

Esta tesis doctoral, titulada “Biosensores holográficos de hidrogeles funcionalizados con ADN para diagnóstico in vitro”, se centra en el desarrollo de un hidrogel sensible a analitos, funcionalizado con sondas de oligonucleótidos, con una estructura difractiva como transductor óptico para aplicaciones de diagnóstico in vitro. El primer capítulo incluye una visión general de los diferentes conceptos relacionados con el biosensado, los desarrollos recientes en el mercado del diagnóstico in vitro y, en particular, los biosensores de ADN. Además, se presenta la síntesis y caracterización de hidrogeles, su papel como matriz de soporte en biosensado y las estrategias de inmovilización. Por último, se explican los conceptos básicos de la holografía como nueva estrategia de detección y el papel de las diferentes redes de difracción en el biosensado.

A continuación, en el Capítulo 2, se discuten los objetivos de este proyecto. El objetivo de esta investigación es diseñar, fabricar y estudiar experimentalmente redes difractivas basadas en hidrogeles creadas mediante técnicas holográficas para aplicaciones de biodetección. La atención se centró en desarrollar hidrogeles biorreactivos que incorporasen sondas oligonucleotídicas específicas y dotarlos de una estructura difractiva para que actuaran como transductores ópticos en aplicaciones de diagnóstico in vitro. Se consideran dos tipos de estructuras difractivas: redes holográficas de relieve superficial (SRGs) y redes holográficas de transmisión volumétrica (VTGs). La fase inicial de este trabajo se ha centrado en la optimización de hidrogeles, ajustando su composición para que actúen como biosensores holográficos. Esto implica la obtención de hidrogeles que presenten una excelente transparencia óptica, buena porosidad y buenas propiedades mecánicas. Se seleccionaron acrilamida y bisacrilamida como monómero y reticulante respectivamente, para la preparación del hidrogel mediante reacción de polimerización por radicales libres (FRP). Además, para introducir la respuesta del analito en la red de hidrogeles tridimensionales, hubo que investigar y poner a punto diferentes estrategias de inmovilización del biorreceptor.

En el capítulo 3, se incorporan covalentemente sondas de ADN en un hidrogel basado en acrilamida. La estrategia optimizada consiste en incorporar directamente sondas de ADN modificadas con acrilamida mediante copolimerización con monómeros de acrilamida durante la formación del hidrogel.

En este caso, la reacción de unión covalente es una polimerización por adición de vinilo, activada tanto fotoquímicamente como térmicamente. Los hidrogeles funcionalizados con ADN se caracterizaron mediante imágenes de fluorescencia y se exploró su versatilidad mediante la fabricación de microarrays. Por último, el hidrogel optimizado sensible a los analitos se utilizó como plataforma para la preparación de redes de relieve superficial.

El capítulo 4 describe otro enfoque adoptado para la funcionalización del hidrogel con sondas de ADN. Se añadió un comonómero de acrilato de propargilo al hidrogel de acrilamida, con el fin de introducir la presencia de residuos alquínicos y facilitar una mayor incorporación de las sondas de ADN. Las sondas de ADN utilizadas tenían grupos terminales tiol y se incorporaron mediante química click tiol-eno/tiol-ino, debido a la presencia de enlaces C-C dobles y triples. Con esta estrategia, se demostraron dos enfoques de inmovilización de las sondas de ADN: durante y después de la síntesis del hidrogel.

En consecuencia, la inmovilización de los bioreceptores pudo realizarse tanto antes como después de la fabricación del transductor. Se fabricaron redes de relieve superficial (SRG) en la superficie del hidrogel mediante la combinación del patrón de interferencia láser directo (DLIP) y el moldeo de réplicas (REM). Los resultados preliminares mostraron que las SRGs tienen potencial para detectar directamente la hibridación de oligonucleótidos en un formato libre de etiquetas.

En el capítulo 5, se optimizó el proceso de grabación de rejillas de transmisión de volumen no inclinadas (VTG) en capas de hidrogel con el fin de mejorar el rendimiento del transductor y, en consecuencia, la sensibilidad del biosensor. Tras una cuidadosa evaluación de los parámetros de grabación holográfica, las composiciones de las soluciones de incubación y los tiempos de incubación, las estructuras VTG se grabaron con una buena reproducibilidad, alcanzando una excelente eficiencia de difracción de más del 80%. Además, se estudió su estabilidad en agua para bioensayos. Por último, se observó que los VTG, modificados con oligonucleótidos, respondían selectivamente hibridándose sólo con la diana complementaria, al tiempo que conservaban sus propiedades de difracción.

El trabajo de investigación demostró la viabilidad del uso de redes difractivas holográficas (SRG y VTG) grabadas en hidrogeles como biosensores libres de etiquetas, capaces de detectar sondas cortas de ADN oligonucleótido, complementarias a la secuencia inmovilizada, en un medio acuoso.

Por último, en el capítulo 6 se presentan las conclusiones generales de esta tesis doctoral. Se analizan comparativamente el rendimiento y la aplicabilidad de los distintos enfoques estudiados, y se discuten las perspectivas futuras de los hidrogeles de ácido nucleico para la detección holográfica.