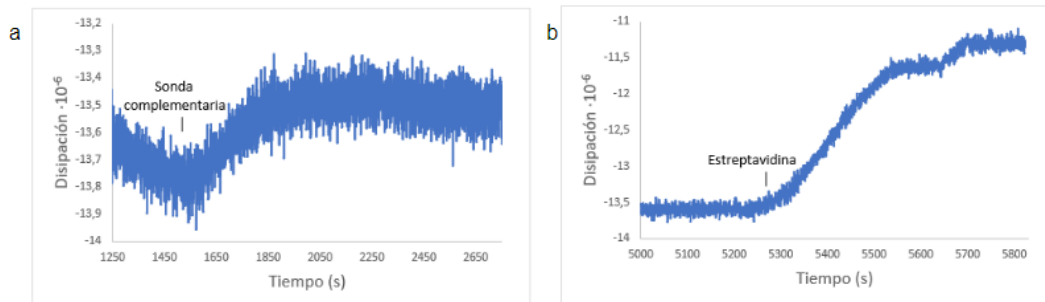


Figura anexo 2. Valores de disipación frente al tiempo al fluir a) la sonda complementaria y b) estreptavidina.