



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA BIOSENSADO COLORIMÉTRICO DE ÁCIDOS NUCLEICOS. SISTEMAS, APLICACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Curso 2019/2020

ALUMNA: Aurora López Jareño

TUTOR: Luis Antonio Tortajada Genaro

Valencia, julio 2020



DATOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO

Título:	Nanopartículas de oro para biosensado colorimétrico de ácidos nucleicos. Sistemas, aplicaciones y perspectivas de futuro.
Autora:	Dña. Aurora López Jareño
Titulación:	Grado en Biotecnología
Tutor:	D. Luis Antonio Tortajada Genaro
Localidad y fecha:	Valencia, julio de 2020

RESUMEN

El presente trabajo consiste en una revisión bibliográfica enfocada a analizar y comparar las diferentes estrategias colorimétricas basadas en la interacción de los ácidos nucleicos con las nanopartículas de oro.

En la actualidad, las técnicas de secuenciación y los métodos basados en PCRq constituyen las técnicas de referencia para el análisis de ácidos nucleicos. Sin embargo, estas implican tiempos de ejecución largos, elevado coste económico y la necesidad de personal cualificado, por lo que no pueden ser aplicadas directamente como dispositivos *point-of-care* en instalaciones con bajos recursos, en situaciones de emergencia o como tests masivos. En este sentido, la nanotecnología ha aportado alternativas interesantes que posibilitan la detección de ADN de una forma sencilla y rápida. Una estrategia con elevado potencial es el biosensado mediante nanopartículas de oro.

Esta revisión analiza el principio de detección colorimétrico de ADN tras su biorreconocimiento molecular en la superficie de las nanopartículas de oro, y realiza un recorrido por todos los formatos de ensayo surgidos a partir de este principio. Una primera categoría agrupa los ensayos basados en agregación de nanopartículas, que se dividen a su vez en agregación *crosslinking*, agregación *non-crosslinking* y agregación reversible. La segunda categoría correspondería con los métodos basados en hibridación de superficie, incluyendo los ensayos en formato de micromatriz y en formato de flujo lateral.

Además, en este trabajo también se examinan las principales aplicaciones a las que ha sido dirigida esta tecnología, siendo el diagnóstico molecular una de las más destacadas. Finalmente, se discuten los avances más recientes y los desafíos futuros para lograr la validación clínica y la comercialización de estas plataformas analíticas como dispositivos *point-of-care*.

PALABRAS CLAVE

Biosensado de ADN; nanopartículas de oro; *point-of-care*; colorimetría; diagnóstico clínico

ABSTRACT

This bibliographical review is focussed on analysing and comparing among the different colorimetric techniques based on nucleic acids-gold nanoparticles interaction.

Nowadays, sequencing strategies and qPCR techniques constitute the gold-standard methods for DNA detection. However, they are time consuming and expensive due to specialized personnel and equipment required, thus they cannot be directly implemented as point-of-care devices. In this regard, nanotechnology is developing interesting alternatives to address DNA detection in a simple and rapid way. One of these promising strategies consists of naked-eye gold nanoparticles-based sensing.

This review analyses the colorimetric principle of these nanomaterials, its interaction mechanisms with DNA molecules, and describes all the test formats that emerged from this principle, which have been divided into two main categories. The first one consists of nanoparticles aggregation, which can be subdivided in crosslinking, non-crosslinking and reverse aggregation; while the other strategy is based on surface hybridization, which include microarray platforms and lateral flow assays.

Furthermore, this review also discusses the cutting-edge applications of these systems, highlighting its utility in molecular diagnostics. Finally, the more recent advances are discussed, as well as the future challenges to achieve the clinical validation and commercial outcome of this point-of-care platforms.

KEYWORDS

DNA biosensor; gold nanoparticles; point-of-care; colorimetric; clinical diagnosis.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría darle las gracias a todas las personas que me han ayudado a poder realizar este Trabajo Fin de Grado directa o indirectamente.

En primer lugar, quiero darle las gracias a Luis Tortajada por ser mi guía. Me siento muy agradecida por su incansable ayuda, especialmente en los momentos más difíciles.

También quiero hacer una mención especial a Ana, por su infinita paciencia, y por todo lo que he aprendido de ella en el laboratorio.

Al resto de integrantes del laboratorio también les doy las gracias por haberme acogido con los brazos abiertos desde el primer momento.

Por supuesto, no me olvido de mis padres, ellos son los grandes responsables de que haya podido iniciar y ahora finalizar esta etapa académica. Al resto de familia y amigos también les doy las gracias porque junto a ellos todo es más fácil.

Gracias a mis amigos que he conocido durante esta etapa, con los que he compartido momentos inolvidables que ya recuerdo con nostalgia.

Y, por último, tampoco me olvido de todos mis maestros y profesores de los que tanto he aprendido desde mi infancia hasta ahora. Gracias por haber sembrado en mí la inquietud por aprender.

Gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	1
1.2. TÉCNICAS CONVENCIONALES DE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	1
1.2.1. MÉTODOS BASADOS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	1
1.2.2. MÉTODOS BASADOS EN LA SECUENCIACIÓN	2
1.2.3. LIMITACIONES	2
1.3. TECNOLOGÍA POINT-OF-CARE	3
1.3.1. ESCENARIOS DE APLICACIÓN	3
1.3.2. DESCRIPCIÓN	3
1.3.3. CONTRIBUCIÓN DE LOS NANOMATERIALES	4
2. OBJETIVOS	6
3. PRINCIPIO DE BIOSENSADO	7
3.1. NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS	7
3.1.1. SÍNTESIS DE AuNPs	7
3.1.2. NATURALEZA DE LA Sonda INMOVILIZADA	8
3.1.3. EFICIENCIA DE LA FUNCIONALIZACIÓN	8
3.2. BIORRECONOCIMIENTO Y TRANSDUCCIÓN ÓPTICA	9
4. SISTEMAS DE BIOSENSADO	11
4.1. SISTEMAS BASADOS EN LA AGREGACIÓN DE AuNPs	11
4.1.1. AGREGACIÓN <i>CROSSLINKING</i>	11
4.1.2. AGREGACIÓN <i>NON-CROSSLINKING</i>	15
4.1.3. AGREGACIÓN REVERSIBLE	21
4.1.4. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LAS PRESTACIONES	22
4.2. SISTEMAS BASADOS EN HIBRIDACIÓN EN SUPERFICIE	23
4.2.1. ENSAYOS EN FORMATO DE MICROMATRIZ	23
4.2.2. ENSAYOS EN FORMATO DE FLUJO LATERAL	25
4.3. OTROS SISTEMAS	28
4.3.1. SISTEMAS EN DISOLUCIÓN	28
4.3.2. SISTEMAS EN GEL Y EN BICAPA LIPÍDICA	29
5. APLICACIONES	30
5.1. IDENTIFICACIÓN DE SNPs	30
5.1.1. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES GENÉTICAS	30
5.1.2. BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS	30

5.1.3. FARMACOGENÓMICA	31
5.2. IDENTIFICACIÓN DE ORGANISMOS PATÓGENOS.....	33
5.2.1. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.....	33
5.2.2. SEGURIDAD ALIMENTARIA	33
5.2.3. CONTROL VETERINARIO	34
5.2.4. BIOTERRORISMO	34
6. PERSPECTIVAS DE FUTURO	37
7. CONCLUSIÓN	39
8. BIBLIOGRAFÍA.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de un biosensor	4
Figura 2. Resumen de preparación de AuNPs para la detección de ácidos nucleicos; ϕ : diámetro.	7
Figura 3. Principio de biosensado a) Ilustración del efecto de resonancia de plasmón superficial (SPR). Oscilación colectiva de los electrones con el campo electromagnético incidente en una nanopartícula de oro. b) Desplazamiento de la banda de absorción de plasmón de superficie debido al efecto de acoplamiento plasmónico, con el correspondiente cambio de color de rojo a azul	10
Figura 4. AuNP funcionalizada con oligonucleótidos tiolados que permiten el reconocimiento específico de la secuencia diana por apareamiento de bases Watson-Crick	10
Figura 5. Sistemas de biosensado colorimétrico con nanopartículas de oro en función del principio de reconocimiento y transducción	11
Figura 6. Esquemas de detección basados en agregación <i>crosslinking</i> (CL). El biorreconocimiento de la secuencia diana conduce a la formación de una red polimérica y al cambio colorimétrico debido a la agregación CL.....	12
Figura 7. Diferentes estrategias de ensayos de agregación <i>crosslinking</i> (CL) a) Ensayo de agregación y reacción de ligación. Si la molécula diana es complementarias en toda su extensión a las ADN-AuNPs, la enzima ligasa une covalentemente las dos sondas adyacentes. Esto hace que permanezcan agregadas tras un tratamiento térmico. b) Ensayo de amplificación por PCR y agregación en un mismo paso. Cuando la molécula diana hibrida con los cebadores inmovilizados en las AuNPs, se produce la extensión de los cebadores por la polimerasa y esto conduce a la formación de una red polimérica entre AuNPs	13
Figura 8. Sistemas de agregación <i>crosslinking</i> (CL) a) Amplificación de nanopartículas asistida por mellado de endonucleasa (NEANA). b) Sistema <i>crosslinking</i> con sondas universales conjugadas a las nanopartículas de oro (AuNPs). Se lleva a cabo la amplificación previa de la muestra mediante una PCR asimétrica cuyo cebador reverso incorpora una etiqueta universal al producto de amplificación, mediante el que hibridará con las ADN-AuNPs	15
Figura 9. Ensayos basados en la agregación <i>non-crosslinking</i> (NCL) a) Esquema de detección de SNPs mediante un ensayo de agregación NCL y mediante los pasos previos de amplificación y de extensión de base única. b) Esquema de un sistema NCL donde la hibridación de las ADN-AuNPs con el ADN diana específico evita la agregación en un medio de elevada fuerza iónica	16
Figura 10. Principio de detección colorimétrica de ADN mediante AuNPs no funcionalizadas. El ADN genómico es amplificado mediante PCR asimétrica, de modo que las AuNPs permanecen de color rojo tras la adición de sal si los amplicones son adsorbidos en su superficie.....	18
Figura 11. Sistema de detección colorimétrica de ADN basada en AuNPs no funcionalizadas y en la amplificación por reacción de hibridación en cadena (HCR).....	19

Figura 12. Ensayo de agregación <i>non-crosslinking</i> con AuNPs sin funcionalización para la detección indirecta de gluten a partir de ADN genómico extraído de alimentos 30 minutos después de añadir sal; +: control positivo; -: control negativo.....	20
Figura 13. Ensayos de agregación reversible a) Esquemas de ensamblaje/desensamblaje de AuNPs mediado por desplazamiento de cadena y por exonucleasa III. El oligonucleótido <i>linker</i> diseñado contiene gaps. b) Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y ensayo colorimétrico mediante nanopartículas funcionalizadas con ácido 11-mercaptoundecanoico. La disgregación de las AuNPs está condicionada por la amplificación de producto y la formación de ión pirofosfato.....	22
Figura 14. Ensayos en formato de micromatriz que utilizan AuNPs como marcadores colorimétricos. a) Ensayo de detección escanométrica. Las secuencias inmovilizadas en la superficie capturan las secuencias diana específicas. Las sondas de las AuNPs hibridan con las secuencias diana y actúan como catalizadores de la reducción de plata. b) Procedimiento de biocódigo de barras. A través de partículas magnéticas (M) y partículas de oro, las moléculas diana son capturadas. Posteriormente las sondas <i>barcode</i> liberadas se detectan por mediciones escanométricas	25
Figura 15. Esquema de la configuración de un ensayo de flujo lateral. La secuencia diana avanza por capilaridad a lo largo de la tira reactiva, alcanza el soporte que almacena al conjugado, donde es capturada por las AuNPs, y finalmente la señal colorimétrica es generada por la acumulación de nanopartículas de oro en las líneas de prueba y control	26
Figura 16. Representación esquemática de un sistema en disolución con nanopartículas de oro y partículas magnéticas no basado en agregación. Por separación magnética se retienen solo las partículas de oro que hayan hibridado con las partículas magnéticas y se observan las diferencias de color.....	29
Figura 17. Representación esquemática del uso de un hidrogel funcionalizado con sondas de ADN y nanopartículas de oro para la detección colorimétrica de ADN. El gel transparente cambia a rojo en presencia del ADN diana. La señal se puede amplificar por reducción de plata	29
Figura 18. Biosensores colorimétricos basados en nanopartículas de oro clasificados en función del formato de ensayo.	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicación de ensayos con AuNPs para la identificación de SNPs..... 32

Tabla 2. Aplicación de ensayos con AuNPs para la identificación de organismos patógenos 35

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNcd: ácido desoxirribonucleico de cadena doble

ADNcs: ácido desoxirribonucleico de cadena simple

APN: ácido peptidonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AuNP: nanopartícula de oro

CL: *crosslinking*

HCR: reacción de hibridación en cadena

LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle

LDD: límite de detección

NCL: *non-crosslinking*

NEANA: amplificación de nanopartículas asistida por mellado de endonucleasa

NGS: secuenciación de próxima generación

nt: nucleótido

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCRq: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

POC: *point-of-care*

RCA: amplificación de círculo rodante

SARS-CoV: coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave

SNP: polimorfismo de nucleótido simple

SPR: resonancia de plasmón superficial

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

El **diagnóstico molecular** es un término general que engloba un conjunto de técnicas empleadas para la identificación y análisis de marcadores biológicos. Es crítico tanto en países desarrollados donde las enfermedades no transmisibles como el cáncer, las patologías cardiovasculares, la diabetes o la demencia causan millones de muertes al año; como en países subdesarrollados, donde las enfermedades infecciosas son unas de las principales amenazas para la salud pública (OMS, 2018). Esto, sumado a otros problemas de salud a nivel mundial, como la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos o la amenaza actual de epidemias y pandemias debido a la globalización, ha aumentado la relevancia del diagnóstico molecular. El diagnóstico molecular ha resultado ser eficaz para obtener información detallada del estado del individuo, desarrollar medicina personalizada o de precisión y para aplicar correctamente intervenciones sanitarias en situaciones de emergencia o en estrategias a largo plazo (Yager *et al.*, 2008).

Gracias a los grandes avances en secuenciación genómica junto con análisis transcriptómicos y proteómicos, ha sido posible conocer los mecanismos moleculares que subyacen tras múltiples enfermedades y se han descubierto numerosos marcadores útiles con fines clínicos. De entre estos marcadores, unos de los más numerosos y relevantes son los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). Actualmente hay sobre 5 millones de SNPs validados en el genoma humano, y muchas enfermedades genéticas tiene asociadas variantes genéticas de este tipo. Además, los biomarcadores de ADN también permiten predecir la respuesta a diferentes fármacos de modo que se diseñe un tratamiento personalizado para cada paciente (Bichenkova *et al.*, 2011). Por otro lado, destaca la identificación rápida y eficaz de patógenos previo al tratamiento de las enfermedades infecciosas. Los métodos estándar de cultivo microbiano conllevan entre uno y cinco días ejecutarlos y, en ocasiones, son microorganismos difíciles de cultivar y altamente contagiosos y peligrosos. Además, también resulta útil para diferenciar rápidamente entre infecciones con sintomatología solapante durante la fase prodrómica y que pueden requerir estrategias terapéuticas distintas (Craw & Balachandran, 2012).

1.2. TÉCNICAS CONVENCIONALES DE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

En la actualidad, los métodos de análisis de ácidos nucleicos más destacados en el diagnóstico molecular rutinario son los basados en la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en las técnicas de secuenciación.

1.2.1. MÉTODOS BASADOS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La **PCR** es la técnica de amplificación de ácidos nucleicos más extendida y es considerada el método de referencia por ser muy sensible, sencilla y accesible. Es ampliamente usada en laboratorios clínicos para el diagnóstico de enfermedades y como paso previo a la secuenciación génica (Garibyan & Avashia, 2013).

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que permite la amplificación de una secuencia específica en una mezcla compleja de ADN, es decir, se encarga de aumentar el número de

copias presente. El método más sencillo para analizar los resultados es mediante una electroforesis en gel de agarosa, que aporta información cualitativa sobre la presencia o ausencia de una secuencia de interés (Garibyan & Avashia, 2013).

El desarrollo de la PCR a tiempo real o **PCR cuantitativa** (PCRq) permite monitorizar la amplificación de cada ciclo, confirmar la cinética de la amplificación y obtener información sobre el número de copias iniciales. Además, combina la amplificación y la detección en un solo paso, lo que acorta el tiempo de análisis (Garibyan & Avashia, 2013). También se han introducido otras variaciones en la PCR para aumentar su utilidad y versatilidad. Por ejemplo, la PCR multiplex ha permitido la detección simultánea de hasta cinco o seis secuencias distintas, la PCR anidada puede aumentar la sensibilidad y especificidad, la PCR retrotranscriptasa reversa permite detectar ARN, y la PCR digital es una versión de la PCRq muy eficaz para detectar mutaciones presentes en baja frecuencia y realizar una cuantificación absoluta (Park *et al.*, 2011).

1.2.2. MÉTODOS BASADOS EN LA SECUENCIACIÓN

El desarrollo de la **secuenciación Sanger** cuarenta años atrás también ha revolucionado la investigación y la práctica clínica. Las implicaciones de esta técnica se hicieron aún más amplias con la introducción de los métodos de **secuenciación de próxima generación (NGS)** en 2005, ya que permiten generar entre cientos y millones de reacciones de secuenciación por ensayo y han reducido significativamente el coste de secuenciación (Mardis, 2017). Entre la diversidad de aproximaciones NGS que se han desarrollado, destacan: (1) secuenciación del genoma completo (WGS), que permite identificar variantes nuevas y desconocidas; (2) secuenciación del exoma (WES), que aunque representa el 2% del genoma, contiene el 85% de las variantes asociadas a patologías; (3) secuenciación del transcriptoma (RNAseq), que permite cuantificar la expresión génica en un determinado momento; y (4) secuenciación de paneles de genes, un tipo de secuenciación dirigida únicamente a un grupo conocido de genes que logra una gran cobertura y es capaz de detectar variantes de muy baja frecuencia (Calabria *et al.*, 2016).

1.2.3. LIMITACIONES

A pesar del evidente potencial y versatilidad para el análisis de ácidos nucleicos, tanto los métodos convencionales basados en PCR como las técnicas de secuenciación presentan el mismo problema: su dificultad para implementarlas en escenarios sanitarios próximos al paciente y de respuesta rápida. Esto se debe principalmente a la necesidad de instrumentación sofisticada y personal especializado que encarecen el análisis y dificultan su portabilidad. La complejidad de miniaturizar este tipo de ensayos, el coste de los reactivos, el procesamiento de la muestra que exigen y el gasto energético que acarrear también contribuyen a esta dificultad. Por ejemplo, los métodos basados en PCR requieren un termociclador y de instrumental óptico (Park *et al.*, 2011). En el caso de NGS, se requiere de secuenciadores de muy alto rendimiento, solamente asequibles para algunos centros de investigación y hospitales. Además, la gran cantidad de datos genómicos generados tras el análisis exige herramientas bioinformáticas, bases de datos, capacidad de almacenamiento y conocimientos genéticos y médicos para poder procesarlos e interpretarlos (Yohe & Thyagarajan, 2017).

1.3. TECNOLOGÍA POINT-OF-CARE

1.3.1. ESCENARIOS DE APLICACIÓN

Aunque el desarrollo de métodos analíticos realizados en un entorno de laboratorio convencional continúa siendo un campo de investigación y de innovación abierto, en los últimos años hay un enfoque de descentralización del diagnóstico molecular. El desarrollo de plataformas portátiles que puedan ser aplicadas al telediagnóstico o en regiones con pocos recursos donde la atención médica es limitada, se ha convertido en un objetivo primordial. Los principales desafíos son lograr dispositivos con un procedimiento de fabricación simple, usando materiales con un coste asequible y/o reutilizables; así como desarrollar una tecnología fácil de usar que exima de la supervisión de profesional especializado, de modo que cualquier usuario pueda ejecutar el ensayo de forma autónoma en casa, en consultorios, en ambulatorios, etc. Esta estrategia está permitiendo ampliar el número de escenarios clínicos donde los métodos basados en biomarcadores genéticos apoyan el diagnóstico. Se está logrando un avance para la rápida identificación y el abordaje de amenazas emergentes para la salud pública, como se está demostrando con la crisis del SARS-Covid-19, y facilita el tratamiento de enfermedades crónicas que exigen un monitoreo constante (Woolley & Hayes, 2014).

1.3.2. DESCRIPCIÓN

La **tecnología *point-of-care*** (POC) es aquella que reúne todas las capacidades para proporcionar información próxima al paciente, tales como portabilidad, sencillez, precio asequible, al mismo tiempo que mantiene una sensibilidad, especificidad y robustez comparable con los métodos convencionales utilizados en los grandes laboratorios hospitalarios (Craw & Balachandran, 2012). Gracias a su formato compacto, los reducidos volúmenes de muestra y de reactivos que requieren y a su capacidad de miniaturización, los biosensores han sido ampliamente aplicados como dispositivos *point-of-care*.

Un **biosensor** es una plataforma compacta que transforma procesos biológicos en señales eléctricas u ópticas aportando información cuantitativa o semicuantitativa sobre un analito. Están compuestos por cuatro partes principales: un biorreceptor que reconoce de forma específica al analito; un transductor que convierte el cambio asociado al reconocimiento biológico (cambio fisicoquímico) en una señal cuantificable; un detector de la señal; y un procesador que amplifica y procesa la señal a digital (**Fig. 1**). De esta forma, los biosensores destacan por su extensa aplicabilidad, ya que son útiles en el seguimiento de enfermedades, en el control medioambiental y alimentario, y en la investigación biomédica y forense, entre otras áreas (Bhalla *et al.*, 2016).

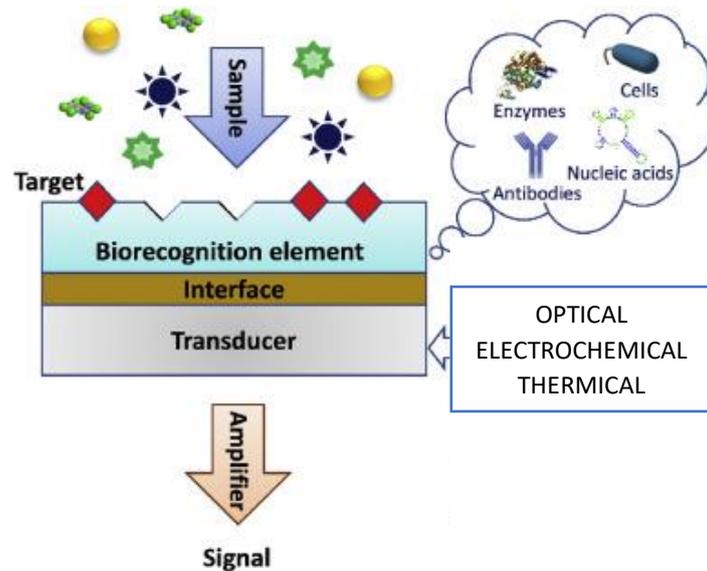


Figura 1. Componentes de un biosensor (adaptado de Chen *et al.*, 2019)

1.3.3. CONTRIBUCIÓN DE LOS NANOMATERIALES

El diseño de dispositivos POC no es solo un desafío para la química analítica y la biología molecular, sino que se trata de un problema multidisciplinar en el que la ciencia de materiales y la ingeniería son fundamentales para integrar, miniaturizar y automatizar el análisis (Craw & Balachandran, 2012). A pesar de todos los avances conseguidos, la dificultad de adaptar las técnicas de PCR y de secuenciación a aplicaciones POC prevalece. Actualmente, todos los kits de PCR aprobados por las organizaciones gubernamentales continúan considerándose de complejidad alta o moderada (Park *et al.*, 2011).

En el **campo de la transducción**, el diseño de biosensores basados en teléfonos móviles ha mostrado excelentes resultados debido a la capacidad computacional y a la alta resolución de imagen de estos, además de tener un sistema operativo de código libre y conectividad inalámbrica. Por todo ello los teléfonos móviles pueden servir como detectores ópticos, electroquímicos, colorimétricos, etc. ideales para aplicaciones POC (Fu *et al.*, 2016).

En el **campo de las plataformas de ensayo**, ha habido importantes progresos desde los tests rápidos en tiras de flujo lateral hasta los dispositivos microfluídicos de diseño más complejo. La tecnología microfluídica permite la miniaturización de los sistemas analíticos para desarrollar plataformas portátiles (Alves *et al.*, 2018). Los dispositivos microfluídicos, también llamados “laboratorios en chips”, son dispositivos de tamaño en el orden de micras, formados por diferentes canales y reservorios que comunican las partes del dispositivo, y en el que se integran uno o varios análisis de laboratorio. En comparación con los microfluidos convencionales, los aplicados a POC cuentan con la dificultad añadida de extremar la simplicidad (Park *et al.*, 2011). No obstante, se debe seguir investigando porque generalmente continúan teniendo un coste elevado, un consumo energético considerable y la manipulación de las muestras sigue siendo crítica (Craw & Balachandran, 2012).

Por ello, ha aumentado el interés por diseñar sistemas analíticos no dependientes de la PCR. Las técnicas de **amplificación isotérmica** son unas de las alternativas más interesantes, capaces de amplificar la muestra a una temperatura constante con un instrumental menos complejo que la PCR y obteniendo un buen rendimiento (Deng & Gao, 2015). Otra posibilidad es diseñar **biosensores ultrasensibles** que no dependan de la amplificación previa de la muestra, lo que permite simplificar el protocolo de análisis y el tiempo invertido, y reduce el consumo de reactivos. El éxito de estas plataformas es totalmente dependiente del desarrollo de biosensores robustos con suficiente sensibilidad para detectar ácidos nucleicos en concentraciones muy bajas en matrices complejas al mismo tiempo que mantienen la especificidad (Craw & Balachandran, 2012). En este sentido están surgiendo nuevas estrategias basadas en nanomateriales para mejorar la sensibilidad de los sistemas actuales

Con el desarrollo de la **nanotecnología**, se han descubierto y creado un gran número de nuevos nanomateriales y una gran variedad de estructuras para mejorar la detección de ácidos nucleicos. El término “nanomaterial” se aplica a una amplia variedad de materiales de composición y propiedades muy diferentes, pero con la característica común de contener partículas con una o más dimensiones en la nanoescala (de 1 a 100 nm). Estos materiales destacan por tener una relación superficie-volumen alta, elevada conductividad eléctrica y propiedades fisicoquímicas únicas (Chen *et al.*, 2020). Por ejemplo, para ensayos colorimétricos y de luminiscencia se pueden utilizar nanopartículas metálicas, de carbono, de selenio o de sílice, las cuales gozan de gran estabilidad óptica; los puntos cuánticos son utilizados en ensayos de fluorescencia; y las nanopartículas magnéticas pueden utilizarse para la captura de la muestra (Yager *et al.*, 2008).

Entre la diversidad de nanomateriales, este trabajo Fin de Grado se ha centrado en las **nanopartículas de oro**, ya que son unas de las más utilizadas como transductores colorimétricos en diversos sistemas de biosensado. Estas presentan un intenso color rojo rubí, un alto coeficiente de extinción molar y una elevada resonancia de plasmón de superficie. Además, destacan por ser estables en condiciones atmosféricas, a diferencia de otros metales (Pb, In, Hg, Sn o Cd) que son rápidamente oxidados (Ghosh & Pal, 2007). Los **ensayos colorimétricos** son una buena alternativa a los ensayos de fluorescencia, ya que son uno de los métodos más compatibles con los dispositivos POC al presentar una forma directa de evaluar la presencia del analito, sin necesidad de instrumentación compleja (Zhang *et al.*, 2018).

Desde finales del siglo XX, las propiedades de estos nanomateriales han sido ampliamente explotadas tanto en formatos homogéneos como heterogéneos, y han experimentado un gran desarrollo. De ahí el interés en esta revisión bibliográfica de recopilar los métodos descritos en los últimos años, analizar el potencial de estos y evaluar el valor que pueden llegar a alcanzar en el análisis de ácidos nucleicos en los próximos años.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente Trabajo Fin de Grado es realizar un estudio bibliográfico sobre cómo se han aprovechado y adaptado las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro esféricas para desarrollar diferentes plataformas de análisis de ácidos nucleicos. El trabajo se centra en comparar los distintos sistemas analíticos y evaluar cómo han evolucionado hasta la fecha, dilucidando tanto los avances conseguidos como las limitaciones pendientes de superar.

Para alcanzar este objetivo principal se proponen los siguientes objetivos parciales:

- Comparar los métodos basados en nanopartículas de oro, estudiando el principio en el que se fundamentan, sus formatos de ensayo y sus prestaciones.
- Examinar las principales áreas de aplicación de estos biosensores.
- Analizar los avances alcanzados por estas plataformas y exponer los desafíos que se deben superar en el futuro para explotar al máximo su potencial como dispositivos *point-of-care*.

3. PRINCIPIO DE BIOSENSADO

El **biosensado con nanopartículas de oro** requiere su funcionalización con biorreceptores que permitan realizar ensayos de reconocimiento de secuencias específicas de ácidos nucleicos y una transducción óptica de altas prestaciones.

3.1. NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS

La preparación de nanopartículas funcionalizadas se resume principalmente en dos pasos claves: (1) la síntesis de nanopartículas; (2) la funcionalización de las nanopartículas con oligonucleótidos.

Obtener conjugados de alta calidad que aporten estabilidad y poder de biorreconocimiento a las nanopartículas es crítico para este tipo de biosensores, por ello en este apartado se describen los métodos de síntesis más importantes, la naturaleza de las sondas inmovilizadas y los factores a tener en cuenta para lograr su eficiente inmovilización (Fig.2).

Síntesis AuNPs	<ul style="list-style-type: none">• Método Turkevich-Frens: estabilizadas con citrato; \varnothing 10-150 nm• Brust y Schiffrin: estabiilzadas con alcanetiol; \varnothing 2-5 nm
Sondas inmovilizadas	<ul style="list-style-type: none">• Región anclaje: hexatiol, grupo amino, biotina...• Región espaciadora: polietilenglicol, T₁₀ o A₁₀• Región de reconocimiento
Método de anclaje	<ul style="list-style-type: none">• Intercambio de ligando• Unión covalente• Unión de afinidad
Mejora de la eficiencia de funcionalización	<ul style="list-style-type: none">• Reducción repulsiones electrostáticas y estéricas: salt-aging, reducción pH, menor redio de curvatura• Adsorción inespecífica: limpieza viales, sonicación

Figura 2. Resumen de preparación de AuNPs para la detección de ácidos nucleicos; \varnothing : diámetro.

3.1.1 SÍNTESIS DE AuNPs

Las nanopartículas de oro (AuNPs) pueden describirse como partículas sólidas de entre 1 y 100 nm que destacan por sus propiedades ópticas y físicas. Cabe decir que, aunque las AuNPs se encuentran en un amplio rango de formas: nanoesferas, nanorods, nanotriángulos, nanocubos o nanoestrellas, entre otras, esta revisión solo se centra en las plataformas basadas en AuNPs esféricas.

Su síntesis es sencilla y genera un producto estable y de calidad, apto para ser almacenado durante años. Se han descrito gran variedad de estrategias para controlar el tamaño, la forma y la funcionalización de estas. En 1951, Turkevich *et al.* desarrollaron un método sintético a partir de ácido clorhídrico (HAuCl₄) y ácido cítrico, donde el citrato actúa como agente estabilizante y como agente reductor (Turkevich *et al.*, 1951). Más adelante Frens optimizó este método, que pasó a denominarse **Turkevich-Frens**, el cual es capaz de sintetizar AuNPs con diámetros de

entre 10 y 20 nm y, aunque a partir de 40 nm es más difícil obtener tamaños homogéneos, este método permite producir nanopartículas de hasta 150 nm.

Brust y Schriffin presentaron un nuevo método en 1994 mediante la síntesis de AuNPs estabilizadas con alcanetiol (Brust *et al.*, 1994). Sin embargo, con esta técnica se obtienen nanopartículas insolubles en agua, requiriendo un intercambio de ligandos para reducir la hidrofobicidad, lo que añade complejidad al proceso. Además, el diámetro de es de 2 a 5 nm, limitando su aplicabilidad como biosensores (Larguinho *et al.*, 2015).

Por ello, el método Turkevich-Frens sigue siendo en la actualidad el más empleado ya que obtiene AuNPs negativamente cargadas, fáciles de funcionalizar y con poca dispersión de tamaño.

3.1.2. NATURALEZA DE LA Sonda INMOVILIZADA

Existen numerosas reacciones químicas que permite el **acoplamiento de las AuNPs con diferentes biomoléculas**. Incluyen anticuerpos, proteínas, ligandos, oligonucleótidos, polímeros o polielectrolitos (Fuller & Köper, 2019).

Los oligonucleótidos inmovilizados en las AuNPs están compuestos por tres partes principales: la región de reconocimiento, la región espaciadora y la región de anclaje. El **grupo espaciador**, que suelen ser cadenas de nucleótidos (T₁₀ o A₁₀) u otros grupos sintéticos como polietilenglicol, tiene como función alejar la región de reconocimiento de la superficie cargada de las nanopartículas para reducir los impedimentos estéricos al acceder a ella. Por otro lado, la **molécula de anclaje** determinará el tipo de inmovilización de la sonda a la nanopartícula. El grupo de anclaje más común es el grupo hexatiol (Cutler *et al.*, 2012).

3.1.3. EFICIENCIA DE LA FUNCIONALIZACIÓN

La eficiencia de la funcionalización hace referencia a la densidad de oligonucleótidos que se han logrado inmovilizar. Interesa conseguir una elevada densidad de sondas inmovilizadas para así mejorar la estabilidad de las nanopartículas. Para lograrlo se deben tener en cuenta varios factores:

- **Tipo de inmovilización**

El método de inmovilización más extendido es el **intercambio de ligando** (el grupo de anclaje tiene mayor afinidad por las AuNPs que el citrato que las recubre). No obstante, también se pueden inmovilizar por **enlace covalente** entre de los grupos hexatiol de las sondas y grupos maleimidas presentes en la superficie de las AuNPs o entre grupos amino de las sondas y grupos carboxilo de las AuNPs. Otro tipo de inmovilización es por **unión de afinidad** entre oligonucleótidos biotinilados y AuNPs funcionalizadas con estreptavidina (Zanoli *et al.*, 2012).

- **Repulsiones electrostáticas y estéricas**

Las repulsiones electrostáticas entre los oligonucleótidos negativamente cargados reducen el número de sondas inmovilizadas en la superficie. Por ello, para lograr aumentar la densidad de las sondas se pueden emplear dos tipos de estrategias: el método *salt aging* y el método de reducción del pH.

El método de **salt aging** (Mirkin *et al.*, 1996; Storhoff *et al.*, 1998) consiste en añadir la sal lentamente en varios intervalos, intercalando procesos de incubación y lavados, para inducir el apantallamiento eléctrico de las repulsiones sin comprometer la estabilidad de las AuNPs (Liu & Liu, 2017). El método basado en la **reducción de pH** de la disolución (Zhang *et al.*, 2012), desarrollado más recientemente, ha demostrado tener una eficiencia comparable al método de *salt aging* y logra reducir significativamente el tiempo de preparación a unos minutos frente a los largos tiempos de incubación de *salt aging*.

Por otro lado, las repulsiones electrostáticas y estéricas también dependen del **radio de curvatura**. Las nanopartículas de menor diámetro alcanzan mayor densidad de inmovilización, ya que el ángulo de desviación entre oligonucleótidos adyacentes en la superficie de la nanopartícula es mayor, creando más espacio entre ellos (Hill *et al.*, 2009).

- **Adsorción inespecífica**

Debido a la elevada energía superficial que poseen las AuNPs, estas tienden a adsorber impurezas y moléculas de ADN a través de sus bases nitrogenadas. Esto es perjudicial para la funcionalización ya que reduce el espacio disponible para que las sondas se inmovilicen a través del grupo de anclaje. Por ello, es muy importante que los tubos y viales donde se lleva a cabo la reacción estén completamente limpios (Liu & Liu, 2017). Además, la **sonicación** de la disolución para retirar las moléculas que hayan sido adsorbidas puede mejorar la eficiencia (Hurst *et al.*, 2006).

3.2 BIORRECONOCIMIENTO Y TRANSDUCCIÓN ÓPTICA

Las AuNPs poseen un coeficiente de extinción molar tres o cuatro órdenes de magnitud mayor ($\epsilon = 2,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para una AuNP de 13 nm) que la mayoría de las moléculas orgánicas (Ghosh & Pal, 2007). Esto sumado a sus propiedades plasmónicas, que comparte con el resto de los metales nobles, ha despertado gran interés en la tecnología de biosensado colorimétrico, porque los ensayos que se basan en esta propiedad óptica logran mayor sensibilidad.

El fenómeno de **resonancia de plasmón superficial** (SPR) se produce por la oscilación colectiva de los electrones de la superficie de una nanopartícula metálica o un material dieléctrico inducida por un campo electromagnético incidente. A partir de la interacción electrostática entre los electrones y el núcleo, surge una fuerza restauradora que hace que la oscilación de la nube electrónica sea relativa al núcleo (**Fig. 3a**). En el caso de las AuNPs, al incidir luz visible, una longitud de onda resonante específica es absorbida por estas para inducir oscilaciones de los electrones superficiales. La oscilación resultante genera radiación electromagnética a la misma frecuencia que los electrones oscilantes (Mayer, 2010).

El efecto SPR depende en gran medida de la distancia entre las nanopartículas. Cuando la distancia entre ellas es menor que el tamaño de estas, la resonancia de las partículas individuales empieza a hibridar y como consecuencia el pico máximo de absorción se desplaza a una longitud de onda más larga (Yu & Wei, 2018), a este fenómeno se le denomina **acoplamiento plasmónico**. Cuando la proximidad entre nanopartículas desemboca en el acoplamiento plasmónico, su pico de máxima absorbancia pasa de encontrarse en torno a 500-550 nm a posicionarse en 650 nm y las AuNPs cambian de color de rojo a púrpura o azul (**Fig. 3b**). Este cambio de color, además

de apreciarse a simple vista, también puede monitorizarse mediante espectroscopía UV-visible o medidas escanométricas para obtener resultados cuantitativos o semicuantitativos (Baptista, 2018). Este fenómeno constituye el principio de biosensado de muchos ensayos colorimétricos basados en el control de la agregación de las nanopartículas en disolución (Mayer, 2010).

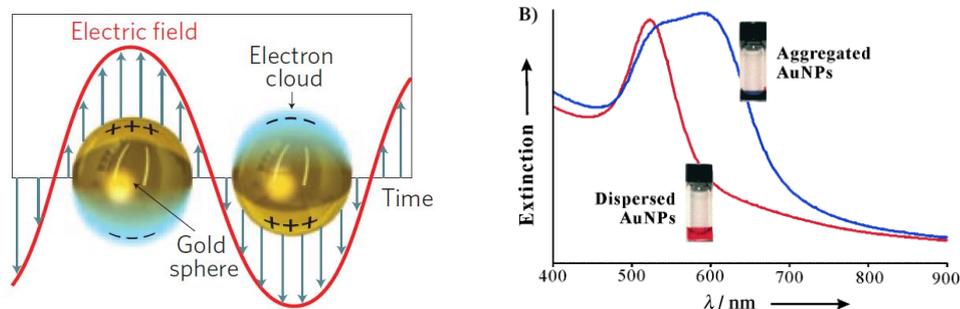


Figura 3. Principio de biosensado a) Ilustración del efecto de resonancia de plasmón superficial (SPR). Oscilación colectiva de los electrones con el campo electromagnético incidente en una nanopartícula de oro (recuperado de Juan *et al.*, 2011). b) Desplazamiento de la banda de absorción de plasmón de superficie debido al efecto de acoplamiento plasmónico, con el correspondiente cambio de color de rojo a azul (recuperado de Zhao *et al.*, 2008).

Además, la intensidad y la frecuencia de la banda plasmónica también es sensible al **tamaño y a la forma de las nanopartículas metálicas** (Lee & El-Sayed, 2005). Por ejemplo, para AuNPs esféricas, la disminución del tamaño conlleva el descenso de la banda de plasmón, que puede atribuirse a la reducción del coeficiente de extinción molar (Jana *et al.*, 2001). Así mismo, la forma de la nanopartícula también influye en la posición de la banda de plasmón (Yang *et al.*, 2014).

El **biosensado de ácidos nucleicos** con estas nanopartículas exige el acoplamiento de un biorreceptor en la superficie de la nanopartícula para aportar especificidad y funcionalidad al sistema de medida (**Fig. 4**). Concretamente, la inmovilización de oligonucleótidos en su superficie facilita el reconocimiento molecular específico por apareamiento de bases Watson-Crick.

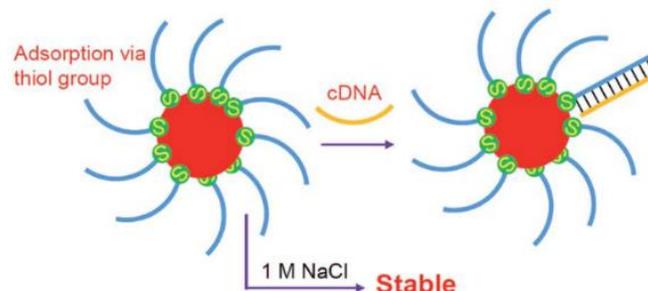


Figura 4. AuNP funcionalizada con oligonucleótidos tiolados que permiten el reconocimiento específico de la secuencia diana por apareamiento de bases Watson-Crick (recuperado de Liu & Liu, 2017).

Las ADN-AuNPs adquieren unas propiedades de hibridación muy llamativas. En comparación con las moléculas de ADN que se encuentran libres en disolución: la cooperatividad de unión de las sondas inmovilizadas con su secuencia complementaria es mucho mayor. Esto se traduce en una mayor constante de afinidad ($K_{eq}=1,8 \times 10^{14}$ frente a $K_{eq}=1,8 \times 10^{12}$ del ADN libre), una mayor temperatura de fusión y un perfil de fusión muy pronunciado. La desnaturalización de una molécula de ADN de doble cadena (ADNcd) en disolución se produce bajo un rango de temperatura amplio (sobre 20°C), mientras que en los dúplex formados en las AuNPs, este rango es mucho más estrecho (2-8 °C) (Cutler *et al.*, 2012). Este principio otorga a los biosensores basados en ADN-AuNPs una elevada especificidad y poder para discriminar entre ácidos nucleicos perfectamente complementarios y aquellos que poseen SNPs (Storhoff *et al.*, 1998).

En resumen, los sistemas de biosensado basados en AuNPs funcionalizadas permiten realizar ensayos de reconocimiento de secuencias específicas de ácidos nucleicos y una transducción óptica que genera una señal de alta respuesta.

4. SISTEMAS DE BIOSENSADO

En este Trabajo Fin de Grado, se han recopilado los principales sistemas que emplean AuNPs para la detección cualitativa y/o cuantitativa de ácidos nucleicos. Se han agrupado de acuerdo con el principio de reconocimiento y transducción, siendo los sistemas basados en la agregación, basados en hibridación en superficie y basados en otras aproximaciones las categorías establecidas (Fig. 5).

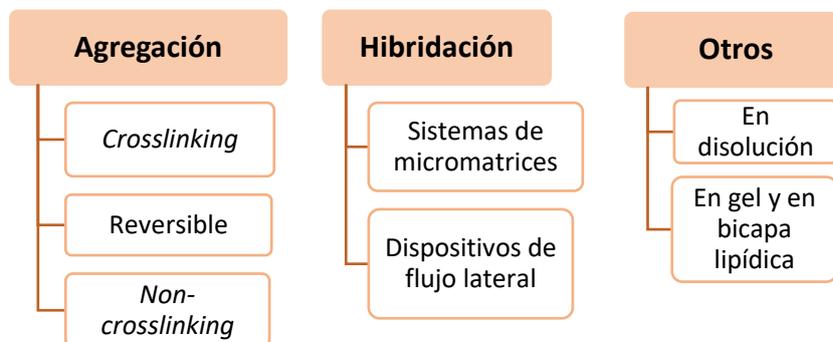


Figura 5. Sistemas de biosensado colorimétrico con nanopartículas de oro en función del principio de reconocimiento y transducción

4.1. SISTEMAS BASADOS EN LA AGREGACIÓN DE AuNPs

4.1.1. AGREGACIÓN *CROSSLINKING*

La **agregación *crosslinking*** (CL) se basa en la formación de una red polimérica en la que las nanopartículas se encuentran lo suficientemente próximas entre ellas como para conducir al cambio colorimétrico del coloide de rojo a azul. Este proceso está mediado por la hibridación tipo sándwich de tres elementos: dos sets de nanopartículas funcionalizadas con oligonucleótidos distintos (ADN-AuNPs) y una secuencia de ADN de cadena simple (ADNcs) que

actúa como *linker*, ya que es complementaria a ambas sondas inmovilizadas. Por ello, el oligonucleótido, al interactuar con las ADN-AuNPs, desencadena la agregación (**Fig. 6**). La sensibilidad de esta estrategia está determinada por el número mínimo de ADN *linkers* que son necesarios que hibriden para que la agregación de las nanopartículas sea apreciable a simple vista (Zanoli *et al.*, 2012). Además, este tipo de agregación, al estar mediada por la hibridación entre ácidos nucleicos, es un proceso reversible. Al aumentar la temperatura por encima de la temperatura de fusión se produce la desnaturalización del ADNcd y las nanopartículas recuperan su estado de dispersión coloidal.

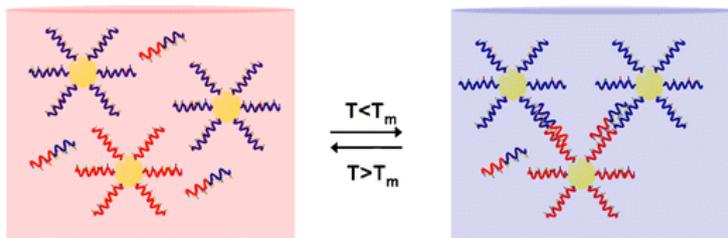


Figura 6. Esquemas de detección basados en agregación *crosslinking* (CL). El biorreconocimiento de la secuencia diana conduce a la formación de una red polimérica y al cambio colorimétrico debido a la agregación CL (recuperado de Zanoli *et al.*, 2014).

El grupo liderado por Mirkin fue el primero, en 1996, en demostrar que las propiedades colorimétricas de las AuNPs se pueden aplicar a la detección de ADN mediante el sistema de agregación por *crosslinking*. Para ello se utilizaron nanopartículas de 13 nm funcionalizadas covalentemente con dos sondas de oligonucleótidos, las cuales se modificaron con un grupo tiol en su extremo terminal. Con esta primera aproximación se alcanzó un límite de detección de 60 nM de ADN de simple cadena (Mirkin *et al.*, 1996).

Después de este descubrimiento, se han diseñado una gran variedad de ensayos dirigidos a la detección de polimorfismos de nucleótido simple, deleciones e inserciones mediante el control preciso de la temperatura, aprovechando las particulares **propiedades de hibridación** de las AuNPs (Elghanian *et al.*, 1997; Storhoff *et al.*, 1998). En la mayoría de métodos, se incluyen procesos, generalmente previo a la agregación, que permiten alcanzar la selectividad y/o sensibilidad requerida en la detección de ácidos nucleicos.

- **Reacción de ligación**

La incorporación de una enzima ligasa en el ensayo permite detectar SNPs sin depender del control estricto de la temperatura. Para ello, se utiliza un set de nanopartículas funcionalizadas con oligonucleótidos alelo-específicos y otro set con oligonucleótidos comunes. El ensayo se completa en tres fases, primero tiene lugar la hibridación del ADN diana con las AuNPs; a continuación, la ligasa une covalentemente las dos sondas adyacentes mediante un enlace fosfodiéster, pero solo lo hace cuando la complementariedad entre la sonda alelo-específica y el analito es perfecta; por último, se somete a un tratamiento térmico (**Fig. 7a**). Al aumentar la temperatura, se produce la desnaturalización del complejo ADN diana-AuNPs y solo en el caso de que el ADN analizado no contenga SNPs, las AuNPs permanecerán agregadas; de no ser así recuperarán el color rojo (Li *et al.*, 2005).

- **Amplificación de la muestra mediante PCR**

La mayoría de los ensayos CL no alcanzan suficiente sensibilidad para llevar a cabo el análisis sin amplificación previa. Normalmente la PCR y la detección colorimétrica posterior se llevan cabo por separado, sin embargo, se ha publicado un estudio donde la amplificación y el ensayo de agregación tienen lugar en un mismo paso. En las AuNPs se inmovilizan la enzima Taq polimerasa y los cebadores específicos para el ADN diana, de manera que la extensión de los cebadores conduce a la agregación de las AuNPs, pues las sondas extendidas son complementarias entre sí (**Fig. 7b**). Con este sistema se evita el riesgo de contaminación, ya que exige menor manipulación de la muestra, y se acortan los tiempos de análisis (15-60 minutos) (Cai *et al.*, 2010).

También se puede amplificar previamente la muestra mediante una **PCR asimétrica**, que consiste en poner proporciones diferentes de los cebadores directo y reverso de manera que se obtengan un gran número de moléculas de ADN monocatenarias. Con esta estrategia Deng *et al.* demostraron que los sistemas de agregación CL son aplicables a la detección de secuencias genómicas largas (> 100 pb) (Deng *et al.*, 2012).

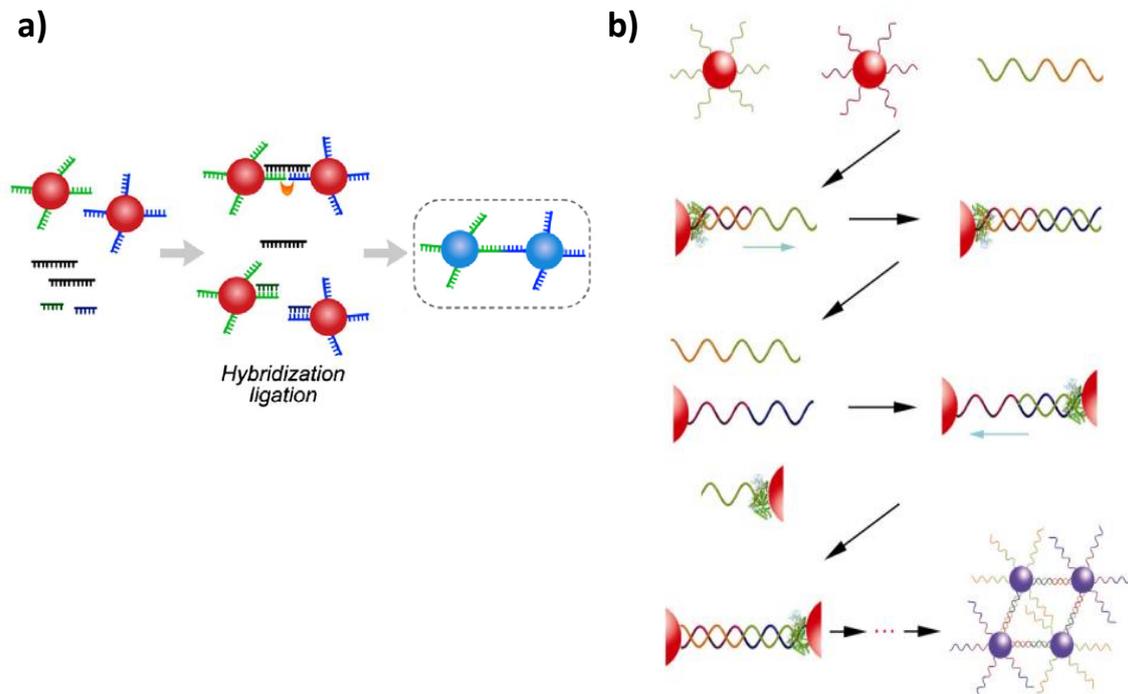


Figura 7. Diferentes estrategias de ensayos de agregación *crosslinking* (CL) a) Ensayo de agregación y reacción de ligación. Si la molécula diana es complementaria en toda su extensión a las ADN-AuNPs, la enzima ligasa une covalentemente las dos sondas adyacentes. Esto hace que permanezcan agregadas tras un tratamiento térmico (adaptado de Yin *et al.*, 2014). b) Ensayo de amplificación por PCR y agregación en un mismo paso. Cuando la molécula diana hibrida con los cebadores inmovilizados en las AuNPs, se produce la extensión de los cebadores por la polimerasa y esto conduce a la formación de una red polimérica entre AuNPs (recuperado de Cai *et al.*, 2010).

- **Amplificación isotérmica**

A diferencia de la PCR, que requiere de un termociclador para mediar la desnaturalización, anillamiento y extensión de los cebadores, las técnicas de amplificación isotérmica pueden llevarse a cabo a temperatura constante, por lo que reducen la complejidad de la instrumentación necesaria. Esto las convierte en técnicas interesantes como alternativa a la PCR ya que son más fáciles de miniaturizar y son más fáciles de realizar en un entorno POC.

Algunos de los métodos de amplificación isotérmica que se han acoplado a ensayos de agregación por *crosslinking* incluyen técnicas basadas en el empleo de enzimas, como la amplificación de círculo rodante (RCA) (Li *et al.*, 2010), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Shen *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2014), la reacción de amplificación exponencial (EXPAR) (Tan *et al.*, 2005) o la amplificación de nanopartículas asistida por mellado de endonucleasa (NEANA) (Xu *et al.*, 2009).

Por ejemplo, la técnica **NEANA** se basa en el uso de una enzima melladora, es decir una endonucleasa que reconoce secuencias específicas de doble cadena y corta solo una de ellas. El proceso está constituido por varios ciclos de escisión de hebras en el que tras la hibridación de la secuencia diana con el *linker*, la enzima melladora reconoce el dúplex y corta la secuencia *linker*. Sin embargo, un único polimorfismo de nucleótido simple entre el *linker* y el analito es suficiente para impedir que la endonucleasa melladora reconozca la secuencia y la corte. De este modo, cuando se añaden los dos sets de AuNPs, si el *linker* no ha sido procesado por la enzima y se encuentra íntegro, desencadenará la agregación de las AuNPs (**Fig. 8a**). Esta técnica ha demostrado ser una estrategia con gran capacidad de discriminación de SNPs y con buena sensibilidad (LDD = 0,5 fmol) (Xu *et al.*, 2009).

Otros sistemas de agregación CL, en cambio, han acoplado técnicas isotérmicas libres de enzimas, como la reacción de hibridación en cadena (HCR) (Huttanus *et al.*, 2013; Quan *et al.*, 2015) o el ensamblaje de horquilla catalítica (CHA) (Ma *et al.*, 2012; Quan *et al.*, 2015).

- **Otras estrategias**

Para añadir más versatilidad a este tipo de ensayos y evitar la preparación de sets específicos de AuNPs para cada secuencia diana que se quiera analizar, se han desarrollado sistemas de AuNPs con **sondas universales** inmovilizadas en su superficie. Para ello, antes del análisis, la secuencia puede ser amplificada por PCR asimétrica de modo que el amplicón incorpore una secuencia universal con la que interaccionar con las AuNPs funcionalizadas (**Fig. 8b**) (Valentini & Pompa, 2016).

Por otro lado, una limitación común en todos los ensayos descritos es que no es posible analizar en un mismo tubo más de una secuencia diana. Para añadir capacidad de **análisis múltiple** a los ensayos de agregación, una característica muy importante para el diagnóstico *point-of-care*, Mancuso *et al.* ideó un método de detección mediante nanopartículas de oro y de plata, funcionalizadas con sondas distintas destinadas a identificar una secuencia diferente. De esta forma, en una única disolución con ambas nanopartículas, en función de si se produce la agregación de las nanopartículas de oro, de plata o de ambas, se puede determinar la presencia o ausencia de dos analitos distintos en un solo vial. Su inconveniente es que la mezcla de nanopartículas no es estable a lo largo del tiempo y tras varios días se produce la agregación inespecífica de las nanopartículas de plata en ausencia del ADN diana (Mancuso *et al.*, 2013).

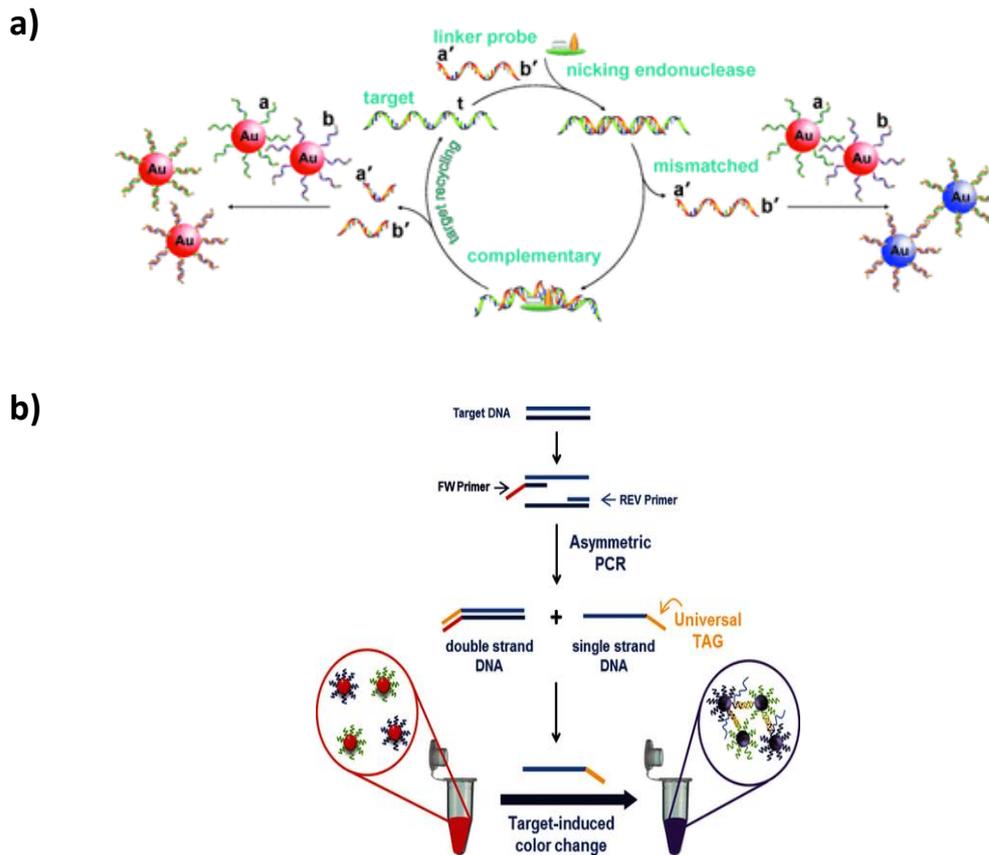


Figura 8. Sistemas de agregación *crosslinking* (CL) a) Amplificación de nanopartículas asistida por mellado de endonucleasa (NEANA) (recuperado de Xu *et al.*, 2009). b) Sistema *crosslinking* con sondas universales conjugadas a las nanopartículas de oro (AuNPs). Se lleva a cabo la amplificación previa de la muestra mediante una PCR asimétrica cuyo cebador reverso incorpora una etiqueta universal al producto de amplificación, mediante el que hibridará con las ADN-AuNPs (recuperado de Valentini & Pompa, 2016).

4.1.2. AGREGACIÓN *NON-CROSSLINKING*

La agregación *non-crosslinking* (NCL) se da cuando las fuerzas de repulsión entre las nanopartículas negativamente cargadas no son suficientes para mantener la dispersión coloidal, de manera que las fuerzas atractivas de Van der Waals conducen a la agregación. Normalmente, la agregación ocurre por un aumento en la fuerza iónica del medio proporcionado por la adición de sal (NaCl o MgCl₂ comúnmente), no obstante, también se han descrito ensayos NCL regulados por el pH de la disolución (Liandris *et al.*, 2009; Bakthavathsalam *et al.*, 2012).

En los ensayos con AuNPs funcionalizadas, cada molécula de ADN hibridará por complementariedad con una sonda inmovilizada en la superficie de la nanopartícula; mientras que en el caso de AuNPs sin funcionalizar, el ADN es adsorbido por la superficie de la NP. De una forma u otra, las plataformas NCL reducen la complejidad de los ensayos colorimétricos en comparación con el sistema CL, ya que solo requieren un único set de AuNPs funcionalizadas o incluso puede prescindir de la funcionalización de estas.

- **Nanopartículas funcionalizadas**

Se han desarrollado varios ensayos basados en la agregación *non-crosslinking* de AuNPs con oligonucleótidos inmovilizados. Algunos de ellos se basan en la observación de que las moléculas de ADNcs inmovilizadas en la superficie de los coloides aportan estabilidad estérica y electrostática a la disolución incluso a elevadas concentraciones de sal. Sin embargo, en estas mismas condiciones, la formación de ADNcd permite reducir las fuerzas repulsivas, y la atracción entre nanopartículas a través de las fuerzas de London conducen a su agregación (Sato *et al.*, 2003). Partiendo de este principio, Sato *et al.* desarrollaron una estrategia de **genotipado de SNPs** en la que cuando el ADNcd, formado por el ADNcs-AuNP y el ADN diana, presenta un SNP en su extremo terminal, las nanopartículas se mantienen en dispersión (**Fig. 9a**). Esta estabilización coloidal se debe a que los movimientos microbrownianos del nucleótido terminal protuberante aumentan la repulsión entre nanopartículas (Sato *et al.*, 2005). No obstante, esta estrategia también tiene algunas limitaciones, por ejemplo, exige que las sondas inmovilizadas sean de longitud idéntica a las moléculas a analizar. Por este motivo, este ensayo siempre va acompañado de un paso previo de **extensión de base única**, puesto que las muestras biológicas suelen ser de mayor longitud que las sondas inmovilizadas. Además, su sensibilidad es varios órdenes de magnitud menor que los métodos *crosslinking* (200 nM), aunque esto se puede soslayar mediante la amplificación previa por PCR.

Por el contrario, otros estudios se han basado en la observación opuesta. Las AuNPs funcionalizadas con sondas de ADNcs al hibridar con el ADN diana complementario, se mantienen en dispersión incluso a elevadas concentraciones de sal. En cambio, en ausencia del ADN diana, las ADNcs-AuNP agregan (**Fig. 9b**) (Baptista *et al.*, 2005).

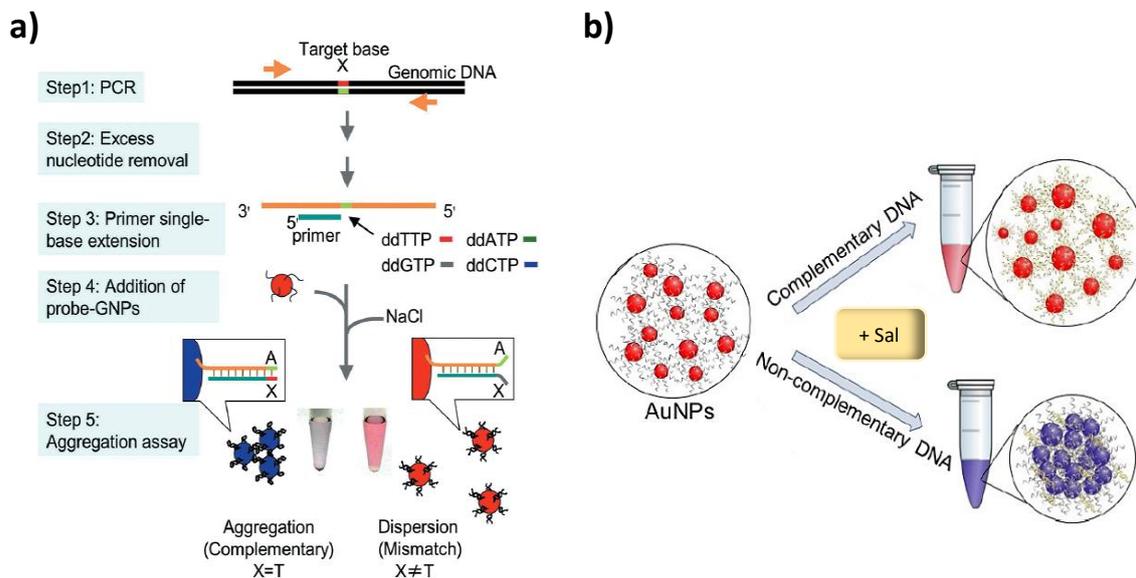


Figura 9. Ensayos basados en la agregación *non-crosslinking* (NCL) a) Esquema de detección de SNPs mediante un ensayo de agregación NCL y mediante los pasos previos de amplificación y de extensión de base única (recuperado de Sato *et al.*, 2005). b) Esquema de un sistema NCL donde la hibridación de las ADN-AuNPs con el ADN diana específico evita la agregación en un medio de elevada fuerza iónica (adaptado de Baptista, 2018).

El estudio de Song *et al.* ha logrado explicar la aparente contradicción entre los trabajos desarrollados por los grupos de Sato y Baptista. Demostró que la agregación *non-crosslinking* de las AuNPs funcionalizadas es dependiente de la **densidad de las sondas inmovilizadas**. Cuando la densidad supera los 34 pmol/cm², los oligonucleótidos aportan estabilidad suficiente para mantener la solución en dispersión frente a elevadas concentraciones de sal, mientras que cuando se forman dúplex entre la sonda y el ADN diana, se produce el apilamiento entre las bases terminales de las ADNcd-AuNP, conduciendo a la agregación. Por otro lado, cuando la densidad de ADNcs en las AuNPs es menor de 26 pmol/cm², se produce el efecto contrario, las fuerzas de repulsión aportadas por las sondas de ADNcs son menores y las nanopartículas agregan en un medio con elevada fuerza iónica. Sin embargo, cuando el ADN complementario hibrida con la sonda, el ADNcd formado aporta mayor carga negativa a la disolución y mayor estabilidad estérica de modo que permite mantener la dispersión coloidal. Asimismo, este estudio también mostró que las concentraciones de sal requeridas para inducir la agregación *non-crosslinking* varían en función de la densidad de las sondas inmovilizadas (Song *et al.*, 2010).

Además de la funcionalización de las nanopartículas con oligonucleótidos, moléculas análogas del ADN como son los ácidos peptidonucleicos (APN) han sido utilizadas para funcionalizar las nanopartículas con el objetivo de aumentar sus capacidades de detección. Los **ácidos peptidonucleicos** son polímeros sintéticos cuyo esqueleto en lugar de estar constituido por ribosas o desoxirribosas, está formado por poliamidas con carga neutra (N-(2-aminoetil) glicina). Estas moléculas muestran mayor especificidad en la unión con ADN complementario gracias a la ausencia de repulsiones electrostáticas entre las cadenas, de manera que la estabilidad térmica del dúplex APN/ADN se ve muy alterada en presencia de *mismatches* (Nielsen, 1999). Por este motivo, los conjugados de APN-AuNP han demostrado ser útiles en la discriminación de SNPs y en la detección de secuencias específicas (Chakrabarti & Klibanov, 2003)

Para resolver las limitaciones de sensibilidad de los ensayos sin depender de la PCR, se puede recurrir a técnicas de **amplificación isotérmica**, como la amplificación **RCA**. Los productos de RCA interaccionan con las AuNPs a través de una pequeña parte de su secuencia, complementaria a las ADN-AuNPs. Al añadir CIMg₂, se organizan pequeños grupos de nanopartículas llamadas "islas", que se mantienen estables frente al aumento de sal. Estas islas se forman gracias a las largas cadenas de los productos de RCA, que actúan como barrera espaciadora para evitar que las nanopartículas entren en contacto físico directo entre ellas y agreguen (Ali *et al.*, 2011).

- **Nanopartículas no funcionalizadas**

Los ensayos basados en agregación *non-crosslinking* con nanopartículas sin funcionalizar son más sencillos que los anteriormente descritos. Estos se basan en las **diferencias de afinidad** entre las moléculas de ADN de cadena simple y de cadena doble para interaccionar con las AuNPs. Las moléculas de ADNcs son suficientemente flexibles para exponer sus bases, a través de las cuales son adsorbidas por la superficie cargada negativamente de las nanopartículas, y de esta manera son capaces de aportar estabilidad al coloide incluso frente a elevadas concentraciones de sal. Por el contrario, las moléculas de ADNcd poseen una estructura helicoidal más rígida y la repulsión electrostática generada entre las nanopartículas y los grupos

fosfatos de los ácidos nucleicos evitan la interacción (Li & Rothberg, 2004a). Sin embargo, se ha observado que a bajas concentraciones de sal tanto el ADNcs como el ADNcd pueden mantener en dispersión a las AuNPs (**Fig. 10**). Una posible explicación a este fenómeno es que se produzca una interacción ión-dipolo inducido que posibilite la interacción entre la AuNP y el ADNcd (los grupos fosfatos del ADN negativamente cargados inducen dipolos en las nanopartículas polarizadas) (Deng *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018).

Li y Rothberg fueron los pioneros en usar este principio para la detección de secuencias específicas. El sistema desarrollado se basa en el **diseño de sondas** libres en disolución, complementarias a la molécula diana, de manera que, si el ADN de interés está presente en la muestra, hibridará con la sonda, evitando que establezca a las nanopartículas (Li & Rothberg, 2004a). Además, adaptaron esta estrategia al genotipado de SNPs (Li & Rothberg, 2004b). El sistema que diseñaron, a diferencia de los ensayos con AuNPs funcionalizadas, permite que la hibridación de la muestra con la sonda se realice de forma separada a la detección posterior. Esto puede ser ventajoso ya que favorece a que la termodinámica y la cinética de la hibridación se lleve a cabo en las condiciones óptimas, sin impedimentos estéricos, reduciendo el tiempo de hibridación a menos de 1 minuto. Aun así, esta estrategia presenta ciertas limitaciones, como la necesidad de la amplificación previa del ADN o del control de la temperatura.

Los **ácidos peptidonucleicos (APN)** también han resultado útiles para el desarrollo de ensayos con nanopartículas de oro no funcionalizadas, especialmente por su capacidad de discriminación de SNPs a temperatura ambiente (Kanjanawarut & Su, 2009; Su & Kanjanawarut, 2009; Xing *et al.*, 2019).

Sin embargo, muchos de los ensayos expuestos son pruebas de concepto dirigidos a la detección de oligonucleótidos sintéticos de cadena corta (5-50 nts). De ahí la importancia de la contribución de Deng *et al.*, que acercaron estos ensayos a la detección de **muestras reales** de cadena larga (> 100 nts). Para ello, incluyó un paso de amplificación previa mediante PCR asimétrica para obtener ADNsc que interaccionen con las AuNPs y las estabilicen frente al aumento de sal (**Fig. 10**) (Deng *et al.*, 2013).

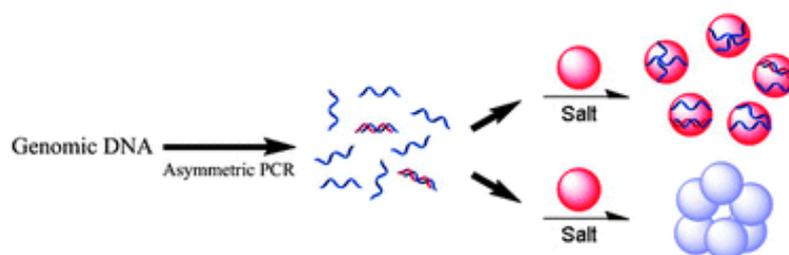


Figura 10. Principio de detección colorimétrica de ADN mediante AuNPs no funcionalizadas. El ADN genómico es amplificado mediante PCR asimétrica, de modo que las AuNPs permanecen de color rojo tras la adición de sal si los amplicones son adsorbidos en su superficie (recuperado de Deng *et al.*, 2013).

También se han diseñado esquemas que acoplan técnicas **de amplificación isotérmica** con los ensayos colorimétricos de AuNPs sin funcionalizar. Uno de ellos se basa en la amplificación por **HCR**, un proceso que involucra una cascada de reconocimiento y de hibridación entre dos sets de ADN en horquilla, que llevan a la formación de una larga secuencia en doble hélice. Este sistema está diseñado para que sea el ADNc diana el que desencadene la reacción de amplificación. En ausencia del ADN de interés, los dos sets de horquillas quedan intactos e interaccionan con las AuNPs, manteniéndolas estables frente al aumento de sal. En cambio, si se produce la amplificación, se obtienen productos de ADNcd y las nanopartículas agregan (**Fig. 11**). Esta estrategia aporta un LDD de 100 pM a simple vista, sin recurrir a ningún instrumento de detección, y puede llevarse a cabo a temperatura ambiente (Liu *et al.*, 2013b).

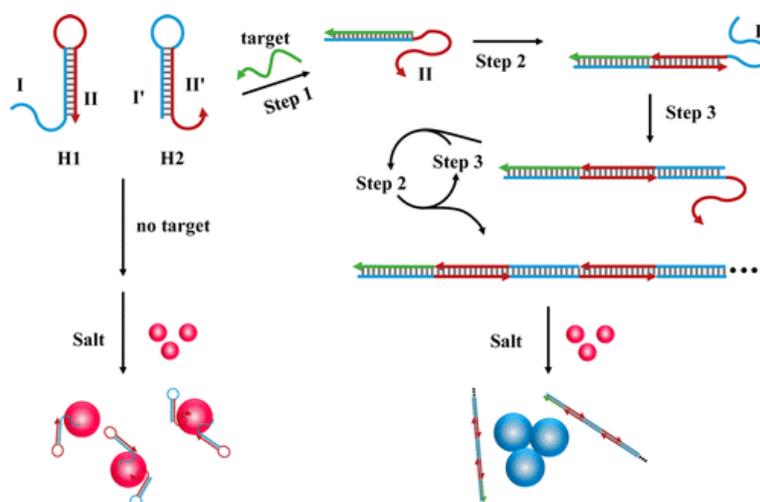


Figura 11. Sistema de detección colorimétrica de ADN basada en AuNPs no funcionalizadas y en la amplificación por reacción de hibridación en cadena (HCR) (recuperado de Liu *et al.*, 2013b).

Abundan las estrategias propuestas para la detección de ADN de simple y doble cadena, sin embargo, existen otras configuraciones moleculares, como las **estructuras en triple hélice** del ADN, que también tienen una importante implicación biológica. Estas estructuras se forman por la interacción de un oligonucleótido formador de triple hélice con una molécula de ADN de doble cadena. Esta unión se produce de forma específica a través interacciones Hoogsteen, formándose puentes de hidrógeno entre las bases del surco mayor del dúplex y las bases del oligonucleótido formador de triple hélice (Hu *et al.*, 2017). Mediante AuNPs no funcionalizadas se ha desarrollado un ensayo para poder detectar estructuras de triple hélice. El mayor inconveniente de este formato es que la formación previa de la estructura en triple hélice es un proceso largo que lleva más de dos horas (Zhu *et al.*, 2010).

Asimismo, cabe destacar que el grupo de investigación “Señal y Medida” del Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) perteneciente a la UPV está trabajando en el biosensado colorimétrico con AuNPs. De hecho, inicialmente el Trabajo Fin de Grado estaba planificado para la puesta a punto de un sistema de agregación con AuNPs no funcionalizadas para la detección indirecta de gluten en alimentos. Lamentablemente, la investigación tuvo que detenerse debido a la crisis sanitaria causada por

la COVID19. El ensayo que se propuso consiste en: (1) extracción de ADN genómico de muestras alimentarias; (2) amplificación mediante una PCR asimétrica con cebadores específicos para el gluten; (3) purificación del producto de amplificación; (4) ensayo de agregación con AuNPs. Una vez añadida la sal y tras varios minutos de incubación, se aprecian a simple vista las diferencias de color. Los resultados iniciales demostraron la viabilidad de la aproximación. Solamente las muestras que contenían el producto amplificado se mantuvieron en dispersión, ya que el ADN es adsorbido en la superficie de las nanopartículas (**Fig. 12**).

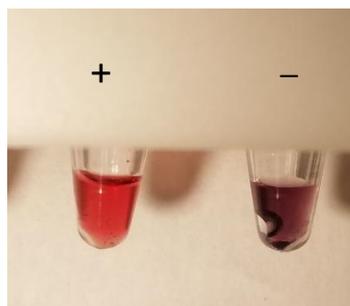


Figura 12. Ensayo de agregación *non-crosslinking* con AuNPs sin funcionalización para la detección indirecta de gluten a partir de ADN genómico extraído de alimentos 30 minutos después de añadir sal; +: control positivo; -: control negativo.

Una de las mayores ventajas de los sistemas NCL descritos en este apartado es que, además de que las nanopartículas son más fáciles de preparar que en los ensayos CL, la agregación se produce más rápidamente ya que está determinada por las fuerzas de London entre AuNPs cuando aumenta la concentración de sal en el medio, mientras que la agregación *crosslinking* está gobernada por las colisiones aleatorias entre nanopartículas (Sato *et al.*, 2003). No obstante, apenas se han llevado a cabo estudios que comparen la rapidez del cambio de color entre estas dos estrategias de agregación bajo las mismas condiciones. Uno de los pocos **estudios comparativos** es el de Wang *et al.*, con el que demostraron que los ensayos CL y NCL responden de forma opuesta frente a la concentración de ADN diana presente en la disolución coloidal. Cuando el ADN de la muestra se añade a bajas concentraciones, el sistema CL agrega más rápido que el sistema NCL. Por el contrario, cuando el ADN de la muestra se añade a mayor concentración, la agregación NCL se produce antes que por CL. Este descubrimiento es de vital importancia a la hora de diseñar el sistema de detección más adecuado para una aplicación concreta. La estrategia CL será más favorable para la detección de analitos con elevada sensibilidad, mientras que la detección mediante NCL será más adecuada cuando el analito se encuentre abundantemente en la muestra o su amplificación previa no sea un inconveniente (Wang *et al.*, 2017). Por otro lado, los ensayos de agregación con AuNPs sin funcionalizar son más fáciles de ejecutar ya que la preparación de las nanopartículas es más sencilla y rápida, y además no depende del reconocimiento ADN-ADN, que suele ser lento y de baja eficiencia. Sin embargo, su aparente simplicidad acarrea otras limitaciones como, por ejemplo, menor especificidad, la agregación inespecífica o la necesidad de mantener el equilibrio de sonda:ADN para que el ensayo no se vuelva incontrolable (Deng *et al.*, 2012).

4.1.3. AGREGACIÓN REVERSIBLE

Recientemente se han desarrollado biosensores basados en la **agregación reversible**, donde la muestra se añade a una disolución de nanopartículas funcionalizadas con oligonucleótidos en estado de agregación y los analitos inducen su redispersión. Puesto que la disgregación de las AuNPs va acompañada del cambio de color de azul a rojo, se puede usar como principio de detección colorimétrica. La mayoría de este tipo de ensayos inducen la redispersión de AuNPs agregadas por *crosslinking*, ya que, como se ha comentado en la sección 4.1.1, se trata de un tipo de agregación que se puede revertir debido a la naturaleza de la hibridación de las moléculas de ADN.

Hazarika *et al.* fueron los primeros en proponer un sistema de redispersión de nanopartículas basado en la **reacción de desplazamiento de cadenas** (Hazarika *et al.*, 2004). Esta reacción se define como el proceso mediante el cual dos hebras con complementariedad parcial o completa hibridan entre sí, desplazando en el proceso a una o más hebras prehibridadas. La cinética del desplazamiento de cadenas se controla mediante ciertos mecanismos denominados “puntos de apoyo” (o *toeholds*), que son secuencias monocatenarias encargadas de desencadenar la reacción (Velázquez, 2014).

En base a esto, se han diseñado plataformas analíticas donde las secuencias diana son complementarias al *linker* y pueden deshacer el complejo *linker*-AuNPs, con la consiguiente redispersión de la disolución (**Fig. 13a**) (Hazarika *et al.*, 2004; Duan *et al.*, 2015). Sin embargo, el proceso de desensamblaje puede llegar a ser muy lento, ya que las moléculas *linkers* dentro de los agregados tienen poca accesibilidad para interactuar con las moléculas diana, por lo que la cinética de hibridación se ralentiza, pudiendo alargarse durante más de 6 horas (Trantakis *et al.*, 2013). Por ello, en los últimos años se han desarrollado estrategias para **acelerar el análisis**. Múltiples estudios han demostrado que la introducción de *gaps* y extensiones en la secuencia *linker* son indispensables para la reacción de desplazamiento de cadena. Zhou *et al.* mediante el diseño meticuloso de estas secuencias redujeron el tiempo de ensayo a 50 minutos, alcanzado un LDD de 2 nM. Asimismo, a este ensayo incorporaron una enzima exonucleasa III para aumentar la señal. Esta enzima actúa una vez se ha formado el dúplex *linker*-diana, degradando la secuencia *linker* para que la molécula diana quede libre y pueda volver a intervenir en otra reacción de desplazamiento de cadena (**Fig. 13a**). De esta forma se logra aumentar el ratio de disgregación a partir de la misma concentración de ADN diana (Zhou *et al.*, 2013). Además, Lam *et al.* mediante un estudio sistemático de la influencia de la temperatura sobre la disgregación y con la incorporación de *toeholds*, desarrollaron un ensayo rápido, cuya desensamblaje se da en menos 5 minutos y que puede llevarse a cabo en un amplio rango de temperaturas, también a temperatura ambiente (Lam *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha descrito una estrategia distinta de agregación reversible, en la que se utilizan AuNPs funcionalizadas con ácido 11-mercaptoundecanoico, cuya agregación se induce por la adición de ión Mg^{2+} . Para revertir la dispersión se lleva a cabo una amplificación **isotérmica mediada por bucle** (LAMP) de la secuencia que se quiere detectar. Durante la reacción se produce ión pirofosfato ($P_2O_7^{4-}$) como subproducto, el cual actúa como quelante del ión magnesio, de manera que a medida que tiene lugar la amplificación, los agregados de AuNPs se irán redispersando (**Fig. 13b**). En cambio, en ausencia del ADN diana, puesto que no tendrá lugar la reacción, las nanopartículas se mantendrán agregadas. De esta forma se logra un ensayo

sencillo, que reduce el riesgo de contaminación, ya que la amplificación y la detección se lleva a cabo al mismo tiempo, y que alcanza un límite de detección de 17 aM (Wong *et al.*, 2014).

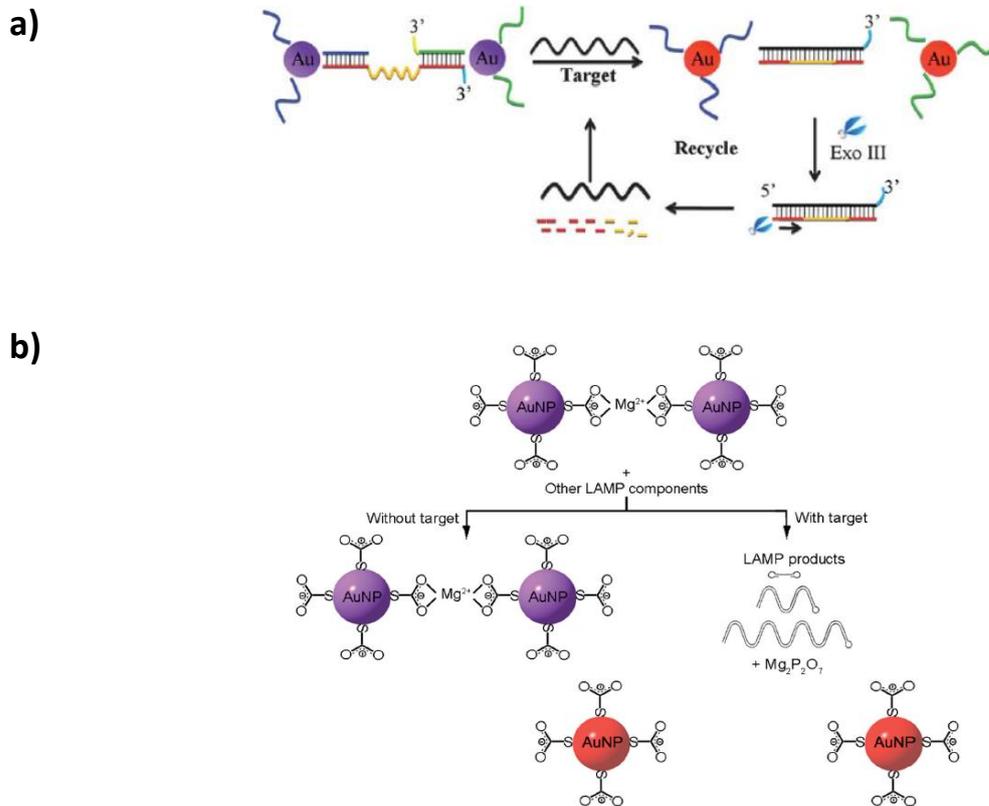


Figura 13. Ensayos de agregación reversible a) Esquemas de ensamblaje/desensamblaje de AuNPs mediado por desplazamiento de cadena y por exonucleasa III. El oligonucleótido *linker* diseñado contiene gaps (recuperado de Zhou *et al.*, 2013). b) Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y ensayo colorimétrico mediante nanopartículas funcionalizadas con ácido 11-mercaptopundecanoico. La disgregación de las AuNPs está condicionada por la amplificación de producto y la formación de ión pirofosfato (recuperado de Wong *et al.*, 2014).

4.1.4. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LAS PRESTACIONES

Para poder mejorar las prestaciones de los ensayos de agregación descritos han surgido pequeñas variaciones respecto a los formatos de detección. Por ejemplo, el método convencional en disolución puede ir acompañado con el desarrollo posterior de un **ensayo *northwestern*** en placa cromatográfica de capa fina (Tan *et al.*, 2005). Esta es una forma sencilla, rápida y económica de aumentar la señal colorimétrica, se realiza a temperatura ambiente y lleva menos de 10 minutos. Además, permite reducir el volumen de la muestra hasta 10 veces, ya que solo son necesarios 1-3 μ L (Sato *et al.*, 2005; Elghanian *et al.*, 1997) y aporta estabilidad al ensayo independientemente de la temperatura, lo cual es especialmente relevante para las plataformas *crosslinking*, ya que se evita que el aumento de la temperatura por encima de la temperatura de fusión produzca la disgregación de las nanopartículas (Storhoff *et al.*, 1998).

Otra forma de aumentar la sensibilidad es **optimizar el diámetro de las AuNPs**, ya que a mayor tamaño, mayor es el coeficiente de extinción molar. Sin embargo, la estabilidad coloidal se ve comprometida con el aumento del diámetro de estas, pues se puede producir la autoagregación por sedimentación gravitacional. De manera que se debe seleccionar un tamaño de compromiso que concilie sensibilidad con estabilidad. Un diámetro de 40-50 nm parece ser un tamaño adecuado (Sato *et al.*, 2006; Reynolds *et al.*, 2000b).

Por otro lado, la técnica de **dispersión dinámica de luz** ha demostrado ser sensible para evaluar las interacciones macromoleculares y para detectar la formación de agregados en disolución (Storhoff *et al.*, 2004a; Javier *et al.*, 2009). Antes de ejecutar esta medición, se lleva a cabo el ensayo estándar de agregación y a continuación se deposita una alícuota de 1 μL sobre un portaobjetos de vidrio. La medida llevada a cabo a continuación consiste en utilizar una fuente de iluminación evanescente por medio de una guía de onda de soporte y la detección colorimétrica basada en la dispersión de la luz por parte de las nanopartículas. La intensidad de dispersión es distinta según se haya producido o no agregación de los coloides. Las nanopartículas de 50 nm en suspensión generan dispersión verde, mientras que las que han agregado generan una mayor intensidad de dispersión, de luz naranja. Estas diferencias son apreciables a simple vista y pueden cuantificarse midiendo el espectro de dispersión de la luz a lo largo del espectro visible. A partir de este sistema se ha logrado aumentar el rango dinámico de detección en comparación con los ensayos de absorbancia, así como un aumento de la sensibilidad (LDD = 50 amol) (Cordray *et al.*, 2012).

4.2. SISTEMAS BASADOS EN HIBRIDACIÓN EN SUPERFICIE

4.2.1. ENSAYOS EN FORMATO DE MICROMATRIZ

Con el objetivo de desarrollar plataformas sensibles y con mayor capacidad multiplex, se han desarrollado ensayos de hibridación en superficie en formato micromatriz, que permiten detectar entre cientos y miles de secuencias de ADN o ARN distintas en un mismo ensayo. Estos sistemas de biosensado no se basan en el efecto de acoplamiento de plasmón de superficie, sino que la señal colorimétrica generada por las nanopartículas se da a causa de su captura y su concentración en una superficie densamente funcionalizada (Thaxton *et al.*, 2006).

Taton *et al.* fueron los pioneros en utilizar AuNPs como marcadores en ensayos con formato de micromatriz, logrando un LDD de 50 fM (Taton *et al.*, 2000), que supone una sensibilidad 1000 veces mayor que el marcaje fluorescente Cy3 (Storhoff *et al.*, 2004b). Para ello se basaron en un ensayo sándwich, constituido por una sonda inmovilizada en un soporte sólido, una secuencia diana y una ADN-AuNP de 13 nm (**Fig. 14a**).

Cuando la concentración del analito es elevada (de picomolar alto a nanomolar), este formato de ensayo aporta resultados a simple vista, sin instrumental adicional. Además, mediante la **medición escanométrica** de la dispersión de la luz, se pueden obtener medidas cuantitativas. Sin embargo, cuando el analito se encuentra en menor concentración (attomolar o picomolar medio), es necesario amplificar la señal de dispersión de la luz, lo cual suele hacerse a través del

crecimiento de los núcleos de oro. Esto se consigue a través de una reacción que conduce a un aumento considerable del tamaño de los AuNPs (hasta micras), mejorando significativamente la sensibilidad general de la detección, y que se lleva a cabo al final del ensayo para evitar problemas de estabilidad de estas. Esta reacción se basa en la **deposición catalítica** de un metal en la superficie de los AuNPs promovida por un agente reductor (Valentini & Pompa, 2013). El metal más utilizado es la plata, que produce manchas grises oscuras fácilmente visualizables sin necesidad de instrumentación, y cuyas intensidades también se pueden cuantificar en una escala de grises utilizando un escáner de superficie plana para la adquisición de imágenes. La ganancia en sensibilidad a través de este método de amplificación puede ser tan grande como cinco órdenes de magnitud (Tanton *et al.*, 2000).

Además, para lograr suficiente poder de discriminación entre secuencias que únicamente difieren en una base, se emplean dos sondas, una específica de alelo inmovilizada en el soporte, y una específica de locus inmovilizada en la AuNP. De esta forma se evita señal inespecífica que se pueda generar por secuencias pseudohomólogas o largas cadenas de ADN genómico (Bao *et al.*, 2005). Sin embargo, este **método de genotipado** implica múltiples pasos secuenciales de hibridación y lavados para eliminar el exceso de oligonucleótidos no capturados; unos lavados que además deben ser rigurosamente optimizados para poder permitir la discriminación de SNPs, al igual que la temperatura, que debe ser controlada exhaustivamente. En relación con este inconveniente, como ya se ha mencionado en los sistemas de agregación, la introducción de un paso de ligación por una enzima ADN ligasa permite la discriminación de SNPs sin requerir unas condiciones de hibridación y de lavado estrictas (Xue *et al.*, 2009).

También se han desarrollado micromatrices para el **análisis de expresión génica** a partir de ARNm sin retrotranscripción previa (Huber *et al.*, 2004). Mediante secuencias específicas inmovilizadas en la superficie y AuNPs modificadas con sondas oligo-dT, se ha logrado detectar hasta 0,5 µg de ARN total humano tras un tiempo de hibridación de 2 horas por medición de la dispersión de la luz de las AuNPs.

Por otra parte, se pueden desarrollar dispositivos de **detección multicolor** utilizando nanopartículas de diferentes tamaños en un mismo ensayo, diseñadas para dispersar la luz a diferentes longitudes de onda de acuerdo con las distintas resonancias de plasmón de superficie de las AuNPs. Con este formato se ha desarrollado un sistema con nanopartículas de 50 y 100 nm, cada una con especificidad para una secuencia de interés distinta, observando luz verde o luz naranja según queden inmovilizadas las AuNPs de 50 nm o de 100 nm, respectivamente (Taton & Mirkin, 2001).

Finalmente, el biosensado de ácidos nucleicos basados en los sistemas de **biocódigos de barras** han logrado aunar la capacidad multiplex (Stoeva *et al.*, 2006), una elevada sensibilidad y la posibilidad de eludir la amplificación previa de la muestra por PCR. Los códigos de barras (*barcode*) son secuencias cortas de ADN (hasta 100 nts) que sirven para identificar de forma específica una secuencia de interés. Estos oligonucleótidos actúan en el ensayo como sustitutos de la secuencia diana y como un medio de amplificación de la señal. En estos ensayos se utilizan dos tipos de partículas: nanopartículas de oro y partículas magnéticas. La secuencia diana presente en la muestra es capturada a través de una hibridación tipo sándwich con las sondas inmovilizadas en la superficie de las partículas magnéticas y con las sondas de las AuNPs (**Fig.**

14b). Además, las AuNPs tiene inmovilizada un segundo tipo de sonda complementaria a la secuencia *barcode* (presente en la superficie de la nanopartícula en mayor proporción que la sonda complementaria al ADN diana). Tras la reacción entre la secuencia diana y los dos tipos de partículas, por aplicación de un campo magnético se separan las partículas magnéticas de los componentes que no han reaccionado, y las moléculas *barcode* son liberadas mediante tratamiento térmico (Nam *et al.*, 2004) o por una reacción con ditiotreitolo (Thaxton *et al.*, 2005). Finalmente, las sondas *barcode* pueden ser identificadas en ensayos en formato de micromatriz por detección escanométrica, pudiéndose alcanzar un límite de detección en el orden de zeptomolar, y con un amplio rango dinámico, que pueden cubrir hasta cuatro órdenes de magnitud (Nam *et al.*, 2004).

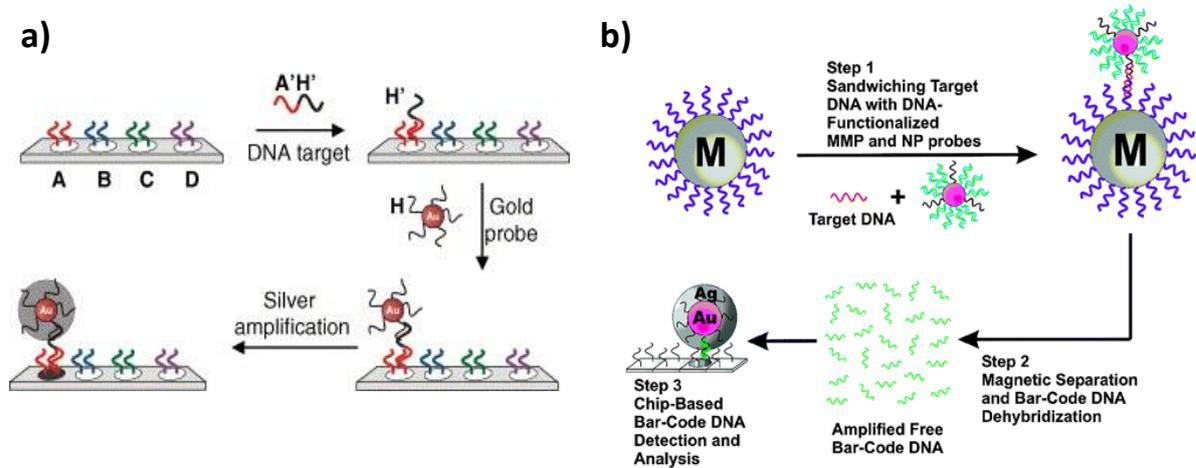


Figura 14. Ensayos en formato de micromatriz que utilizan AuNPs como marcadores colorimétricos. a) Ensayo de detección escanométrica. Las secuencias inmovilizadas en la superficie capturan las secuencias diana específicas. Las sondas de las AuNPs hibridan con las secuencias diana y actúan como catalizadores de la reducción de plata (recuperado de Storhoff *et al.*, 2004b). b) Procedimiento de biocódigo de barras. A través de partículas magnéticas (M) y partículas de oro, las moléculas diana son capturadas. Posteriormente las sondas *barcode* liberadas se detectan por mediciones escanométricas (recuperado de Nam *et al.*, 2004).

4.2.2. ENSAYOS EN FORMATO DE FLUJO LATERAL

En las últimas décadas, los ensayos rápidos inmunocromatográficos se han convertido en una de las plataformas más adecuadas para el desarrollo de dispositivos POC. Esto es debido a que se basan en un diseño sencillo y compacto, fácil de transportar, de bajo coste, que aporta resultados rápidos y sencillos de interpretar a simple vista, sin requerimiento de instrumental adicional (Yu & Wei, 2018).

Se han desarrollado ensayos en formato de flujo lateral para la detección de ácidos nucleicos en los que las nanopartículas de oro actúan como transductores, generando una señal colorimétrica de color rojo. Glynou *et al.* fueron los primeros en incorporar ADN-AuNPs en este

tipo de ensayo, cuyo diseño permitió la detección visual en 10 minutos de hasta 2 femtomoles de ADNcd previamente amplificado (Glynou *et al.*, 2003). Estas plataformas combinan las propiedades ópticas únicas de las AuNPs y la alta eficiencia de **separación cromatográfica**, y permiten que la reacción de hibridación del ADN se lleve a cabo directamente en la tira reactiva ya que todos los reactivos necesarios están incorporados en el soporte. Además, omite los pasos múltiples de incubación y lavado propios de los formatos de micromatrices, reduciendo el tiempo de análisis (He *et al.*, 2011).

Las tiras de flujo lateral se componen de cuatro partes principales: (1) el soporte poroso para depositar la muestra; (2) el soporte que almacena el conjugado; (3) la zona de membrana con las sondas inmobilizadas; (4) y la banda absorbente que induce el movimiento de la muestra por capilaridad. Al comienzo del ensayo, el ADN de la muestra se introduce en la zona de aplicación y comienza a avanzar (**Fig. 15**). Durante la migración, el analito hibrida con las sondas de las AuNPs contenidas en la tira reactiva. El complejo formado continúa su avance hacia la membrana, donde hay inmobilizada una sonda de detección y una sonda control para formar las líneas de prueba y de control, respectivamente. El complejo diana-AuNP hibrida con la sonda inmobilizada y por acumulación de AuNPs se visualiza una banda roja en la línea prueba. El exceso de diana-AuNP se dirige hacia la línea control, que sirve para confirmar que el ensayo se ha realizado correctamente (Mao *et al.*, 2009a).

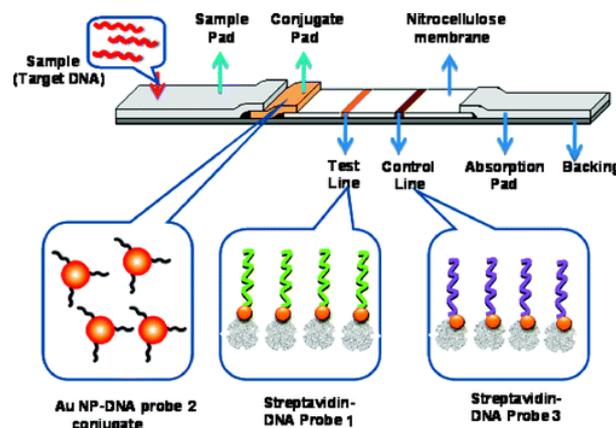


Figura 15. Esquema de la configuración de un ensayo de flujo lateral. La secuencia diana avanza por capilaridad a lo largo de la tira reactiva, alcanza el soporte que almacena al conjugado, donde es capturada por las AuNPs, y finalmente la señal colorimétrica es generada por la acumulación de nanopartículas de oro en las líneas de prueba y control (recuperado de Mao *et al.*, 2009a).

Por lo tanto, al final del ensayo, si la muestra contiene el ADN de interés, tanto en la línea de prueba como en la línea de control aparecerán bandas rojas. Además del análisis cualitativo a simple vista, se pueden realizar medidas cuantitativas o semicuantitativas midiendo la densidad óptica de las manchas obtenidas en el revelado mediante técnicas y programas de procesamiento de imágenes.

Para garantizar la sensibilidad y reproducibilidad de estos dispositivos, es muy importante la **optimización de parámetros** como el tamaño de las nanopartículas, la concentración de las

sondas inmovilizadas, el tiempo de ensayo o los tampones utilizados. Por ejemplo, el diámetro de las AuNPs, al igual que en los ensayos de agregación, no es recomendable que sea mayor de 50 nm. La intensidad de la banda disminuye con el aumento de tamaño, así como la velocidad de migración de las nanopartículas, perdiendo sensibilidad y ralentizando el análisis (Mao *et al.*, 2009a). Los tampones también son cruciales para optimizar el ensayo, ya que minimizan la adsorción inespecífica en la membrana. El tampón de migración es especialmente influyente, ya que debe facilitar la rehidratación y el avance de las AuNPs; debe migrar a una velocidad de flujo intermedia, que dé tiempo suficiente para que el analito interactúe con los receptores, pero que al mismo tiempo asegure rapidez del ensayo. Además, la concentración del tampón tiene un efecto significativo en la intensidad de la línea de prueba (Glynou *et al.*, 2003).

Mediante este esquema de biosensado, Mao *et al.* diseñaron una plataforma con un límite de detección en el orden de nM, insuficiente para su aplicación en el diagnóstico genético. Por ello, introdujeron el **marcaje enzimático con HRP** que redujo el LDD a 50 pM (Mao *et al.*, 2009a). Este doble marcaje consiste en utilizar AuNPs funcionalizadas con oligonucleótidos y con HRP. Tras aplicar la muestra y completar el ensayo cromatográfico, se añade a la tira reactiva el sustrato enzimático, de manera que, como producto de la reacción, se obtiene un cromógeno insoluble de color rojo que precipita y se deposita en las zonas de prueba y de control, aumentando la intensidad de las bandas. Posteriormente, mediante la optimización de este ensayo, el LDD se redujo a 0,01 pM (He *et al.*, 2011). Este mismo grupo también desarrolló un biosensor para detectar **microARN** en tampones y muestras biológicas (Gao *et al.*, 2014).

Basados en un principio similar, se han desarrollado ensayos en formato de flujo lateral para la **detección de SNPs** (Konstantou *et al.*, 2009; Elenis *et al.*, 2011). En 2007, Litos *et al.* desarrollaron el primer test de flujo lateral dirigido a la detección de los productos de la reacción de extensión de cebadores. Los cebadores alelo-específicos son diseñados con una cola poly(dA) a través de la cual el producto de la amplificación interactúa con las poly(dT)-AuNPs. Además, durante la extensión, un residuo biotina-dUTP es incorporado, de modo que cuando los híbridos de ADN-AuNPs llegan a la membrana, los complejos quedarán retenidos en la línea de prueba, donde se encuentran inmovilizadas moléculas de estreptavidina. Mediante este sistema, solo los cebadores cuyo extremo 3' es complementario a la secuencia problema generarán señal en la línea de prueba. Una segunda línea se forma en la zona de control por la hibridación de las poly(dT)-AuNPs excedentes con las sondas oligo(dA) inmovilizadas en la superficie (Litos *et al.*, 2007a). Sin embargo, a pesar de la sensibilidad de las tiras y de que estos ensayos permiten reducir el número de ciclos de extensión, la amplificación previa por PCR compromete a la rapidez del análisis.

Otros principios de genotipado también han sido adaptados al formato de flujo lateral. Por ejemplo, se pueden utilizar AuNPs funcionalizadas con **oligonucleótidos en horquilla** que portan una molécula de biotina en su extremo 3' que se encuentra inicialmente inactiva (Mao *et al.*, 2009b; He *et al.*, 2010). En presencia de ADN complementario, la horquilla se abre y forma un dúplex con este, dejando expuesta a la molécula de biotina para interactuar con la estreptavidina preinmovilizada en la línea de prueba de la tira reactiva. La cantidad de grupos de biotina activos que se generarán variará en función de la presencia de nucleótidos no complementarios en el ADN diana. Por ello, la intensidad de la línea de prueba será significativamente menor en las muestras que contengan SNPs. Este sistema obtiene un nivel de

discriminación tan bajo como 10 pM entre el ADN perfectamente complementario y el ADN con SNPs, en 25 minutos y sin un control exhaustivo de la temperatura (He *et al.*, 2010).

Otra característica atractiva de los ensayos inmunocromatográficos es su **capacidad multiplex**. Estos ensayos pueden adaptarse para detectar varias secuencias en una misma tira reactiva, mediante la adición de dos o más líneas de prueba (Dineva *et al.*, 2005; Konstantou *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015), e incluso se han desarrollado biosensores capaces de detectar hasta 10 alelos distintos. En ese caso, las sondas de captura primero son conjugadas a **microesferas de poliestireno**, las cuales quedan inmovilizadas en la membrana de nitrocelulosa. Este método de inmovilización evita cualquier difusión ya que las microesferas quedan atrapadas en las fibras de la membrana, y por ello es posible inmovilizar un elevado número de sondas distintas en un área muy pequeña sin comprometer la simplicidad, especificidad y reproducibilidad del biosensor (Elenis *et al.*, 2011).

Por otro lado, biosensores de flujo lateral basados en la **amplificación isotérmica** han logrado alcanzar una sensibilidad de hasta 0,01 fM de ácidos nucleicos (Lie *et al.*, 2012). Se ha desarrollado un método de amplificación de la señal en cascada mediado por una sonda de ADN en horquilla con un LDD de 100 aM (Liu *et al.*, 2013a).

4.3. OTROS SISTEMAS

4.3.1. SISTEMAS EN DISOLUCIÓN

Además de los sistemas en disolución basados en agregación, expuestos en el apartado 4.2, existen otros sistemas de biosensado en disolución.

Un ejemplo de ello son los ensayos basados en AuNPs y **micropartículas magnéticas** (Fig. 16), los cuales son más estables y fáciles de optimizar que los basados en agregación (Liu *et al.*, 2012). Valentini *et al.* diseñaron un sistema en el que la secuencia diana interacciona con las micropartículas a través de la unión biotina-estreptavidina y al mismo tiempo, siempre y cuando no contenga mutaciones puntuales, hibridan con una sonda discriminante que se encuentra conjugada a una AuNP. Por tanto, solo si el analito no contiene ninguna mutación puntual, se producirá la unión indirecta de las AuNPs con las esferas magnéticas. Tras varios lavados para eliminar las AuNPs no hibridadas, las muestras sin SNPs permanecerán de color rojo, las mutantes poseerán color amarillo y las muestras heterocigotas tendrán un color intermedio naranja. Esta plataforma permite llevar a cabo el ensayo a temperatura ambiente, con escasos volúmenes de muestra (3 μ L) y sin pasos adicionales de postamplificación (Valentini *et al.*, 2013).

Otro ensayo diseñado se basa en un procedimiento de **filtración** que permite reducir la señal de fondo y alcanzar límites de detección de hasta 500 pM. Se trata de una técnica sencilla, rápida (<15 min) y que se puede realizar a temperatura ambiente. Utiliza **microesferas de látex** y nanopartículas de oro funcionalizadas en disolución. La adición del ADN diana, puesto que es complementario a ambas sondas, inducirá la unión entre las AuNPs y las esferas de látex. Con la posterior filtración mediante un filtro de nitrocelulosa, las nanopartículas que se encuentren libres serán filtradas, mientras que las microesferas de látex quedan retenidas. Solo si las nanopartículas de oro han interactuado con las microesferas, quedarán retenidas junto a ellas.

Por tanto, en este ensayo se espera ver un cambio de color de blanco a rojo, el cual resulta mucho más sensible para el ojo humano que el cambio de rojo a azul propio de los sistemas basados en agregación (Reynolds *et al.*, 2000a).

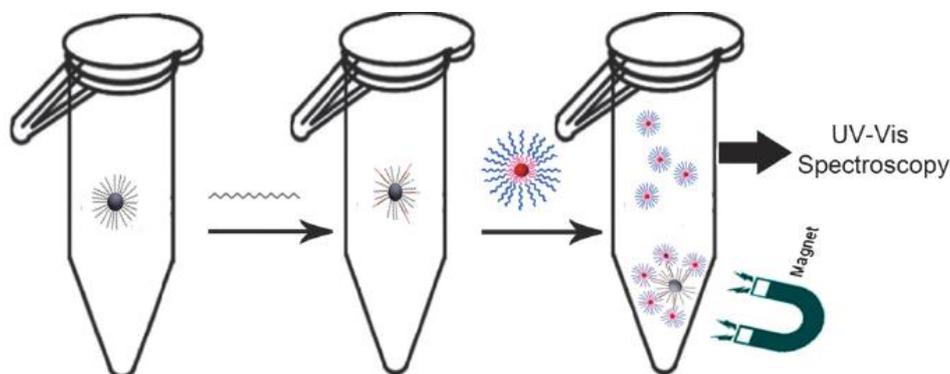


Figura 16. Representación esquemática de un sistema en disolución con nanopartículas de oro y partículas magnéticas no basado en agregación. Por separación magnética se retienen solo las partículas de oro que hayan hibridado con las partículas magnéticas y se observan las diferencias de color (recuperado de Liu *et al.*, 2012).

4.3.2. SISTEMAS EN GEL Y EN BICAPA LIPÍDICA

Para reducir el ruido de fondo de los ensayos convencionales con AuNPs ha surgido una estrategia que se basa en la captura selectiva de AuNPs en un hidrogel. Para ello, se inmoviliza una sonda de ADN en el **hidrogel**, de tal manera que al añadir la secuencia diana, las nanopartículas de oro quedan fijas en el gel, ya que se produce una hibridación tipo sándwich entre la nanopartícula, la sonda inmovilizada en el gel y la secuencia diana, la cual actúa como *linker* (**Fig. 17**). De esta forma, la transparencia inicial del gel desaparece y pasa a adquirir un color rojo. Además, la sensibilidad puede aumentarse aún más mediante un tratamiento con plata, alcanzando un límite de detección de 1 pM de ADN. Una ventaja más de esta estrategia es la capacidad de regeneración del gel, con rendimientos similares al del gel recién sintetizado (Baeissa *et al.*, 2010).

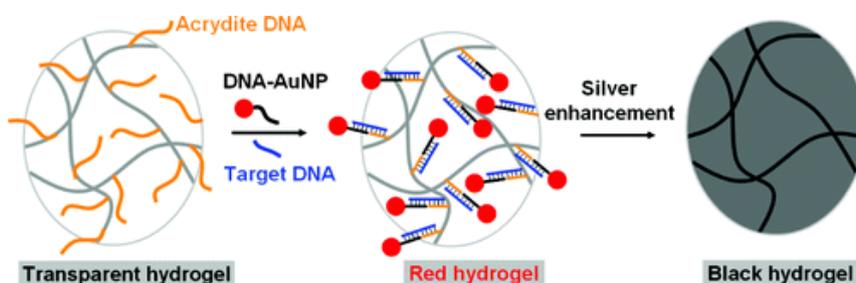


Figura 17. Representación esquemática del uso de un hidrogel funcionalizado con sondas de ADN y nanopartículas de oro para la detección colorimétrica de ADN. El gel transparente cambia a rojo en presencia del ADN diana. La señal se puede amplificar por reducción de plata (recuperado de Baeissa *et al.*, 2010).

Otros ensayos se basan en la agregación de las nanopartículas, pero en un formato 2D en una **bicapa lipídica** (Charrier *et al.*, 2007). Las nanopartículas se adsorben en la membrana lipídica por interacciones electrostáticas y, dada la naturaleza fluida de la bicapa, las AuNPs conservan movilidad para interactuar entre ellas y agregar por *crosslinking*. Sin embargo, la agregación no es detectable por el característico cambio de color de rojo a azul, ya que los agregados que se forman no son lo suficientemente grandes. Por ello, se ideó un nuevo método de detección basado en la desorción selectiva de las AuNPs no agregadas que produce la pérdida de color rojo en la disolución. Este tipo de ensayo es interesante ya que conserva la simplicidad de los sistemas homogéneos y al mismo tiempo, al desarrollarse en una superficie, también es adecuado para análisis multiplex (Charrier *et al.*, 2006).

5. APLICACIONES

Se han publicado diversos estudios que han aplicado los sistemas anteriormente descrito en muestras biológicas reales. En el presente Trabajo Fin de Grado, se han recopilado los estudios más relevantes, agrupándolos en función del campo de aplicación. Destaca especialmente su uso en la identificación de polimorfismos de único nucleótido (SNPs) (**Tabla 1**) y en la identificación de organismos patógenos (**Tabla 2**) en campos de la sanidad humana, alimentario y sanidad animal.

5.1. IDENTIFICACIÓN DE SNPs

5.1.1. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES GENÉTICAS

El diagnóstico genético puede ser de gran utilidad a la hora de determinar el tratamiento más eficaz para una enfermedad, predecir la evolución y pronóstico de esta, e incluso prevenirla en el caso de que se detecte antes de que se manifieste.

En esta categoría, hay que resaltar los ensayos con AuNPs que han sido aplicados a la identificación de marcadores oncogénicos, por ejemplo, a la detección de variantes en el gen KRAS a partir de muestras de lisado celular (Cui *et al.*, 2011) o en el gen supresor de tumores BRCA1 (Jung *et al.*, 2011). Otro ejemplo, es un ensayo dirigido a la detección de dos mutaciones en el gen β -globina, asociado con la β -talasemia, a través de un sistema de agregación NCL mediado por la ligación alelo-específica de ADN (Li *et al.*, 2008).

También se ha desarrollado ensayos colorimétricos con AuNPs para la identificación de SNPs asociados a la obesidad, a enfermedades trombóticas, enfermedades autoinmunes o al síndrome QT largo.

5.1.2. BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Los polimorfismos también son de extrema importancia para evaluar la resistencia a antibióticos de cepas altamente virulentas. Por ejemplo, basándose en la agregación diferencial NCL de ADN-AuNPs ha sido posible desarrollar un ensayo colorimétrico para la detección de mutaciones asociadas con la resistencia a la rifampicina en miembros del complejo *Mycobacterium*

tuberculosis a partir de muestras respiratorias de 25 pacientes, logrando resultados en menos de una hora tras la amplificación (Veigas *et al.*, 2013).

5.1.3. FARMACOGENÓMICA

La farmacogenómica es una disciplina emergente cuyo principal objetivo es el diseño de un tratamiento farmacológico personalizado en función del perfil genético del paciente. Ciertas variantes alélicas, como los SNPs, pueden afectar a la expresión y función de enzimas involucradas en el metabolismo de fármacos, de modo que estos SNPs dividen a la población en metabolizadores pobres (la dosis normal establecida puede producir efectos tóxicos), metabolizadores normales y metabolizadores ultrarrápidos (una dosis normal no tiene efecto terapéutico). Variantes de algunas de estas enzimas implicadas, como el citocromo P450 (CYP), han sido estudiadas en formato de flujo lateral mediante nanopartículas de oro funcionalizadas, con resultados en menos de 10 minutos (Litos *et al.*, 2007b).

En el caso de un tratamiento oncológico, la eficacia y tolerabilidad no solo depende de las características del paciente sino de las propias peculiaridades del tumor. Por ejemplo, uno de los tratamientos que se aplican para el cáncer de pulmón de células no pequeñas son inhibidores de la tirosina quinasa asociada al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Sin embargo, la eficiencia de este tratamiento está directamente relacionado con la presencia de mutaciones en el gen que codifica para EGFR, de modo que, a mayor ratio de mutaciones, menos efectivo es el tratamiento. Mediante un ensayo con AuNPs y la amplificación específica por CHA se han analizado SNPs asociados al gen EGFR en muestras de biopsia líquida), garantizando una sensibilidad de hasta 7,7 fM (Park *et al.*, 2018).

Tabla 1. Aplicación de ensayos con AuNPs para la identificación de SNPs

APLICACIÓN	Gen diana	Muestra biológica	Formato de ensayo	Tamaño AuNP (nm)	Amplificación	Medición	LDD	Plataforma	^a Tiempo análisis	Ref
CÁNCER	KRAS	Lisado celular	Agregación CL	13	EASA	UV-Visible	15 pM	Tubo	N/A	Cui <i>et al.</i> , 2011
	BRCA1	Muestras clínicas	Agregación NCL	13	PCR	Visual	20 ng ADNg	Tubo	N/A	Jung <i>et al.</i> , 2011
ENFERMEDADES TROMBÓTICAS	MTHFR FII FV	Sangre e hisopo bucal	Hibridación de superficie	15	No	Escáner	50 fM	Micromatriz	1 h	Bao <i>et al.</i> , 2005
B-TALASEMIA	HBB	Sangre	Agregación CL	13	PCR	UV-Visible	100-120 pM	Tubo	< 3 h	Li <i>et al.</i> , 2008
OBESIDAD	Fto	Muestras clínicas	Agregación NCL	14	PCR	UV-Visible	20 pg/mL	Tubo	1 h	Carlos <i>et al.</i> , 2014
AUTOINMUNIDAD E INFECCIONES	MBL2	Sangre	Hibridación de superficie	40	PCR	Visual	N/A	Tira reactiva	10 min	Litos <i>et al.</i> , 2007a
SÍNDROME DE QT LARGO	KCNE1	Muestras clínicas	Agregación NCL	13	PCR	UV-Visible	100 fmol	Tubo	10 min	Li & Rothberg, 2004b
FARMACO-GENÓMICA	CYP2D6, CYP2C19 y TPMT	Sangre	Hibridación de superficie	40	PCR	Escáner	N/A	Tira reactiva	10 min	Litos <i>et al.</i> , 2007b
	CYP2C19	Raíces capilares	Agregación NCL	15	PCR	UV-Visible	N/A	Tubo	20 min	Akiyama <i>et al.</i> , 2016
	EGFR	Tejido de cáncer de pulmón de células no pequeñas	Agregación CL	13	IR-NEANA	UV-Visible	1 pM	Tubo	30 min	Zou <i>et al.</i> , 2015
		Sangre	Agregación NCL	20	CHA	UV-Visible	7,7 fM	Tubo	N/A	Park <i>et al.</i> , 2018
BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS	rpoB del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Muestras respiratorias	Agregación NCL	14	PCR y LAMP	UV-Visible	N/A	Tubo	< 1 h	Veigas <i>et al.</i> , 2013

^aTiempo de detección: no se tiene en cuenta el tiempo de preparación, la amplificación y/o purificación del material genético; CHA: amplificación por ensamblaje de horquilla catalítica; CL: *crosslinking*; EASA: Amplificación asistida por exonucleasa III; EGFR: receptor de factor de crecimiento epidérmico; IR-NEANA: *reacción invasiva acoplada con amplificación de nanopartículas asistida por mellado de endonucleasa*; LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle; LDD: límite de detección; N/A: Información no disponible; NCL: *non-crosslinkin*.

5.2. IDENTIFICACIÓN DE ORGANISMOS PATÓGENOS

5.2.1. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Detectar de forma precisa y temprana el agente causal de una infección puede ser de gran importancia para aplicar un tratamiento con antibióticos o antivirales adecuados y para controlar su diseminación.

Los ensayos colorimétricos con nanopartículas de oro se han aplicado en el análisis de algunas de las enfermedades infecciosas que más problemas de salud causan a nivel global, especialmente en los países menos desarrollados. Por ejemplo, se han desarrollado ensayos de agregación capaces de detectar a los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual ocasiona más de un millón de muertes al año, a partir de muestras respiratorias (Costa *et al.*, 2010).

Otros estudios han logrado detectar el **virus de la inmunodeficiencia humana** en plasma y en suero de pacientes utilizando sistemas de flujo lateral y de micromatrices, mediante la identificación del gen *gag* (Rohrman *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2009). En cuanto a la **hepatitis B**, una infección potencialmente mortal y que se puede cronificar, a partir de AuNPs con sondas inmovilizadas se ha desarrollado ensayos en formato de micromatriz capaces de detectar el virus en una concentración de pM visualmente (Wang *et al.*, 2003).

Por otro lado, ***Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina**, una de las bacterias responsables de mayor número de infecciones persistentes en hospitales y clasificada por la OMS como una prioridad de salud pública en países desarrollados y subdesarrollados, también se ha detectado mediante análisis colorimétricos de agregación NCL usando AuNPs funcionalizadas con sondas específicas para los genes *mecA* y 23S RNA (Chan *et al.*, 2014).

Por último, la actual crisis sanitaria mundial provocada por la pandemia del COVID-19, causada por el **coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV)**, ha incrementado la necesidad de pruebas diagnósticas POC, rápidas y a gran escala para controlar su rápida expansión entre comunidades. Por ello, cabe destacar un estudio reciente que ha desarrollado un biosensor colorimétrico con AuNPs funcionalizadas con oligonucleótidos antisentido específicos para el gen N (fosforproteína de la nucleocápside), que permite ejecutar el análisis en 10 minutos tras la extracción del ARN. Además, es efectivo incluso aunque el virus mute, ya que está diseñado para la detección simultánea de dos regiones separadas del gen. Dadas las ventajas de este método, el próximo desafío será aplicarlo al análisis de muestras reales (Moitra *et al.*, 2020).

Además de estos patógenos, otros como *Helicobacter pylori*, el virus del papiloma humano de alto riesgo (oncogénicos), *Salmonella spp.*, etc. han sido identificados exitosamente en muestras clínicas.

5.2.2. SEGURIDAD ALIMENTARIA

Es imprescindible mantener la inocuidad de los alimentos para evitar crisis alimentarias, como el brote de listeriosis que se surgió en España en 2019 debido al consumo de carne mechada contaminada, y así preservar la salud del consumidor, ya que millones de personas enferman y mueren por consumir alimentos insalubres.

Los ensayos colorimétricos con AuNP pueden ser de gran utilidad en el control de la calidad alimentaria, tanto en la línea de producción como en las cadenas de distribución, ya que

permiten la rápida y sencilla identificación de patógenos transmisibles a través de los alimentos como, por ejemplo, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* o *Escherichia coli*, los cuales pueden provocar gastroenteritis, meningitis e incluso sepsis.

Se ha desarrollado un ensayo de agregación NCL con AuNPs no funcionalizadas para la detección de *Bacillus cereus* en muestras de leche. Las esporas formadas por *B. cereus* puede resistir la pasteurización de la leche y crecer en ella. Con este ensayo se logró un LDD de 3,4 CFU/mL en leche, el cual es adecuado para cumplir con el límite máximo impuesto por la comisión reguladora (500 CFU / mL), y mostró gran poder discriminación entre 10 bacterias patogénicas comunes en la leche (Li *et al.*, 2018).

La detección de *L.monocytogenes* y *S.enterica*, unas de las bacterias más frecuentes en alimentos, también ha sido posible mediante un ensayo de agregación NCL. El ensayo logró detectar las bacterias en leche contaminada y la especificidad se confirmó usando como control *Escherichia coli* (Fu *et al.*, 2013).

5.2.3. CONTROL VETERINARIO

Actualmente el 75% de las enfermedades emergentes son zoonóticas y han sido responsables de algunos de los brotes de enfermedades más dañinas en las últimas décadas, como el ébola, la gripe aviar o el SARS-CoV. Por ello, la sanidad animal es más importante que nunca y una de las formas más eficaces para preservarla es mediante métodos de detección precoces.

La protección de la salud de los animales es un factor esencial para lograr la seguridad alimentaria. Algunas de las zoonosis más comunes como las causadas por *Leptospira spp.*, *Brucella spp.* o *Mycobacterium spp* suelen contraerse por consumo de alimentos derivados de animales infectados. Por ello, para prevenirlo es imprescindible llevar un control exhaustivo en granjas y mataderos. Las granjas en zonas rurales y las clínicas veterinarias no suelen contar con unas infraestructuras suficientes para aplicar los controles pertinentes, por ello el desarrollo de pruebas colorimétricas sencillas con AuNPs pueden ser de gran utilidad.

Por ejemplo, se han desarrollado análisis de agregación CL capaces de detectar el gen BSCP31 de *Brucella spp.* en leche, orina y semen bovino, requiriendo un tiempo de análisis de 30 minutos. En el futuro esta prueba se podría aplicar en centros de germinación para examinar el semen antes de la inseminación artificial y para evaluar la leche a granel antes del envasado (Pal *et al.*, 2017).

5.2.4. BIOTERRORISMO

Bioterrorismo es el término utilizado para definir el empleo criminal de microorganismos patógenos, toxinas o sustancias dañinas contra la población con el propósito de generar enfermedad y muerte. Para poder hacer frente a la emergencia de salud, la biodefensa civil y los intereses de la seguridad nacional, es necesario contar con sistemas de detección eficaces para los agentes microbianos utilizados como armas biológicas.

Se han publicado estudios para la detección de dos patógenos extremadamente letales y contagiosos como son *Bacillus anthracis*, causante de carbunco, y el *virus variola*, causante de la viruela, mediante AuNPs en formato de biocódigo de barras, aunque en ambos casos se utilizaron oligonucleótidos sintéticos en lugar de muestras reales (Pokorski *et al.*, 2005; Stoeva *et al.*, 2006).

Tabla 2. Aplicación de ensayos con AuNPs para la identificación de organismos patógenos

ÁREA APLICACIÓN	Microorganismo	Gen diana	Muestra biológica	Formato de ensayo	Tamaño AuNPs (nm)	Amplificación	Medición	LDD	Plataforma	^a Tiempo análisis	Ref
DIAGNÓSTICO CLÍNICO	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	IS6110 y Rv3618	Espuito	Agregación CL	13	PCR anidada	UV-Visible	0,5 pmol	Tubo	2 h	Soo <i>et al.</i> , 2009
		GyrB	Muestras respiratorias	Agregación NCL	13	asPCR	UV-Visible y visual	N/A	Tubo	15 min	Costa <i>et al.</i> , 2010
	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina	mecA y 23S ARNr	Sangre, orina, hisopo bucal, pus, fluidos, muestras respiratorias	Agregación NCL	15	PCR	UV-Visible	500 ng ADN	Tubo	25 min	Chan <i>et al.</i> , 2014
	<i>Salmonella spp</i>	rADN 16S	Heces	Hibridación de superficie	N/A	No	Visual	5 x 10 ⁸ CFU	Tira reactiva	30 min	Yeung <i>et al.</i> , 2014
	<i>Helicobacter pylori</i>	ureC	Biopsia gástrica	Agregación CL	13	HDA	UV-Visible	10 CFU/ mL	Tubo	< 1 h	Gill <i>et al.</i> , 2008
	VPH-16 y VPH-18	L1	Células ectocervicales/ endocervicales	Agregación CL	13	asPCR multiplex	UV-Visible	0,14 nM	Tubo	20 min	Chen <i>et al.</i> , 2009
	VIH	gag	Plasma	Hibridación de superficie	60	NASBA	Escáner	1000 copias/mL	Tira reactiva	<30 min	Rohrman <i>et al.</i> , 2012
	VIH y <i>Treponema pallidum</i>	gag	Suero	Hibridación de superficie	60	asPCR multiplex	Visual	10 ⁴ copias/μL ADN	Micromatriz	5 h	Tang <i>et al.</i> , 2009
		Tpp47	Suero								
	VHB y VHC	gen S	Suero	Hibridación de superficie	8-15	PCR	Visual	36 pM	Micromatriz	75 min	Wang <i>et al.</i> , 2003
		gen C				RT-PCR		360 pM			
	VHE	ORF1	Suero	Hibridación de superficie	14	RT-PCR	Escáner	100 fM	Micromatriz	20 min	Liu <i>et al.</i> , 2006
	MERS-CoV	upE	Oligonucleótidos sintéticos	Agregación NCL	< 30	No	UV-Visible	1 pmol/ μL	Tubo	10 min	Kim <i>et al.</i> , 2019
SARS-CoV	gen N	Cultivo de células Vero	Agregación CL	19	No	UV-Visible	0,18 ng/ μ	Tubo	10 min	Moitra <i>et al.</i> , 2020	

ÁREA APLICACIÓN	Microorganismo	Gen diana	Muestra biológica	Formato de ensayo	Tamaño AuNP (nm)	Amplificación	Medición	LDD	Plataforma	^a Tiempo análisis	Ref
SEGURIDAD ALIMENTARIA	<i>Bacillus cereus</i>	cesB	Leche	Agregación NCL	13	asPCR	UV-Visible	3,4 × 10 ² CFU/mL leche	Tubo	5 min	Li <i>et al.</i> , 2018
	<i>Listeria Monocytogenes</i> y <i>Salmonella enterica</i>	hly	Leche	Agregación NCL	13	PCR	UV-Visible	2,1 × 10 ⁴ copias/μL ADN	Tubo	3-4 h	Fu <i>et al.</i> , 2013
		hut						2,6 × 10 ⁴ copias/μL ADN			
CONTROL VETERINARIO	<i>Brucella spp.</i>	BCSP31	Leche, orina y semen bovino	Agregación CL	30	No	Visual	10 ³ CFU/mL orina y semen 10 ⁴ CFU/mL leche	Tubo	30 min	Pal <i>et al.</i> , 2017
	<i>Brucella spp.</i> y <i>Leptospira spp</i>	IS711	ADNg bacteriano	Agregación CL	16	asPCR multiplex	Visual	10 pg	Tubo	20 min	Boby <i>et al.</i> , 2018
		Hap									
	<i>Bacillus anthracis</i>	N/A	Oligonucleótido sintético	Hibridación de superficie	N/A	Barcode	Escáner	500 zM	Micromatriz	3-4 h	Pokorski <i>et al.</i> , 2005
Viruela y ébola	N/A	Oligonucleótido sintético	Hibridación de superficie	13	Barcode	Escáner	N/A	Micromatriz	N/A	Stoeva <i>et al.</i> , 2006	

^aTiempo de detección: no se tiene en cuenta el tiempo de preparación, la amplificación y/o purificación del material genético; CL: *crosslinking*; DLS: dispersión dinámica de la luz; ADNg: ADN genómico; LDD: límite de detección; N/A: Información no disponible; NCL: *non-crosslinking*; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; HDA: amplificación isotérmica dependiente de helicasa; VHE: virus de la hepatitis E; VPH: virus del papiloma humano; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; MERS-CoV: Coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio; SARS-CoV: coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo grave; RT-PCR: PCR retrotranscriptasa.

6. PERSPECTIVAS DE FUTURO

En este Trabajo Fin de Grado se ha hecho un análisis bibliográfico del número de publicaciones que emplean AuNPs para ensayos de ácidos nucleicos (**Fig. 18**). Se puede observar que, desde sus inicios a finales del siglo XX, los sensores colorimétricos de ácidos nucleicos basados en AuNPs han experimentado un gran desarrollo. Los sistemas de agregación en disolución fueron los primeros en proponerse y son los que mayor volumen de publicaciones han generado hasta la fecha; no obstante, en los últimos años ha aumentado el interés por los ensayos en superficie, sobre todo por su capacidad de análisis múltiple, de hecho, más del 25% de las publicaciones de ensayos colorimétricos con AuNPs son en este formato. Sin embargo, existen todavía importantes retos científicos y técnicos a explorar, tanto a nivel de laboratorio de investigación como a nivel de desarrollo e innovación

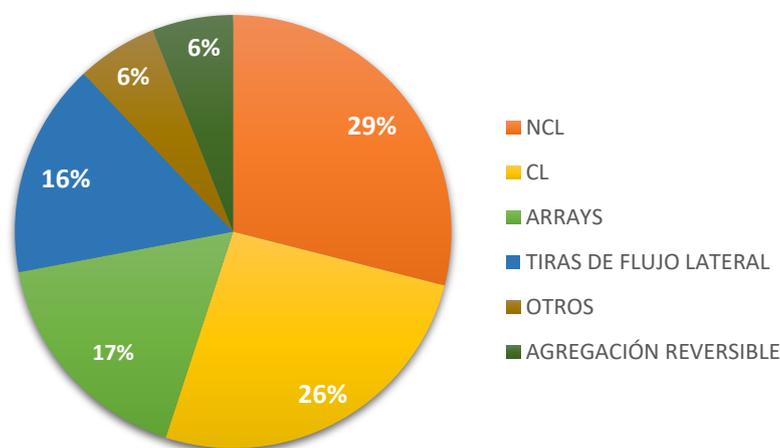


Figura 18. Biosensores colorimétricos basados en nanopartículas de oro clasificados en función del formato de ensayo. NCL: agregación *non-crosslinking*; CL: agregación *crosslinking*.

A nivel de investigación, se pretende mejorar y acelerar el **protocolo de preparación del análisis**, ya que, aunque en las últimas décadas la síntesis de AuNPs ha experimentado un avance importante que ha permitido abaratar significativamente su precio, es necesario obtener nanopartículas estándar, cuya síntesis sea reproducible. Actualmente se obtienen por métodos químicos, pero métodos físicos podrán ser usados en el futuro. Además, reducir los tiempos de incubación y las altas temperaturas requeridas para la funcionalización de las nanopartículas también supondría una importante mejora en la rapidez de la preparación de estos ensayos (Zhang *et al.*, 2018).

Asimismo, para trasladar las pruebas de concepto a aplicaciones reales, será necesaria la colaboración entre grupos de investigación de diferentes disciplinas para realizar **pruebas de campo y estudios piloto**. Estos estudios servirán para optimizar las plataformas analíticas; para evaluar la estabilidad y la robustez de los sistemas en el análisis *point-of-care*, probándolos en diferentes condiciones operativas (temperatura, humedad, etc.); y para comprobar su

capacidad de analizar muestras reales, ya que es totalmente diferente a la detección de biomarcadores en muestras enriquecidas en el laboratorio.

Por otro lado, desde una perspectiva traslacional, hoy en día existen pocos ejemplos de **biosensores comercializados** basados en AuNPs para la detección de ácidos nucleicos. Uno de los casos más exitosos fue el logrado por la empresa estadounidense Nanosphere™. Esta compañía tiene varios productos de diagnóstico in vitro aprobados por la FDA que dependen del uso de ADN-AuNPs. Verigene® es una de sus líneas de producción, cuya plataforma analítica se basa en cartuchos que detectan diversos patógenos y trastornos genéticos mediante un sistema de detección *crosslinking* (Nanosphere, Inc). Otro formato de ensayo que se prevé que en el futuro pueda llegar a la comercialización son las tiras de flujo lateral, ya que son rápidos de ejecutar, sencillos y con un precio asequible, de hecho, ya se han aprobado con éxito ensayos con AuNPs en formato de flujo lateral para la detección de proteínas (Alere, Inc; OraSure Technologies, Inc; MedMira, Inc; Trinity Biotech Plc).

Por consiguiente, aún queda un largo camino por recorrer hasta que las pruebas de concepto desarrolladas se materialicen en productos comerciales. En este sentido los **estudios de validación clínica y de comparación** constituirán un paso importante para cumplir con los estrictos requisitos exigidos por los correspondientes organismos reguladores (ej. FDA, Agencia Europea del Medicamento) hasta que finalmente puedan ser comercializados (Yu & Wei, 2018).

A nivel de desarrollo e innovación, la integración de los sensores plasmónicos con dispositivos electrónicos es un desafío muy interesante ya que puede acelerar su traslación al análisis POC. Por ejemplo, los **teléfonos móviles** o los relojes inteligentes pueden convertirse en herramientas prometedoras para lograr plataformas analíticas portátiles. Estos dispositivos pueden servir como espectrofotómetros, y pueden analizar en línea la información obtenida, sustituyendo a los equipos voluminosos de los laboratorios. Otra opción es la combinación de las estrategias basadas en AuNPs con **plataformas microfluídicas**, en especial las basados en papel. Todas estas propuestas podrían suponer un gran avance para la telemedicina y para la descentralización del análisis, poniendo el análisis molecular al alcance de regiones con pocos recursos económicos y de instalaciones que carecen de instrumentación sofisticada, como ambulatorios, hospitales de campaña o plantas de producción industrial (Verma *et al.*, 2015).

En definitiva, los próximos desafíos consisten principalmente en lograr la estandarización de los ensayos con AuNPs para que cumplan con los requisitos de comercialización exigidos, así como facilitar su aplicación *point-of-care* ya sea optimizando los ensayos preexistentes o diseñando nuevas plataformas que permitan la miniaturización y automatización del análisis. Además, será importante lograr dispositivos con capacidad de análisis en paralelo, y con mayor sensibilidad que las técnicas rutinarias actuales para que así se pueda prescindir de la amplificación previa y se pueda reducir el volumen de muestra (por ejemplo, a una gota de sangre o de orina). Todo esto garantizando un coste asequible para conseguir el acceso universal al diagnóstico molecular, incluso en las áreas más remotas (Baptista, 2018).

7. CONCLUSIÓN

El estudio bibliográfico realizado en este Trabajo Fin de Grado, que incluye 140 publicaciones científicas, ha puesto de manifiesto cómo las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro esféricas permiten desarrollar diferentes plataformas de análisis de ácidos nucleicos con excelentes prestaciones. Se ha comprobado que existe una continua investigación de nuevos principios de biosensado y formatos, así como una constante innovación y evolución de las plataformas ya desarrolladas. Este análisis permite concluir que los biosensores colorimétricos basados en nanopartículas de oro son sistemas analíticos con un enorme potencial en aplicaciones *point-of-care*.

Respecto a los objetivos parciales:

- Al comparar los métodos basados en nanopartículas de oro, queda de manifiesto que los ensayos de agregación basados en el acoplamiento plasmónico son los biosensores dominantes. Por otro lado, los ensayos en formato de micromatriz han mejorado la capacidad multiplex y han aumentado la sensibilidad del análisis; mientras que los ensayos de flujo lateral destacan por su sencillez y rapidez.
- Se han identificado tres áreas principales de aplicación: el diagnóstico clínico, tanto de enfermedades infecciosas como genéticas, la farmacogenómica y la seguridad alimentaria.
- Al analizar los avances alcanzados, las recientes investigaciones se han centrado en la obtención de plataformas ultrasensibles, el diseño de sistemas con capacidad de análisis múltiple y la reducción de la complejidad de los ensayos. También se han establecido los principales desafíos que deben abordar en los próximos años, que incluyen la miniaturización y automatización de los ensayos junto con la realización de estudios de validación y de pruebas de campo para lograr su translación al mercado.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AKIYAMA, Y., WANG, G., SHIRAIISHI, S., KANAYAMA, N., TAKARADA, T. & MAEDA, M. (2016). Rapid Naked-Eye Discrimination of Cytochrome P450 Genetic Polymorphism through Non-Crosslinking Aggregation of DNA-Functionalized Gold Nanoparticles. *ChemistryOpen*, 5(6): 508-512.
- ALI, M. M., KANDA, P., AGUIRRE, S. D. & LI, Y. (2011). Modulation of DNA-modified gold-nanoparticle stability in salt with concatemeric single-stranded DNAs for colorimetric bioassay development. *Chemistry—A European Journal*, 17(7): 2052-2056.
- ALVES, P. U., VINHAS, R., FERNANDES, A. R., BIROL, S. Z., TRABZON, L., BERNACKA-WOJCIK, I., IGREJA, R., LOPES, P., BAPTISTA, P.V., ÁGUAS, H., FORTUNATO, E. & MARTINS., R. (2018). Multifunctional microfluidic chip for optical nanoprobe based RNA detection—application to Chronic Myeloid Leukemia. *Scientific reports*, 8(1): 1-10.
- BAEISSA, A., DAVE, N., SMITH, B. D. & LIU, J. (2010). DNA-functionalized monolithic hydrogels and gold nanoparticles for colorimetric DNA detection. *ACS applied materials & interfaces*, 2(12): 3594-3600.
- BAKTHAVATHSALAM, P., RAJENDRAN, V. K. & MOHAMMED, J. A. B. (2012). A direct detection of Escherichia coli genomic DNA using gold nanoprobe. *Journal of nanobiotechnology*, 10(1): 1-10
- BAO, Y. P., HUBER, M., WEI, T. F., MARLA, S. S., STORHOFF, J. J. & MULLER, U. R. (2005). SNP identification in unamplified human genomic DNA with gold nanoparticle probes. *Nucleic acids research*, 33(2): 1.e15-7.e15
- BAPTISTA, P. V. (2018). Gold nanoprobe-based non-crosslinking hybridization for molecular diagnostics: an update. *Expert review of molecular diagnostics*, 18(9): 767-773.
- BAPTISTA, P., DORIA, G., HENRIQUES, D., PEREIRA, E. & FRANCO, R. (2005). Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *Journal of biotechnology*, 119(2): 111-117.
- BHALLA, N., JOLLY, P., FORMISANO, N. & ESTRELA, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60 (1): 1–8.
- BICHENKOVA, E. V., LANG, Z., YU, X., ROBERT, C. & DOUGLAS, K. T. (2011). DNA-mounted self-assembly: new approaches for genomic analysis and SNP detection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(1): 1-23.
- BOBY, N., ALI, S. A., PREENA, P., KAUR, G., KUMAR, S. & CHAUDHURI, P. (2018). Detection of multiple organisms based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticle and dark-field microscopy. *Talanta*, 188: 325-331.
- BRUST, M., WALKER, M., BETHELL, D., SCHIFFRIN, D. J. & WHYMAN, R. (1994). Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a two-phase liquid–liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 7: 801-802.
- CAI, M., LI, F., ZHANG, Y. & WANG, Q. (2010). One-pot polymerase chain reaction with gold nanoparticles for rapid and ultrasensitive DNA detection. *Nano Research*, 3(8): 557-563.
- CALABRIA, I., PEDROLA, L., BERLANGA, P., APARISI, M. J., SÁNCHEZ-IZQUIERDO, D., CAÑETE, A., CERVERA, J., MILLÁN, J. M. & CASTEL, V. (2016). El nuevo reto en oncología: la secuenciación NGS y su aplicación a la medicina de precisión. *Anales de pediatría*, 85(5): 273.e1-273.e7
- CARLOS, F. F., FLORES, O., DORIA, G. & BAPTISTA, P. V. (2014). Characterization of genomic single nucleotide polymorphism via colorimetric detection using a single gold nanoprobe. *Analytical biochemistry*, 465: 1-5.

- CHAKRABARTI, R. & KLIBANOV, A. M. (2003). Nanocrystals modified with peptide nucleic acids (PNAs) for selective self-assembly and DNA detection. *Journal of the American Chemical Society*, 125(41): 12531-12540.
- CHAN, W. S., TANG, B. S., BOOST, M. V., CHOW, C., & LEUNG, P. H. (2014). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a gold nanoparticle-based colourimetric polymerase chain reaction assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 53: 105-111.
- CHARRIER, A., CANDONI, N. & THIBAUDAU, F. (2006). DNA detection method based on the two-dimensional aggregation and selective desorption of nanoparticle probes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(26): 12896-12900.
- CHARRIER, A., CANDONI, N., LIACHENKO, N. & THIBAUDAU, F. (2007). 2D aggregation and selective desorption of nanoparticle probes: A new method to probe DNA mismatches and damages. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(9-10): 1881-1886.
- CHEN, S. H., LIN, K. I., TANG, C. Y., PENG, S. L., CHUANG, Y. C., LIN, Y. R., WANG, J. P. & LIN, C. S. (2009). Optical detection of human papillomavirus type 16 and type 18 by sequence sandwich hybridization with oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles. *IEEE transactions on nanobioscience*, 8(2): 120-131.
- CHEN, Y., LIU, J., YANG, Z., WILKINSON, J. S., & ZHOU, X. (2019). Optical biosensors based on refractometric sensing schemes: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 144, 111693.
- CHEN, Y., QIAN, C., LIU, C., SHEN, H., WANG, Z., PING, J., WU, J. & CHEN, H. (2020). Nucleic acid amplification free biosensors for pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 153(2): 120-131.
- CORDRAY, M. S., AMDAHL, M. & RICHARDS-KORTUM, R. R. (2012). Gold nanoparticle aggregation for quantification of oligonucleotides: optimization and increased dynamic range. *Analytical biochemistry*, 431(2): 99-105.
- COSTA, P., AMARO, A., BOTELHO, A., INÁCIO, J. & BAPTISTA, P. V. (2010). Gold nanoprobe assay for the identification of mycobacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(9): 1464-1469.
- CRAW, P. & BALACHANDRAN, W. (2012). Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab on a Chip*, 12(14): 2469-2486.
- CUI, L., KE, G., ZHANG, W. Y. & YANG, C. J. (2011). A universal platform for sensitive and selective colorimetric DNA detection based on Exo III assisted signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 2796-2800.
- CUTLER, J. I., AUYEUNG, E. & MIRKIN, C. A. (2012). Spherical nucleic acids. *Journal of the American Chemical Society*, 134(3): 1376-1391.
- DENG, H. & GAO, Z. (2015). Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques. *Analytica chimica acta*, 853: 30-45.
- DENG, H., XU, Y., LIU, Y., CHE, Z., GUO, H., SHAN, S., SUN, Y., LIU, X., HUANG, K., MA, X., WU, Y. & WU, Y. (2012). Gold nanoparticles with asymmetric polymerase chain reaction for colorimetric detection of DNA sequence. *Analytical chemistry*, 84(3): 1253-1258.
- DENG, H., ZHANG, X., KUMAR, A., ZOU, G., ZHANG, X. & LIANG, X. J. (2013). Long genomic DNA amplicons adsorption onto unmodified gold nanoparticles for colorimetric detection of *Bacillus anthracis*. *Chemical Communications*, 49(1): 51-53.
- DINEVA, M. A., CANDOTTI, D., FLETCHER-BROWN, F., ALLAIN, J. P. & LEE, H. (2005). Simultaneous visual detection of multiple viral amplicons by dipstick assay. *Journal of clinical microbiology*, 43(8): 4015-4021.

- DUAN, R., WANG, B., HONG, F., ZHANG, T., JIA, Y., HUANG, J., HAKEEM, A., LIU, N., LOU, X. & XIA, F. (2015). Real-time monitoring of enzyme-free strand displacement cascades by colorimetric assays. *Nanoscale*, 7(13): 5719-5725.
- ELENIS, D. S., IOANNOU, P. C. & CHRISTOPOULOS, T. K. (2011). A nanoparticle-based sensor for visual detection of multiple mutations. *Nanotechnology*, 22(15): 155501
- ELGHANIAN, R., STORHOFF, J. J., MUCIC, R. C., LETSINGER, R. L. & MIRKIN, C. A. (1997). Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 277(5329): 1078-1081.
- FU, Q., WU, Z., XU, F., LI, X., YAO, C., XU, M., SHENG, L., YU, S. & TANG, Y. (2016). A portable smart phone-based plasmonic nanosensor readout platform that measures transmitted light intensities of nanosubstrates using an ambient light sensor. *Lab on a Chip*, 16(10): 1927-1933.
- FU, Z., ZHOU, X. & XING, D. (2013). Rapid colorimetric gene-sensing of food pathogenic bacteria using biomodification-free gold nanoparticle. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 182: 633-641.
- FULLER, M. A. & KÖPER, I. (2019). Biomedical applications of polyelectrolyte coated spherical gold nanoparticles. *Nano convergence*, 6(1): 11.
- GAO, X., XU, H., BALODA, M., GURUNG, A. S., XU, L. P., WANG, T., ZHANG, X. & LIU, G. (2014). Visual detection of microRNA with lateral flow nucleic acid biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 54: 578-584.
- GARIBYAN, L. & AVASHIA, N. (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, 133(3): 1-4.
- GHOSH, S. K., & PAL, T. (2007). Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications. *Chemical reviews*, 107(11): 4797-4862.
- GILL, P., ALVANDI, A. H., ABDUL-TEHRANI, H. & SADEGHIZADEH, M. (2008). Colorimetric detection of *Helicobacter pylori* DNA using isothermal helicase-dependent amplification and gold nanoparticle probes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 62(2), 119-124.
- GLYNOU, K., IOANNOU, P. C., CHRISTOPOULOS, T. K. & SYRIOPOULOU, V. (2003). Oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization. *Analytical Chemistry*, 75(16): 4155-4160.
- HAZARIKA, P., CEYHAN, B., & NIEMEYER, C. M. (2004). Reversible switching of DNA-gold nanoparticle aggregation. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(47): 6469-6471.
- HE, Y., ZENG, K., GURUNG, A. S., BALODA, M., XU, H., ZHANG, X., & LIU, G. (2010). Visual detection of single-nucleotide polymorphism with hairpin oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 82(17): 7169-7177.
- HE, Y., ZHANG, S., ZHANG, X., BALODA, M., GURUNG, A. S., XU, H., ZHANG, X. & LIU, G. (2011). Ultrasensitive nucleic acid biosensor based on enzyme-gold nanoparticle dual label and lateral flow strip biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5): 2018-2024.
- HILL, H. D., MILLSTONE, J. E., BANHOLZER, M. J. & MIRKIN, C. A. (2009). The role radius of curvature plays in thiolated oligonucleotide loading on gold nanoparticles. *ACS nano*, 3(2): 418-424.
- HU, Y., CECCONELLO, A., IDILI, A., RICCI, F. & WILLNER, I. (2017). Triplex DNA nanostructures: From basic properties to applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(48): 15210-15233.
- HUBER, M., WEI, T. F., MÜLLER, U. R., LEFEBVRE, P. A., MARLA, S. S. & BAO, Y. P. (2004). Gold nanoparticle probe-based gene expression analysis with unamplified total human RNA. *Nucleic Acids Research*, 32(18): 1.e137-8.e137.

- HURST, S. J., LYTTON-JEAN, A. K. & MIRKIN, C. A. (2006). Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Analytical chemistry*, 78(24): 8313-8318.
- HUTTANUS, H. M., GRAUGNARD, E., YURKE, B., KNOWLTON, W. B., KUANG, W., HUGHES, W. L., & LEE, J. (2013). Enhanced DNA sensing via catalytic aggregation of gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 50: 382-386.
- JANA, N. R., GEARHEART, L. & MURPHY, C. J. (2001). Seeding growth for size control of 5– 40 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir*, 17(22): 6782-6786.
- JAVIER, D. J., CASTELLANOS-GONZALEZ, A., WEIGUM, S. E., WHITE, A. C. & RICHARDS-KORTUM, R. (2009). Oligonucleotide-gold nanoparticle networks for detection of *Cryptosporidium parvum* heat shock protein 70 mRNA. *Journal of clinical microbiology*, 47(12): 4060-4066.
- JUAN, M. L., RIGHINI, M., & QUIDANT, R. (2011). Plasmon nano-optical tweezers. *Nature photonics*, 5(6): 349-356.
- JUNG, Y. L., JUNG, C., PARAB, H., CHO, D. Y. & PARK, H. G. (2011). Colorimetric SNP Genotyping Based on Allele-Specific PCR by Using a Thiol-Labeled Primer. *ChemBioChem*, 12(9), 1387-1390.
- KANJANAWARUT, R. & SU, X. (2009). Colorimetric detection of DNA using unmodified metallic nanoparticles and peptide nucleic acid probes. *Analytical chemistry*, 81(15): 6122-6129.
- KIM, H., PARK, M., HWANG, J., KIM, J. H., CHUNG, D. R., LEE, K. S., & KANG, M. (2019). Development of label-free colorimetric assay for MERS-CoV using gold nanoparticles. *ACS sensors*, 4(5): 1306-1312.
- KONSTANTOU, J. K., IOANNOU, P. C. & CHRISTOPOULOS, T. K. (2009). Dual-allele dipstick assay for genotyping single nucleotide polymorphisms by primer extension reaction. *European Journal of Human Genetics*, 17(1): 105-111.
- LAM J. C. F., AGUIRRE, S. AND LI, Y. (2010). Nucleic Acids as Detection Tools, en *The Chemical Biology of Nucleic Acids*. Editorial Willey. Reino Unido, 401-431.
- LAM, M. K., GADZIKWA, T., NGUYEN, T., KAUSAR, A., ALLADIN-MUSTAN, B. S., SIKDER, M. D. & GIBBS-DAVIS, J. M. (2016). Tuning toehold length and temperature to achieve rapid, colorimetric detection of DNA from the disassembly of DNA–gold nanoparticle aggregates. *Langmuir*, 32(6): 1585-1590.
- LARGUINHO, M., CANTO, R., CORDEIRO, M., PEDROSA, P., FORTUNA, A., VINHAS, R. & BAPTISTA, P. V. (2015). Gold nanoprobe-based non-crosslinking hybridization for molecular diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*, 15(10): 1355-1368.
- LEE, K. S., & EL-SAYED, M. A. (2005). Dependence of the enhanced optical scattering efficiency relative to that of absorption for gold metal nanorods on aspect ratio, size, end-cap shape, and medium refractive index. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(43): 20331-20338.
- LI, F., LI, F., YANG, G., AGUILAR, Z. P., LAI, W. & XU, H. (2018). Asymmetric polymerase chain assay combined with propidium monoazide treatment and unmodified gold nanoparticles for colorimetric detection of viable emetic *Bacillus cereus* in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255: 1455-1461.
- LI, H. & ROTHBERG, L. (2004a). Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(39): 14036-14039.
- LI, H. & ROTHBERG, L. J. (2004b). Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 126(35): 10958-10961.
- LI, J., CHU, X., LIU, Y., JIANG, J. H., HE, Z., ZHANG, Z., SHEN, G. & YU, R. Q. (2005). A colorimetric method for point mutation detection using high-fidelity DNA ligase. *Nucleic acids research*, 33(19): 1.e168-9.e168.

- LI, J., DENG, T., CHU, X., YANG, R., JIANG, J., SHEN, G. & YU, R. (2010). Rolling circle amplification combined with gold nanoparticle aggregates for highly sensitive identification of single-nucleotide polymorphisms. *Analytical chemistry*, 82(7): 2811-2816.
- LI, J., JIANG, J. H., XU, X. M., CHU, X., JIANG, C., SHEN, G. & YU, R. Q. (2008). Simultaneous identification of point mutations via DNA ligase-mediated gold nanoparticle assembly. *Analyst*, 133(7): 939-945.
- LIANDRIS, E., GAZOULI, M., ANDREADOU, M., ČOMOR, M., ABAZOVIC, N., SECHI, L. A. & IKONOMOPOULOS, J. (2009). Direct detection of unamplified DNA from pathogenic mycobacteria using DNA-derivatized gold nanoparticles. *Journal of microbiological methods*, 78(3): 260-264.
- LIE, P., LIU, J., FANG, Z., DUN, B. & ZENG, L. (2012). A lateral flow biosensor for detection of nucleic acids with high sensitivity and selectivity. *Chemical Communications*, 48(2): 236-238.
- LITOS, I. K., EMMANOUILIDOU, E., GLYNOU, K. M., LAIOS, E., IOANNOU, P. C., CHRISTOPOULOS, T. K., KAMPA, M., CASTANAS, E. & GRAVANIS, A. (2007b). Rapid genotyping of CYP2D6, CYP2C19 and TPMT polymorphisms by primer extension reaction in a dipstick format. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(6): 1849-1857.
- LITOS, I. K., IOANNOU, P. C., CHRISTOPOULOS, T. K., TRAEGER-SYNODINOS, J., & KANAVAKIS, E. (2007a). Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by primer extension reaction in a dry-reagent dipstick format. *Analytical chemistry*, 79(2): 395-402.
- LIU, B. & LIU, J. (2017). Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. *Analytical methods*, 9(18): 2633-2643.
- LIU, F., LIU, H., LIAO, Y., WEI, J., ZHOU, X. & XING, D. (2015). Multiplex detection and genotyping of pathogenic bacteria on paper-based biosensor with a novel universal primer mediated asymmetric PCR. *Biosensors and Bioelectronics*, 74: 778-785.
- LIU, H. H., CAO, X., YANG, Y., LIU, M. G. & WANG, Y. F. (2006). Array-based nano-amplification technique was applied in detection of hepatitis E virus. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39(3): 247-252.
- LIU, J., CHEN, L., LIE, P., DUN, B. & ZENG, L. (2013a). A universal biosensor for multiplex DNA detection based on hairpin probe assisted cascade signal amplification. *Chemical Communications*, 49(45): 5165-5167.
- LIU, P., YANG, X., SUN, S., WANG, Q., WANG, K., HUANG, J., LIU, J. & HE, L. (2013b). Enzyme-free colorimetric detection of DNA by using gold nanoparticles and hybridization chain reaction amplification. *Analytical chemistry*, 85(16): 7689-7695.
- LIU, Y., WU, Z., ZHOU, G., HE, Z., ZHOU, X., SHEN, A., & HU, J. (2012). Simple, rapid, homogeneous oligonucleotides colorimetric detection based on non-aggregated gold nanoparticles. *Chemical Communications*, 48(26): 3164-3166.
- MA, C., WANG, W., LI, Z., CAO, L. & WANG, Q. (2012). Simple colorimetric DNA detection based on hairpin assembly reaction and target-catalytic circuits for signal amplification. *Analytical biochemistry*, 429(2): 99-102.
- MANCUSO, M., JIANG, L., CESARMAN, E. & ERICKSON, D. (2013). Multiplexed colorimetric detection of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus and Bartonella DNA using gold and silver nanoparticles. *Nanoscale*, 5(4): 1678-1686.
- MAO, X., MA, Y., ZHANG, A., ZHANG, L., ZENG, L. & LIU, G. (2009a). Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip. *Analytical Chemistry*, 81(4): 1660-1668.
- MAO, X., XU, H., ZENG, Q., ZENG, L. & LIU, G. (2009b). Molecular beacon-functionalized gold nanoparticles as probes in dry-reagent strip biosensor for DNA analysis. *Chemical Communications*, 21: 3065-3067.

- MARDIS, E. R. (2017). DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature protocols*, 12(2): 213-218.
- MIRKIN, C. A., LETSINGER, R. L., MUCIC, R. C. & STORHOFF, J. J. (1996). A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592): 607-609.
- MOITRA, P., ALAFEEF, M., DIGHE, K., FRIEMAN, M. & PAN, D. (2020). Selective Naked-Eye Detection of SARS-CoV-2 Mediated by N Gene Targeted Antisense Oligonucleotide Capped Plasmonic Nanoparticles. *ACS nano*, 14: 7617–7627.
- NAM, J. M., STOEVA, S. I. & MIRKIN, C. A. (2004). Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity. *Journal of the American Chemical Society*, 126(19): 5932-5933.
- NIELSEN, P. E. (1999). Peptide nucleic acid. A molecule with two identities. *Accounts of Chemical Research*, 32(7): 624-630.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2018. *Las 10 principales causas de defunción*, visto el 22 de junio de 2020. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- PAL, D., BOBY, N., KUMAR, S., KAUR, G., ALI, S. A., REBOUD, J., SHRIVASTAVA, S., GUPTA, P. K., COOPER, J. M. & CHAUDHURI, P. (2017). Visual detection of Brucella in bovine biological samples using DNA-activated gold nanoparticles. *PLoS one*, 12(7): 1-12.
- PARK, C., SONG, Y., JANG, K., CHOI, C. H. & NA, S. (2018). Target switching catalytic hairpin assembly and gold nanoparticle colorimetric for EGFR mutant detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 261: 497-504.
- PARK, S., ZHANG, Y., LIN, S., WANG, T. H. & YANG, S. (2011). Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics. *Biotechnology advances*, 29(6): 830-839.
- POKORSKI, J. K., NAM, J. M., VEGA, R. A., MIRKIN, C. A. & APPELLA, D. H. (2005). Cyclopentane-modified PNA improves the sensitivity of nanoparticle-based scanometric DNA detection. *Chemical communications*, 16: 2101-2103.
- QUAN, K., HUANG, J., YANG, X., YANG, Y., YING, L., WANG, H., & WANG, K. (2015). An enzyme-free and amplified colorimetric detection strategy: assembly of gold nanoparticles through target-catalytic circuits. *Analyst*, 140(4): 1004-1007.
- REYNOLDS, R. A., MIRKIN, C. A. & LETSINGER, R. L. (2000a). A gold nanoparticle/latex microsphere-based colorimetric oligonucleotide detection method. *Pure and applied chemistry*, 72(1-2), 229-235.
- REYNOLDS, R. A., MIRKIN, C. A., & LETSINGER, R. L. (2000b). Homogeneous, nanoparticle-based quantitative colorimetric detection of oligonucleotides. *Journal of the American Chemical Society*, 122(15), 3795-3796.
- ROHRMAN, B. A., LEAUTAUD, V., MOLYNEUX, E. & RICHARDS-KORTUM, R. R. (2012). A lateral flow assay for quantitative detection of amplified HIV-1 RNA. *PLoS One*, 7(9): 1.e45611-8. e45611
- SATO, K., HOSOKAWA, K. & MAEDA, M. (2003). Rapid aggregation of gold nanoparticles induced by non-cross-linking DNA hybridization. *Journal of the American Chemical Society*, 125(27): 8102-8103.7
- SATO, K., HOSOKAWA, K. & MAEDA, M. (2005). Non-cross-linking gold nanoparticle aggregation as a detection method for single-base substitutions. *Nucleic acids research*, 33(1): 1.e4-5.e4.
- SATO, K., ONOBUCHI, M., SATO, Y., HOSOKAWA, K. & MAEDA, M. (2006). Non-cross-linking gold nanoparticle aggregation for sensitive detection of single-nucleotide polymorphisms: Optimization of the particle diameter. *Analytical biochemistry*, 1(350): 162-164.
- SHEN, W., DENG, H. & GAO, Z. (2012). Gold nanoparticle-enabled real-time ligation chain reaction for ultrasensitive detection of DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 134(36): 14678-14681.

- SONG, J., LI, Z., CHENG, Y. & LIU, C. (2010). Self-aggregation of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles and its applications for highly sensitive detection of DNA. *Chemical Communications*, 46(30): 5548-5550.
- SOO, P. C., HORNG, Y. T., CHANG, K. C., WANG, J. Y., HSUEH, P. R., CHUANG, C. Y., LU, C. C. & LAI, H. C. (2009). A simple gold nanoparticle probes assay for identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis complex from clinical specimens. *Molecular and cellular probes*, 23(5): 240-246.
- STOEVA, S. I., LEE, J. S., THAXTON, C. S. & MIRKIN, C. A. (2006). Multiplexed DNA detection with biobarcode nanoparticle probes. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(20): 3303-3306.
- STORHOFF, J. J., ELGHANIAN, R., MUCIC, R. C., MIRKIN, C. A. & LETSINGER, R. L. (1998). One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *Journal of the American Chemical Society*, 120(9): 1959-1964.
- STORHOFF, J. J., LUCAS, A. D., GARIMELLA, V., BAO, Y. P. & MÜLLER, U. R. (2004a). Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. *Nature biotechnology*, 22(7): 883-887.
- STORHOFF, J. J., MARLA, S. S., BAO, P., HAGENOW, S., MEHTA, H., LUCAS, A., GARIMELLA, V., PATNO, T., BUCKINGMA, W., CORK, W. & MÜLLER, U. R. (2004b). Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(8): 875-883.
- SU, X. & KANJANAWARUT, R. (2009). Control of metal nanoparticles aggregation and dispersion by PNA and PNA-DNA complexes, and its application for colorimetric DNA detection. *ACS Nano*, 3(9): 2751-2759.
- TAN, E., WONG, J., NGUYEN, D., ZHANG, Y., ERWIN, B., VAN NESS, L. K., BAKER, S. M., GALAS, D. J. & NIEMZ, A. (2005). Isothermal DNA amplification coupled with DNA nanosphere-based colorimetric detection. *Analytical chemistry*, 77(24): 7984-7992.
- TANG, J., ZHOU, L., GAO, W., CAO, X. & WANG, Y. (2009). Visual DNA microarrays for simultaneous detection of human immunodeficiency virus type-1 and Treponema pallidum coupled with multiplex asymmetric polymerase chain reaction. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 65(4): 372-378.
- TATON, T. A., LU, G. & MIRKIN, C. A. (2001). Two-color labeling of oligonucleotide arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *Journal of the American Chemical Society*, 123(21): 5164-5165.
- TATON, T. A., MIRKIN, C. A. & LETSINGER, R. L. (2000). Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 289(5485): 1757-1760.
- THAXTON, C. S., GEORGANOPOULOU, D. G. & MIRKIN, C. A. (2006). Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. *Clinica Chimica Acta*, 363(1-2): 120-126
- THAXTON, C. S., HILL, H. D., GEORGANOPOULOU, D. G., STOEVA, S. I. & Mirkin, C. A. (2005). A bio-barcode assay based upon dithiothreitol-induced oligonucleotide release. *Analytical chemistry*, 77(24): 8174-8178.
- TRANTAKIS, I. A., BOLISSETTY, S., MEZZENGA, R. & STURLA, S. J. (2013). Reversible aggregation of DNA-decorated gold nanoparticles controlled by molecular recognition. *Langmuir*, 29(34): 10824-10830.
- TURKEVICH, J., STEVENSON, P. C. & HILLIER, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11: 55-75.
- VALENTINI, P. & POMPA, P. P. (2013). Gold nanoparticles for naked-eye DNA detection: smart designs for sensitive assays. *Royal Society of Chemistry advances*, 3(42): 19181-19190.

- VALENTINI, P. & POMPA, P. P. (2016). A universal polymerase chain reaction developer. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(6): 2157-2160.
- VALENTINI, P., FIAMMENGIO, R., SABELLA, S., GARIBOLDI, M., MAIORANO, G., CINGOLANI, R. & POMPA, P. P. (2013). Gold-nanoparticle-based colorimetric discrimination of cancer-related point mutations with picomolar sensitivity. *ACS nano*, 7(6): 5530-5538.
- VEIGAS, B., PEDROSA, P., COUTO, I., VIVEIROS, M. & BAPTISTA, P. V. (2013). Isothermal DNA amplification coupled to Au-nanoprobes for detection of mutations associated to Rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of nanobiotechnology*, 11(1): 38.
- VELÁZQUEZ, A. K. (2014). *Diseño de compuertas lógicas mediante desplazamiento de cadenas de ADN* (Tesis de maestría). CICESE, Ensenada, Baja California, México.
- VERMA, M. S., ROGOWSKI, J. L., JONES, L. & GU, F. X. (2015). Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles. *Biotechnology advances*, 33(6): 666-680.
- WANG, G., AKIYAMA, Y., SHIRAIISHI, S., KANAYAMA, N., TAKARADA, T. & MAEDA, M. (2017). Cross-linking versus non-cross-linking aggregation of gold nanoparticles induced by DNA hybridization: a comparison of the rapidity of solution color change. *Bioconjugate chemistry*, 28(1): 270-277.
- WANG, Y. F., PANG, D. W., ZHANG, Z. L., ZHENG, H. Z., CAO, J. P. & SHEN, J. T. (2003). Visual gene diagnosis of HBV and HCV based on nanoparticle probe amplification and silver staining enhancement. *Journal of medical virology*, 70(2): 205-211.
- WONG, J. K., YIP, S. P. & LEE, T. M. (2014). Ultrasensitive and Closed-Tube Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Using Carboxyl-Modified Gold Nanoparticles. *Small*, 10(8): 1495-1499.
- WOOLLEY, C. F., & HAYES, M. A. (2014). Emerging technologies for biomedical analysis. *Analyst*, 139(10): 2277-2288.
- XING, S., XU, X., FU, P., XU, M., GAO, T., ZHANG, X. & ZHAO, C. (2019). Colorimetric detection of single base-pair mismatches based on the interactions of PNA and PNA/DNA complexes with unmodified gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181: 333-340.
- XU, W., XUE, X., LI, T., ZENG, H. & LIU, X. (2009). Ultrasensitive and selective colorimetric DNA detection by nicking endonuclease assisted nanoparticle amplification. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(37): 6849-6852.
- XUE, X., XU, W., WANG, F. & LIU, X. (2009). Multiplex single-nucleotide polymorphism typing by nanoparticle-coupled DNA-templated reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 131(33): 11668-11669.
- YAGER, P., DOMINGO, G. J. & GERDES, J. (2008). Point-of-care diagnostics for global health. *Annual review of biomedical engineering*, 10: 107-144.
- YANG, X., YU, Y. & GAO, Z. (2014). A highly sensitive plasmonic DNA assay based on triangular silver nanoprism etching. *ACS Nano*, 8(5): 4902-4907.
- YEUNG, C. Y., LIU, C. C., TSENG, Y. T., TSAI, K. C., HSIEH, M. A., CHAN, W. T., LIU, H. L., LEE, H. C. & HOU, S. Y. (2014). Rapid identification of *Salmonella* using Hektoen enteric agar and 16s ribosomal DNA probe-gold nanoparticle immunochromatography assay in clinical faecal specimens. *Letters in applied microbiology*, 58(4): 311-317.
- YIN, H., HUANG, X., MA, W., XU, L., ZHU, S., KUANG, H. & XU, C. (2014). Ligation chain reaction based gold nanoparticle assembly for ultrasensitive DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 52: 8-12.
- YOHE, S. & THYAGARAJAN, B. (2017). Review of clinical next-generation sequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 141(11): 1544-1557.

- YU, T. & WEI, Q. (2018). Plasmonic molecular assays: Recent advances and applications for mobile health. *Nano Research*, 11(10): 5439-5473.
- ZANOLI, L. M., D'AGATA, R. & SPOTO, G. (2012). Functionalized gold nanoparticles for ultrasensitive DNA detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402(5): 1759-1771.
- ZHANG, X., SERVOS, M. R. & LIU, J. (2012). Instantaneous and quantitative functionalization of gold nanoparticles with thiolated DNA using a pH-assisted and surfactant-free route. *Journal of the American Chemical Society*, 134(17): 7266-7269.
- ZHANG, Z., WANG, H., CHEN, Z., WANG, X., CHOO, J. & CHEN, L. (2018). Plasmonic colorimetric sensors based on etching and growth of noble metal nanoparticles: Strategies and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 114: 52-65.
- ZHAO, W., BROOK, M. A. & LI, Y. (2008). Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *ChemBioChem*, 9(15): 2363-2371
- ZHOU, Z., WEI, W., ZHANG, Y. & LIU, S. (2013). DNA-responsive disassembly of AuNP aggregates: influence of nonbase-paired regions and colorimetric DNA detection by exonuclease III aided amplification. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(22): 2851-2858.
- ZHU, X., LIU, Y., YANG, J., LIANG, Z. & LI, G. (2010). Gold nanoparticle-based colorimetric assay of single-nucleotide polymorphism of triplex DNA. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(9): 2135-2139.
- ZOU, B., CAO, X., WU, H., SONG, Q., WANG, J., KAJIYAMA, T., KAMBARA, H. & ZHOU, G. (2015). Sensitive and specific colorimetric DNA detection by invasive reaction coupled with nicking endonuclease-assisted nanoparticles amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 66: 50-54.