



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Desarrollo de una prueba de diagnóstico rápido para la  
detección del Citomegalovirus (CMV) mediante el empleo  
de materiales basados en puertas moleculares con  
oligonucleótidos

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Calduch Diago, Vicente

Tutor/a: Murguía Ibáñez, José Ramón

Cotutor/a externo: Climent Terol, Estela

Director/a Experimental: Alventosa Díaz, Carolina

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

# **DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA LA DETECCIÓN DEL CITOMEGALOVIRUS (CMV) MEDIANTE EL EMPLEO DE MATERIALES BASADOS EN PUERTAS MOLECULARES CON OLIGONUCLEÓTIDOS**

## **RESUMEN**

El citomegalovirus (CMV) es un herpesvirus de doble cadena de ADN con una capacidad de contagio reducida, pero que supone un serio problema por la gravedad de la infección que supone en neonatos y pacientes inmunodeprimidos, puesto que el 4% de los recién nacidos infectados fallecen y el 90% padecerá de lesiones neurológicas como la sordera neurosensorial. Además, es la infección congénita en países desarrollados con mayor incidencia de entre el 0,3 y 2,4% y, sin embargo, no existe un programa de cribado universal sobre la población, sino que se realiza únicamente cuando ya presentan alteraciones auditivas, quedando excluidos pacientes infectados que manifiestan una respuesta normal. Las pruebas que se realizan se basan en el sistema de PCR de transcripción inversa (RT-PCR) que, si bien es muy específico y sensible, es costoso, no se puede realizar *in situ* y de forma masiva, debido a la necesidad de personal especializado y el tiempo que conlleva.

Así pues, se hace manifiesta la necesidad de desarrollar sistemas de detección que sean rápidos, baratos y que no precisen de personal especializado para poder testar en la población como parte de un cribado generalizado. El material planteado consiste en partículas de sílice de estructura mesoporosa con tamaño nanométrico conocidas comúnmente como MCM-41. Este material se puede cargar tanto con colorantes como con fármacos, y, además, aprovechando la presencia de grupos silanoles en los poros del material, se funcionalizan con moléculas que respondan ante determinados estímulos, permitiendo así la liberación del contenido. En este caso, se hará uso de una puerta molecular que sea capaz de liberar el colorante contenido del interior de la partícula ante la presencia de un analito que permita la detección específica de este virus. Para ello, el mecanismo de apertura estará basado en el reconocimiento molecular de un oligonucleótido de ADN que, en presencia de su complementario abre la puerta molecular. Este material se depositará en tiras reactivas para su uso en el point-of-care, facilitando su aplicación, permitiendo la medición y cuantificación del tinte liberado a través de la fotografía mediante un dispositivo smartphone.

**PALABRAS CLAVE:** Detección de Citomegalovirus. Test rápidos. Nanomateriales. Diagnóstico precoz.

**ALUMNO:** Vicente Calduch Diago

**TUTOR:** José Ramón Murguía Ibáñez

**CO-TUTORAS:** Carolina Alventosa Díaz y Estela Climent Terol

Valencia, 17 de junio de 2024.

# DESENVOLUPAMENT D'UN TEST DE DIAGNÒSTIC RÀPID PER A LA DETECCIÓ DE CITOMEGALOVIRUS (CMV) MITJANÇANT L'US DE MATERIALS BASATS EN PORTES MOLECULARS AMB OLIGONUCLEÒTIDS.

## RESUM

El citomegalovirus (\*CMV) és un herpesvirus de doble cadena d'ADN amb una capacitat de contagi reduïda, però que suposa un seriós problema per la gravetat de la infecció que suposa en nounats i pacients immunodeprimits, ja que el 4% dels nounats infectats moren i el 90% patirà de lesions neurològiques com la sordesa neurosensorial. A més, és la infecció congènita en països desenvolupats amb major incidència d'entre el 0,3 i 2,4% i, no obstant això, no existeix un programa de cribratge universal sobre la població, sinó que es realitza únicament quan ja presenten alteracions auditives, quedant exclosos pacients infectats que manifesten una resposta normal. Les proves que es realitzen es basen en el sistema de PCR de transcripció inversa (RT-PCR) que, si bé és molt específic i sensible, és costós, no es pot realitzar in situ i de manera massiva, a causa de la necessitat de personal especialitzat i el temps que comporta.

Així doncs, es fa manifesta la necessitat de desenvolupar sistemes de detecció que siguin ràpids, barats i que no precisen de personal especialitzat per a poder testar en la població com a part d'un cribratge generalitzat. El material plantejat consisteix en partícules de sílice d'estructura mesoporosa amb grandària nanomètrica conegudes comunament com a mCM-41. Este material es pot carregar tant amb colorants com amb fàrmacs, i, a més, aprofitant la presència de grups silanols en els porus del material, es funcionalitzen amb molècules que responguen davant determinats estímuls, permetent així l'alliberament del contingut. En este cas, es farà ús d'una porta molecular que siga capaç d'alliberar el colorant contingut de l'interior de la partícula davant la presència d'un analít que permeta la detecció específica d'este virus. Per a això, el mecanisme d'obertura estarà basat en el reconeixement molecular d'un oligonucleòtid d'ADN que, en presència del seu complementari obri la porta molecular. Este material es depositarà en tires reactives per al seu ús en el *point-of-care*, facilitant la seua aplicació, permetent el mesurament i quantificació del tint alliberat a través de la fotografia mitjançant un dispositiu telèfon intel·ligent.

**PARAULES CLAU:** Detecció de Citomegalovirus. Tests ràpids. Nanomaterials. Diagnòstic precoç.

**ALUMNE:** Vicente Calduch Diago

**TUTOR:** José Ramón Murguía Ibáñez

**CO-TUTORES:** Carolina Alventosa Díaz y Estela Climent Terol

València, 17 de juny de 2024.

# **DEVELOPMENT OF A RAPID DIAGNOSTIC TEST FOR THE DETECTION OF CYTOMEGALOVIRUS (CMV) USING OLIGONUCLEOTIDE-BASED MOLECULAR GATE MATERIALS.**

## **ABSTRACT**

Cytomegalovirus (CMV) is a DNA double-stranded herpesvirus with a reduced contagiousness, but it is a serious problem due to the severity of the infection it entails in neonates and immunosuppressed patients, since 4% of infected newborns die and 90% will suffer from neurological lesions such as sensorineural deafness. In addition, it is the congenital infection in developed countries with the highest incidence (between 0.3 and 2.4%). Despite these facts, there is no universal screening program on the population, but it is carried out only when they already have hearing alterations, excluding infected patients who manifest a normal response. The tests performed are based on the reverse transcription PCR (RT-PCR) system. This is very specific and sensitive, but it is expensive and cannot be performed on-site and for universal screening, due to the need for specialized personnel and the time involved.

Thus, there is a need to develop detection systems that are fast, cheap and do not require specialized personnel to be able to test the population as part of a generalized screening. The proposed material consists of silica particles with a mesoporous structure with a nanometer size commonly known as MCM-41. This material can be loaded with dyes or drugs, and also, taking advantage of the presence of silanol groups in the pores of the material, they are functionalized with molecules that respond to certain stimuli, thus allowing the release of the contents. In this case, a molecular gate will be used that is capable of releasing the dye contained inside the particle in the presence of an analyte that allows the specific detection of this virus. To do this, the opening mechanism will be based on the molecular recognition of a DNA oligonucleotide that, in the presence of its complementary strand, displaces the oligonucleotide from the surface of the material, allowing the release of the dye. This material will be deposited on test strips so it can be used as point-of-care nanodevices, facilitating its application, allowing the measurement and quantification of the dye released through photography using a smartphone device.

**KEYWORDS:** Cytomegalovirus detection. Rapid tests Nanomaterials. Early diagnosis.

**STUDENT:** Vicente Calduch Diago

**TUTOR:** José Ramón Murguía Ibáñez

**CO-TUTORS:** Carolina Alventosa Díaz y Estela Climent Terol

Valencia, 17<sup>th</sup> June, 2024.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quería agradecer a los compañeros del grupo Nanosens del Instituto de Desarrollo Tecnológico y Reconocimiento Molecular (IDM) por la oportunidad y especial gracias a Carol y a Estela por todo el esfuerzo, el tiempo y la dedicación. Muchas gracias a mi familia por estar siempre ahí, de forma incondicional, sin vosotros no sería posible.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1    CITOMEGALOVIRUS .....	1
1.1.1 Biología del CMV .....	1
1.1.2 Epidemiología.....	2
1.1.3 Consecuencias de la infección.....	3
1.2 TÉCNICAS ACTUALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR CMV .....	3
1.3 NANOTECNOLOGÍA Y SU APLICACIÓN EN TERAPIA Y DIAGNÓSTICO .....	4
1.3.1 Nanosistemas de sílice mesoporosos.....	5
1.3.2 <i>Biosensing</i> basado en partículas mesoporosas.....	5
1.3.3 Oligonucleótidos como puerta molecular.....	6
1.3.4 Material de detección en tiras reactivas como soporte. ....	7
2. OBJETIVOS .....	8
3. MATERIALES Y EQUIPOS.....	9
4. PROCESO EXPERIMENTAL.....	11
4.1 Síntesis de la MCM-41 recubierta por oligonucleótidos .....	11
4.1.1 Síntesis de MCM-41.....	11
4.1.2 Carga de la MCM-41 con colorante Ru(bpy) <sub>3</sub> .....	11
4.1.3 Anclaje del oligonucleótido <i>oligolinker mediante diferentes alcoxisilanos</i> .....	12
4.1.4 Hibridación del <i>oligosenser</i> .....	14
4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES SINTETIZADOS .....	15
4.2.1 Microscopía de transmisión electrónica (TEM) .....	15
4.2.2 Difracción de rayos X y porosimetría.....	15
4.2.3 Termogravimetría (TGA).....	16
4.2.4 Zetasizer .....	16
4.3 PRUEBAS DE ESTABILIDAD .....	17
4.3.1 Cinéticas en disolución para selección de <i>oligosenser</i> .....	17
4.3.2 Selección del método de anclaje del <i>oligosenser</i> .....	18
4.4 Optimización de la liberación en tiras reactivas .....	19
4.4.1 Preparación de diferentes tiras reactivas.....	20
4.4.2 Ensayo de cinéticas de liberación en diferentes materiales de tiras y tampones. ....	20
4.5 Estudio del comportamiento del material .....	20
4.5.1 Recta de calibrado de la respuesta.....	20
4.5.2 Análisis de selectividad del sistema.....	21

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
5.1 Resultados de caracterización.....	22
5.1.1 Análisis de las fotografías tomadas por TEM.....	22
5.1.2 Análisis de la caracterización por difracción de rayos X y porosimetría.....	22
5.1.3 Análisis de la caracterización por TGA.....	24
5.1.4 Análisis de los resultados obtenidos en Zetasizer.....	25
5.2 Resultados del análisis de estabilidad.....	27
5.2.1 Resultado de la cinética en disolución: selección de <i>oligosenser</i> .....	27
5.2.2 Resultado del ensayo en tiras para selección del método de anclaje de <i>Oligolinker</i> .....	28
5.3 Resultados de la optimización de liberación en tiras.....	29
5.4 Resultado del estudio del comportamiento del material.....	30
5.4.1 Curva de calibrado.....	30
5.4.2 Efecto de interferentes.....	30
5. CONCLUSIONES.....	32
6. BIBLIOGRAFÍA.....	33
7. ANEXO I: RELACIÓN DEL TRABAJO CON LA AGENDA 2030 PARA LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE.....	I

# LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

## TABLAS

Tabla 1 Técnicas empleadas en el diagnóstico de la infección del CMV.....	4
Tabla 2 Composición de las nanopartículas medidas por la técnica de TGA.....	26

## FIGURAS

Figura 1 Esquema del ciclo reproductivo del CMV.....	1
Figura 2 Fotomicrografía de tejido pulmonar de un paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) con una infección activa de CMV.....	2
Figura 3 Representación de la apertura de la puerta molecular con que se funcionaliza el material mesoporoso para liberar su cargo ante la acción de un estímulo.....	5
Figura 4 Esquema del funcionamiento de la puerta molecular de oligonucleótidos en una partícula mesoporosa cargada con un colorante fluorescente.....	7
Figura 5 Diseño de la caja a la que se puede acoplar un smartphone para la toma de fotografías que permitan detectar y cuantificar las liberaciones de colorante en el sistema de tiras reactivas.....	7
Figura 6 Estructura y espectros de absorción y emisión de Ru(bpy) <sub>3</sub> .....	11
Figura 7 Aspectos generales de las tiras reactivas.....	19
Figura 8 Resultados de la toma de microscopía de transmisión electrónica.....	22
Figura 9 Difractograma de Rayos X de una muestra de MCM-41-as made y de MCM-41-Calcinada.....	23
Figura 10 Isotermas de Adsorción y Desorción de gas nitrógeno (N <sub>2</sub> ) a 77K de MCM-41 y MCM-41/Ru(bpy) <sub>3</sub> para estudiar la porosimetría de los materiales.....	23
Figura 11 Resultado del análisis termogravimétrico.....	24
Figura 12 Resultados de las medidas de potencial Z en las muestras tomadas en el proceso de síntesis mediante el método del tricarboxisilano y el método de APTES-COOH.....	26
Figura 13 Resultados del análisis de partículas por DLS.....	27
Figura 14 Cinéticas de liberación en disolución de Ru(bpy) <sub>3</sub> de material anclado con oligosenser gB y pp65.....	28
Figura 15 Estudio de estabilidad en tiras reactivas de GFC.....	28
Figura 16 Resultados del proceso de optimización en tiras.....	29
Figura 17 Curvas de calibrado de la relación entre la intensidad de la señal generada por el analito a diferentes concentraciones sobre el blanco, empleando la nanopartícula creada por el método APTES-COOH.....	30

Figura 18 Resultado del análisis de interferentes.....	30
--	----

## ESQUEMAS

Esquema 1 Funcionalización de los grupos silanoles de la MCM-41 con un grupo tricarboxisilano.....	12
Esquema 2 Reacción de activación y formación del enlace amida entre grupos carboxilo y grupos amina, gracias a la acción combinada de EDC y NHS.....	13
Esquema 3 Funcionalización de 3 grupos silanoles con un grupo carboxilo por la unión de APTES y la derivatización posterior.....	13
Esquema 4 Reacción de formación de un enlace urea entre un grupo silanol y un grupo amina, por el método del isocianato.....	14

## ÍNDICE DE ABREVIACIONES

APTES: (3-Aminopropil)triethoxisilano

BSA: Albúmina de Suero Bovino

CH<sub>3</sub>CN - Acetonitrilo

CMV - Citomegalovirus

CTAB – Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DMF: N,N-Dimetilformamida

EDC - Hidrocloruro de 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida

EGF-R - receptor de factores de crecimiento epitelial

gB – glicoproteína B

GF/C: Fibra de vidrio

IE- genes inmediatamente tempranos (immediate early)

IgG, IgM – Inmunoglobulina G, M

Isocianato: 3-(Triethoxisilil)propil isocianato

MCM- Material Cristalino Móvil

MES - hidrato de 2-morfolin-4-ácido iletanosulfónico

MDPV: 3,4-metilendioxiptovalerona

NHS: N-Hydroxysuccinimida

Oligolinker- Oligonucleótido de unión a la MCM-41 y al Oligosenser.

Oligosenser- Oligonucleótido que hibrida con oligolinker y con secuencia diana

PBS: Tampón fosfato salino de Dulbecco

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF-R $\alpha$  - receptor alfa de factores de crecimiento derivados de plaquetas

PEGS: 2-[Metoxy(polyetilenoxi)propil]dimetiletoxysilano

Ru(bpy)<sub>3</sub> – Tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II),

SARS-CoV2 - coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo.

TEA: Trietilamina

TEOS – Tetraethoxisilano.

Tricarboxisilano: sal trisódica de ácido N-[(3-Triethoxisilil)propil]etilendiaminotriacético

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CITOMEGALOVIRUS

### 1.1.1 Biología del CMV

El citomegalovirus (CMV) es un virus de ADN lineal bicatenario incluido en la familia Herpesviridae, la subfamilia Betaherpesvirinae y del género Citomegalovirus. Su ADN de 235 kilobases está envuelto por una nucleocápside icosaédrica de entre 120 y 200 nanómetros. En la parte más externa tiene una bicapa lipídica sobre la que se anclan glicoproteínas fundamentales para la infección y en el espacio entre la nucleocápside y la bicapa lipídica tiene en su composición una serie de proteínas globulares de origen viral que denomina el tegumento proteico (Insst, s. f.).

Este virus tiene un amplio tropismo celular, lo que explica la gran diversidad de patologías asociadas a su infección. Para la entrada a la célula se han identificado los dos complejos que son indispensables, el primero de ellos es la glicoproteína B (gB) que tiene un papel crucial en la fusión viral, así como en la unión inicial a la célula. El mecanismo se basa en la interacción con los glicosaminoglicanos de heparán sulfato y en la unión directa con un conjunto diverso de receptores celulares, como el receptor de factores de crecimiento epitelial (EGF-R), el receptor alfa de factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF-R $\alpha$ ), teterina y diversas integrinas ( $\alpha$ 2 $\beta$ 1,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 t  $\alpha$ v $\beta$ 3). El segundo complejo esencial para la entrada a las células es el dímero gH-gL, que se postula podría ser de gran importancia para activar la fusión de gB con la membrana plasmática y la formación de un complejo pentamérico con otras tres proteínas virales (UL128, UL130 y UL131) requerido para la infección de algunos tipos celulares como el endotelial y el epitelial (Griffiths et al., 2014).

Tras la fusión de la envoltura del virus con la membrana celular, se libera y se transporta la nucleocápside al núcleo. En el núcleo, se inicia la expresión de los genes inmediatamente tempranos (IE, *immediate early*) que producen las proteínas para la replicación y de los tempranos (E, *early*) con funciones de regulación y de síntesis en el proceso de copia de ADN. Finalmente, los genes tardíos (L, *late*) son los encargados de la síntesis de proteínas estructurales para el ensamblaje del virión y la salida por exocitosis al medio extracelular, propagando la infección. El ADN comienza a replicarse entre las 16 y 24 horas tras la infección. Finalmente, la salida de las nuevas partículas virales completas se produce tras más de 72 horas (Figura 1) (Racero et al., 2014).

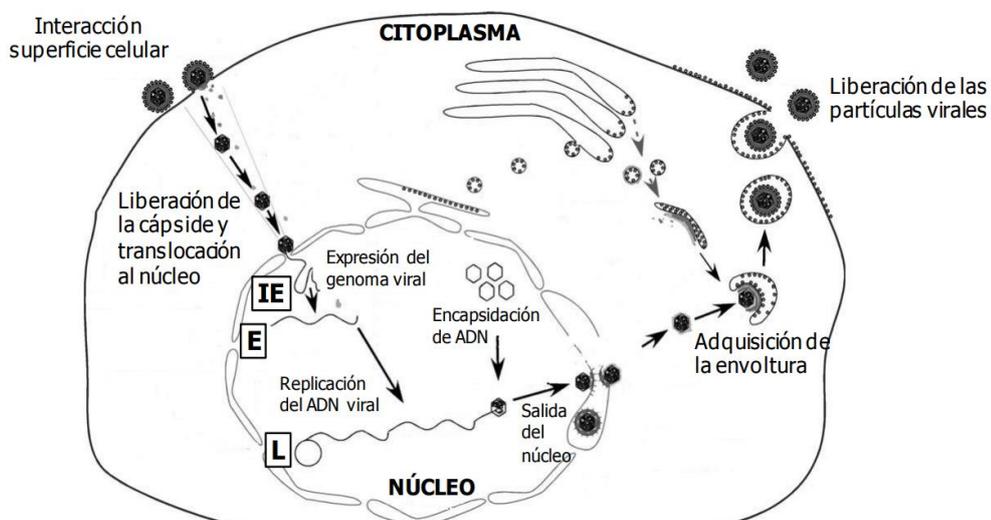


Figura 1: Esquema del ciclo infeccioso del CMV. (Zarama Ortiz, 2014)

Las células infectadas por CMV se identifican fácilmente mediante microscopía óptica debido a que tienen una morfología específica asociada a la infección, este hecho viene dado por procesos distintivos que tienen lugar en la replicación del virus. Uno de ellos es la recircularización del ADN, este proceso genera grandes inclusiones de material genético viral en los núcleos, dando como resultado una forma característica del núcleo comúnmente conocida como “ojo de búho”. El otro rasgo es el aumento de tamaño de las células infectadas respecto de las sanas, debido a que durante la replicación, además de la expresión de las proteínas virales, se modulan vías de señalización celular que promueven el crecimiento, dando lugar a un aumento de tamaño de la célula infectada (citomegalia) (Zarama Ortiz, 2014) (Figura 2).

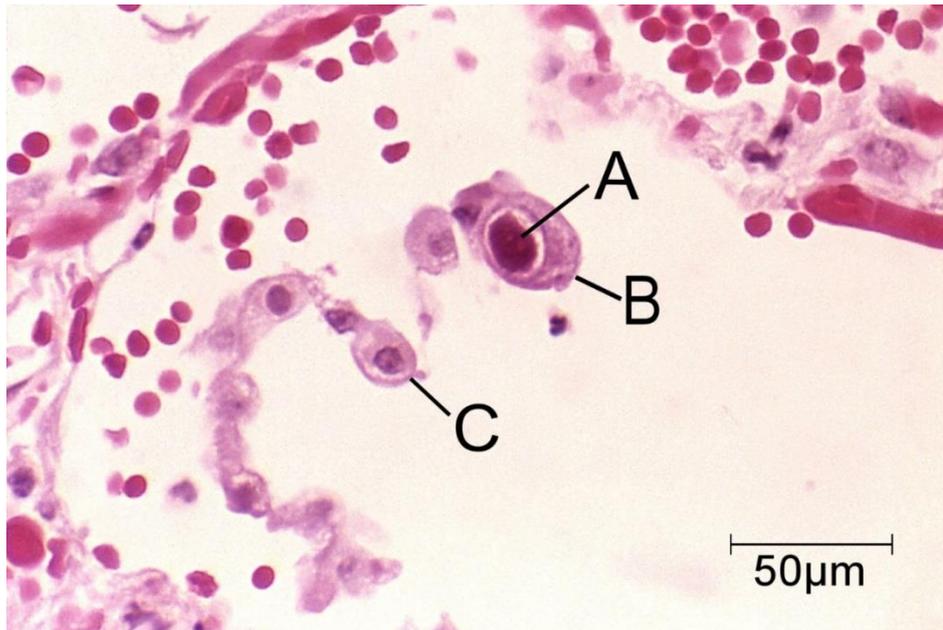


Figura 2: Fotomicrografía de tejido pulmonar de un paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) con una infección activa de citomegalovirus. A) Núcleo en forma de ojo de búho B) Célula infectada C) Célula no infectada. Modificación de imagen del Center for Disease Control

### 1.1.2 Epidemiología

La prevalencia mundial de este virus es elevada y especialmente en países subdesarrollados donde se alcanzan valores de hasta el 90%, siendo menor en los países desarrollados, pero alcanzando una estimación del 60%: un 40% de los adolescentes son seropositivos al CMV y aumenta aproximadamente un punto porcentual con cada año de vida. La diferencia entre países en vías de desarrollo y desarrollados se atribuye a un mayor hacinamiento y menor higiene en los primeros. (Gkrania-Klotsas et al., 2013). En aquellos individuos inmunocompetentes la primoinfección suele ser asintomática, leve o causante de mononucleosis, después, queda en forma latente en monocitos, pudiendo darse infecciones recurrentes. Es excretado en diversos fluidos como orina, saliva, secreciones vaginales, semen y leche, de forma especialmente prolongada en enfermos inmunocomprometidos, y el contacto directo con estos fluidos es la principal causa de primoinfección. (P. D. Griffiths, 2009).

La transmisión tiene lugar por diferentes vías, una de ellas es la infección congénita, que es aquella que sucede desde la madre gestante hacia el feto a través de la placenta, ocurre tan solo en un tercio de las embarazadas que experimentan una primoinfección y también puede darse en caso de una reactivación, el caso más habitual en países con elevada prevalencia. (Stagno et al., 1982). Además,

también se pueden dar infecciones a nivel postnatal: por intercambio de diversos fluidos a través de la vía oral, aunque se postula que podría haber infecciones de carácter sexual ya que en los fluidos implicados se detecta este patógeno. Anteriormente, se producían infecciones a través de transfusiones sanguíneas, pero al emplear filtros de separación de leucocitos para transfusiones se reduce en gran medida este riesgo. Finalmente, en caso de trasplantes de órganos sólidos, se puede dar tanto reinfecciones con nuevas cepas de virus como reactivaciones de virus latentes (P. Griffiths et al., 1988).

### **1.1.3 Consecuencias de la infección**

En la mayoría de las ocasiones, la primoinfección por CMV suele tener carácter asintomático, especialmente si ocurre en el periodo perinatal. A pesar de que en la mayoría de las ocasiones no genera una respuesta en el paciente, el CMV es el responsable del 8% de todos los casos de mononucleosis, el patógeno más asociado a este cuadro clínico es el virus del Epstein-Barr, aunque también puede ser desarrollado por otros como el VIH, virus de la hepatitis y otros herpesvirus. A pesar de no ser el patógeno principal causante de la mononucleosis, la causada por CMV suponen la mitad de los casos que dan negativo a una prueba de antígenos causadas por el virus del Epstein-Barr, provocando que el principal método rápido de detección de la enfermedad no sea suficiente (Gámez et al., 2014).

En caso de pacientes inmunodeprimidos, la gravedad de la infección está muy relacionada con el grado de inmunosupresión generando una diversidad amplia de cuadros como neumonitis, retinitis o encefalopatía.

Además, el CMV es la causa más frecuente de infección congénita en los países desarrollados, se reporta en entre el 0,3 y el 2,4 % de los nacimientos y es la principal causa de mortalidad infantil de origen congénito: de los neonatos que presentan síntomas el 4% fallece y el 90% presentará lesiones neurológicas como sordera, problemas motores y afectación visual, así como crecimiento retardado intrauterino, encefalitis o microcefalia (Navas & García, 2011).

Esta es la primera causa de sordera no hereditaria. En aquellos casos de recién nacidos asintomáticos, acaban desarrollando en un 13% de las ocasiones problemas de audición, aún sin manifestar estos síntomas en el nacimiento. En los pacientes nacidos con infección congénita y que manifiestan la enfermedad, se ha visto que la terapia antiviral con ganciclovir puede reducir las secuelas a largo plazo. (Swanson & Schleiss, 2013).

## **1.2 TÉCNICAS ACTUALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR CMV**

En la actualidad, la búsqueda de la infección en neonatos se lleva a cabo tan sólo en aquellos que presenten alteraciones auditivas. Sin embargo, una parte importante que cursa el inicio de la enfermedad de forma asintomática queda sin recibir el diagnóstico y tratamiento, y por tanto con riesgo de sufrir pérdidas auditivas. Hay diferentes técnicas en uso actualmente para la detección de CMV, basadas en el diagnóstico serológico, en el estudio de la inmunidad celular o la detección directa en diversos fluidos y tejidos. Sin embargo, en todas ellas se encuentra que no son la técnica ideal para realizar cribados masivos bien por el coste de la técnica, por la dificultad en el tratamiento de las muestras o por la larga espera hasta la obtención de resultados (Tabla 1).

Tabla 1: Técnicas empleadas en el diagnóstico de la infección del CMV (Gámez et al., 2014).

Técnica	Fundamento	Tiempo	Problemática
Detección de la respuesta inmune humoral	Detectar anticuerpos IgG e IgM.	En la primoinfección. Rápida.	Sólo recomendado en infecciones sintomáticas.
Determinación de la respuesta inmune celular	Determinar capacidad del paciente trasplantado de responder a una reactivación en el período postrasplante.	5 a 7 días tras toma de muestras.	Falta de estandarización. Largo periodo.
Cultivo en fibroblastos humanos	Identificar la aparición de efecto citopático en fibroblastos.	Variable entre 18h y 21 días.	Tiempo impreciso y elevado para obtener resultados.
Prueba de antigenemia	Uso de anticuerpos monoclonales para detectar la proteína pp65m presente en sangre.	Sólo durante la infección.	Labilidad de muestras de sangre.
Diagnóstico molecular	PCR cuantitativa en líquido amniótico En niños nacidos la PCR a partir de sangre, saliva u orina.	Primoinfección y ante anomalías del desarrollo. Resultados en más de 24h.	Más de un día para obtener resultados.

### 1.3 NANOTECNOLOGÍA Y SU APLICACIÓN EN TERAPIA Y DIAGNÓSTICO

La nanotecnología es una rama del conocimiento emergente, resultado de la combinación del conocimiento a escala nanométrica de la materia, típicamente entre 1 y 100 nanómetros, agrupando principios de ramas del conocimiento en ciencia muy diversas como física, química, biología o ingeniería. A esta escala, los materiales pueden exhibir propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las que presentan a mayores escalas, abriendo un abanico de posibilidades para la innovación. Estas tecnologías se desarrollan en campos muy diversos, desde la energía, la industria o la informática hasta sus aplicaciones en medicina, la nanomedicina. (Bayda et al., 2019)

En el ámbito de la biomedicina, se distinguen dos grandes grupos de nanomateriales: los empleados como terapia o los nanomateriales de carácter diagnóstico. Los nanomateriales terapéuticos se fundamentan en hacer llegar de forma específica y concreta a las células sobre la que se quiere dirigir la terapia, por lo que se reducen los efectos secundarios y se aumenta la eficacia del tratamiento (Cheng et al., 2021). Un claro ejemplo de esta tecnología son las vacunas de ARNm encapsuladas en liposomas, desarrolladas para el tratamiento del SARS-CoV2 (Álvarez et al., 2020). Otro ejemplo fundamental es el tratamiento Doxil, que se fundamenta en el encapsulamiento en liposomas de doxorubicina como tratamiento anticancerígeno, con menor cardiotoxicidad (Franco et al., 2018).

En el caso de los nanomateriales para el diagnóstico, existe una gran diversidad, desde nanopartículas metálicas recubiertas de diferentes moléculas biológicas como anticuerpos para unirse al analito de interés (Valdez et al., 2016) o liposomas cargados con agentes de contraste para imagenología médica (Ryan et al., 1984) hasta nanopartículas de polímeros conductores funcionalizados que cambien sus propiedades eléctricas al detectar ciertas moléculas (Ahmadpour & Hosseini, 2019) o nanopartículas de sílice nanoporoso, cuyos poros permiten cargar moléculas en su interior y al funcionalizarlos poder detectar marcadores en muestras biológicas.

### 1.3.1 Nanosistemas de sílice mesoporosa

Los nanomateriales de sílice mesoporosa son sistemas ampliamente estudiados y utilizados en nanomedicina por sus propiedades únicas y su versatilidad para una gran variedad de aplicaciones. Su estructura porosa proporciona una elevada superficie específica, por lo que permite la encapsulación de un gran número de moléculas en el interior de sus poros. Otra ventaja que presentan es la posibilidad de modular su tamaño, forma y estabilidad química en función de los reactivos y condiciones de reacción.

El interior de los poros de estos sistemas (entre 2 y 50 nanómetros en materiales mesoporosa) puede ser cargado con diferentes moléculas como fármacos o colorantes, mientras que la superficie externa del material puede ser funcionalizada para adquirir un control preciso sobre la liberación del contenido interior a la partícula, generando una puerta molecular. Con estos sistemas, se consigue liberar su carga tan sólo cuando el estímulo, específico de cada puerta, interactúa con las moléculas de la superficie del material, permitiendo la salida del contenido (Figura 4). Este estímulo puede tratarse, por ejemplo, de una enzima sobreexpresada en un tipo de células sobre el que se quiera aplicar una terapia, contenida en la partícula en forma de carga o bien puede ser un analito que libere un colorante que permita identificar la presencia en una muestra e incluso otras alteraciones en el medio como una bajada del pH.

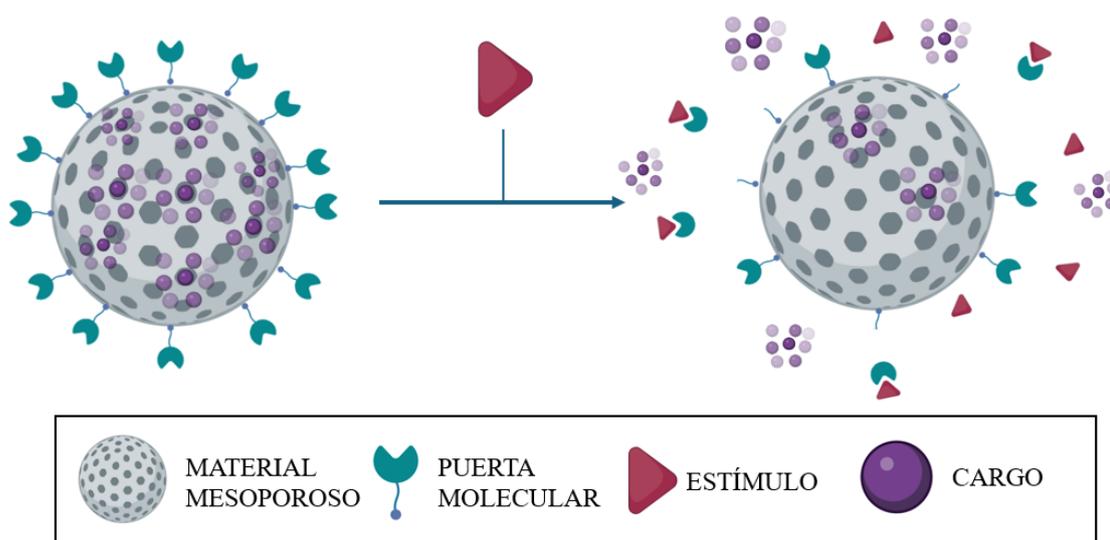


Figura 3: Representación de la apertura de la puerta molecular con que se funcionaliza el material mesoporoso para liberar su carga ante la presencia de la llave molecular. Realizado con Biorender.

Entre los materiales mesoporosa más utilizados se encuentra la sílice mesoporosa de tipo MCM-41, que presenta un gran ordenamiento estructural con poros cilíndricos de entre 2 y 6 nanómetros y uniformes, ordenados en una disposición hexagonal, lo cual le confiere una elevada superficie específica (900-1000m<sup>2</sup>/g) con una gran cantidad de sitios activos para la unión. Además, es muy estable químicamente a cambios de temperatura, pH y presión. Todas estas propiedades hacen de la MCM-41 un material con un importante interés en diversas aplicaciones en biomedicina y en otras áreas.

### 1.3.2 Biosensing basado en partículas mesoporosa

La preparación de nanomateriales con la capacidad de detectar analitos de interés se lleva a cabo mediante la encapsulación de un colorante en estas partículas de MCM-41 y funcionalizando la

superficie externa con diferentes biomoléculas que actúen como una puerta molecular que bloquee la salida del colorante de los poros y que responda de forma específica a la presencia de cierto analito. De este modo, la presencia del analito que se desea detectar produce cambios de conformación o el desplazamiento de la biomolécula de la nanopartícula, observándose una liberación del colorante. Un ejemplo que ha sido reportado recientemente es la detección de droga caníbal (MDPV: 3,4-metilendioxiptovalerona) en muestras, gracias a la encapsulación de un colorante y la funcionalización de la superficie externa con dopamina y un transportador de dopamina recombinante que ante la presencia de esta droga es desplazado, liberando el colorante del interior de los poros y permitiendo la detección en la muestra (Garrido et al., 2020). Otros ejemplos reportados consisten en la detección cationes como  $Pb^{2+}$  o  $Hg^{2+}$  o aniones como  $CN^-$  o  $S^{2-}$ , medidas de pH, detección de radicales de especies reactivas de oxígeno, detección de gases como  $SO_2$ , compuestos como el peróxido de hidrógeno, micotoxinas, glucosa, actividad enzimática o incluso microorganismos vivos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Parra et al., 2021).

A lo largo de los años, el grupo de investigación en el que se ha realizado este proyecto ha publicado varios ejemplos fundamentales de materiales que actúan con puertas moleculares recubiertos con anticuerpos (Climent et al., 2020), aptámeros (Climent & Rurack, 2021), u oligonucleótidos (Climent et al., 2013) para la detección de pequeñas moléculas orgánicas, proteínas y ADN genómico. Además, estos materiales también se han utilizado para la detección de infecciones tanto fúngicas (*Candida albicans*, *Candida auris*) como bacterianas (*Staphylococcus aureus*), así como para la detección de infecciones causadas por el virus SARS-CoV-2 (Caballos et al., 2023) o para detectar miR-99a-4p (biomarcador de cáncer de mama) (Garrido-Cano et al., 2021). Debido a ello, se espera que esta tecnología pueda ser aplicada para la detección del CMV, diana de este proyecto.

### 1.3.3 Oligonucleótidos como puerta molecular

El uso de oligonucleótidos como base de la apertura de la puerta molecular se fundamenta en el reconocimiento por complementariedad entre las bases nucleotídicas y fue reportado por primera vez en 2010 por el grupo de investigación en el que se ha realizado el proyecto (Climent et al., 2010). En este caso, el oligonucleótido quedaba retenido mediante interacciones electroestáticas a una superficie funcionalizada con grupos amino y cargada con un colorante, bloqueando así la salida del colorante. En presencia del oligonucleótido diana, complementario al oligonucleótido adsorbido en la superficie del material, se observó un desplazamiento del oligonucleótido y en consecuencia la liberación del colorante. Esta aproximación fue también utilizada para la detección de ADN genómico (Climent et al., 2013b). Debido a que el mecanismo se basa en interacciones electroestáticas, el diagnóstico de secuencias en medios complejos podría verse afectado por fuertes cambios de fuerza iónica en muestras clínicas como plasma, orina o suero. Es por ello que se pensó en una aproximación de retención del oligonucleótido de manera covalente. En este caso, para la construcción de la puerta molecular se requiere de dos oligonucleótidos: Un primer oligonucleótido de secuencia corta (*oligolinker*) que se une tanto a la partícula mesoporosa como al segundo ácido nucleico, actuando como enlace (*oligolinker*) y un segundo oligonucleótido encargado de reconocer al analito o secuencia diana que se unirá tanto al *oligolinker* como a la secuencia a identificar (*oligosenser*).

La unión de este *oligolinker* a la nanopartícula se realiza mediante la formación de un enlace covalente entre grupos funcionales presentes en el material y el *oligolinker* modificado. Este *oligolinker* a su vez se une a través de una secuencia de oligonucleótidos parcialmente complementaria al segundo oligonucleótido, el *oligosenser*.

El *oligosensor* estará formado por una secuencia que contiene dos regiones: una que será complementaria al *oligolinker* en ambos extremos de la cadena y por tanto tras su hibridación cerrarán la puerta molecular y una segunda región central que hibridará con la secuencia a detectar abriendo la puerta molecular para liberar el *cargo* internalizado en la partícula mesoporosa. En caso de su uso para detección la liberación del colorante interior posibilita la identificación de esta secuencia en una muestra, como se refleja en la figura 5.

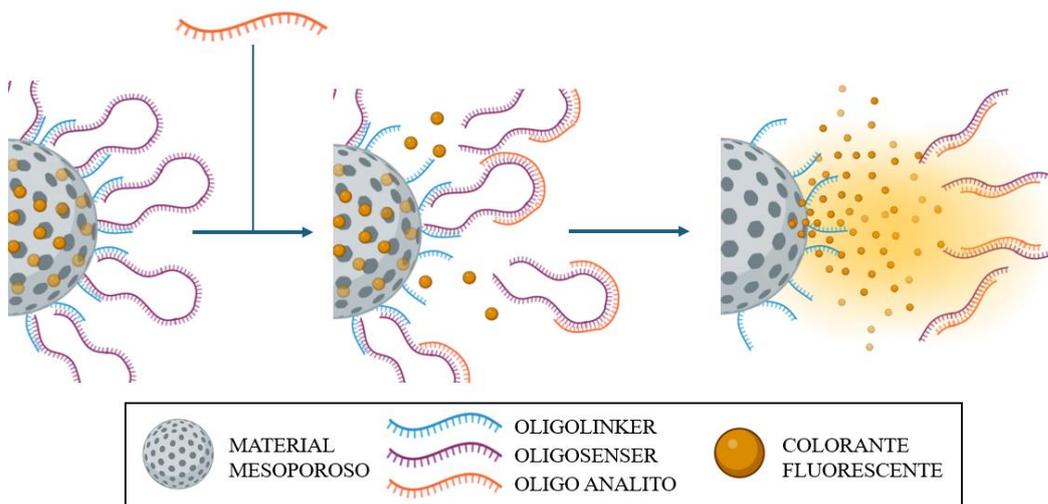


Figura 4: Esquema del funcionamiento de la puerta molecular de oligonucleótidos en una partícula mesoporosa cargada con un colorante fluorescente. Realizado con Biorender.

### 1.3.4 Material de detección en tiras reactivas como soporte.

Debido a la problemática existente en la detección del CMV previamente reportada, existe un interés clínico en obtener una herramienta que nos permita detectar y cuantificar la presencia de CMV en muestra clínicas, especialmente en recién nacidos para desarrollar un plan de cribado universal que sea barato, rápido, eficaz y que pueda llevarse a la práctica, para poder identificar a aquellos neonatos que de forma asintomática padecen la infección y que pueden acabar desarrollando sordera. En este sentido, el desarrollo de la nanociencia y nanotecnología ofrece una buena oportunidad de desarrollar un material mesoporoso basado en la MCM-41, diseñado con un sistema de doble oligonucleótido que nos permita detectar una secuencia propia del CMV. Si además este sistema puede ser diseñado para que sea compatible con la deposición en tiras reactivas nos permitirá aplicar este sistema en el *point-of-care*.

Para ello, se hará uso de un teléfono móvil anclado a una caja como la representada en la figura 6 que sea capaz de aislar toda iluminación exterior, aportar la luz de excitación con longitud de onda apropiada para que la molécula fluorescente se excite y que con un adecuado tiempo de exposición se pueda captar la liberación de las partículas fluorescentes ante la presencia de analito.



Figura 5: Caja smartphone empleada en la toma de fotografías para detección del colorante fluorescente en tiras.

## **2. OBJETIVOS**

En este trabajo se han llevado a cabo una serie de ensayos con el objetivo de:

- Desarrollar un material mesoporoso capaz de liberar colorante fluorescente ante la presencia de su analito: secuencia de ADN propia de CMV.
- Realizar pruebas de caracterización del material usado en la detección para comprobar las diferentes reacciones en el proceso de síntesis.
- Determinar las mejores condiciones para llevar a cabo la liberación en una plataforma sólida.
- Establecer una recta de calibrado que permita hacer un cálculo aproximado de la concentración de analito.
- Comprobar la selectividad del sistema usando como interferentes secuencias empleadas en materiales para detección de otros patógenos.

### 3. MATERIALES Y EQUIPOS

#### Materiales

- CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio, de Sigma Life Science.
- Hidróxido sódico (NaOH) granulado de Scharlab.
- TEOS: tetraetoxisilano, puro para síntesis, de Sigma Aldrich
- Acetonitrilo de Fisher Scientific.
- Ru(bpy)<sub>3</sub>: Tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II), de Aldrich.
- Oligonucleótidos de síntesis química de la casa Integrated DNA Technologies.
- Tricarboxisilano: sal trisódica de ácido N-[(3-Trimetoxisilil)propil]etilendiaminatriacético, en agua al 35%, de Fluorochem.
- HCl: Ácido clorhídrico 1M, de Aldrich Scharlab.
- Tampón MES: hidrato de 2-morfolin-4-ácido iletanosulfónico, de Aldrich.
- EDC: hidrocioruro de 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, de Alfa Aesar.
- NHS: N-Hydroxysuccinimida, de Sigma Aldrich.
- TRIS: tris(hidroximetil)aminometano de Aldrich
- MgCl<sub>2</sub> hexahidratado de Aldrich.
- Isocianato: 3-(Trietoxisilil)propil isocianato, de Sigma Aldrich.
- TEA: Trietilamina de Sigma-Aldrich.
- PBS: Tampón fosfato salino de Dulbecco (10mM), de Aldrich.
- Tolueno, de Scharlab.
- APTES: (3-Aminopropil)triethoxisilano, de Aldrich.
- DMF: N,N-Dimetilformamida, de Aldrich
- Anhidro Succínico, de Aldrich.
- Agua libre de ADNAsas de Invitrogen.
- Material para tiras reactivas de Fusion 5: de la marca Whatman.
- Material para tiras reactivas de fibra de vidrio GF/C: de la marca Whatman.
- BSA: Albúmina de Suero Bovino en polvo liofilizado, de Sigma Aldrich.
- PEGS: 2-[Methoxy(polyethyleneoxy)propyl]dimethylethoxysilane de la marca ABCR.
- Alcohol etílico de Scharlab..

## Equipos

- Material básico de laboratorio.
- Agitador magnético con calefacción, de IKA/RCT basic.
- Mufla de 12,5L de Hornos Eléctricos Gallur.
- Estufa de laboratorio, de Lbx Instruments.
- Minicentrífuga: serie MC15k de Lbx Instruments.
- Agitadora Orbital, RD80 de Lbx Instruments.
- Agitador magnético 10 puestos tipos ms-m-s10, de DLab.
- Thermoshaker PHMT-PSC24 de Grant-bio.
- Espectrofluorímetro FP-8250 de Jasco.
- Cubeta de cuarzo de camino óptico 10x10mm de HellmaAnalytics.
- Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) 100kV, modelo JEM-1010 de JEOL.
- Rejillas para TEM CF300-CU-50 de Electron Microscopy Sciences.
- Refractrómetro de Rayos X D8Advance de Bruker AXS.
- Porosímetro VacPrep 061 de Micromeritics.
- Termogravimómetro (TGA) ThermoStar, modelo GSD301 T3 de Pfeiffer Vacuum
- Zetasizer Nano Z de MALVERN.
- Sonicador de Lbx Instruments.

## 4. PROCESO EXPERIMENTAL

### 4.1 Síntesis de la MCM-41 recubierta por oligonucleótidos

#### 4.1.1 Síntesis de MCM-41

Para la síntesis de la sílice mesoporosa MCM-41 se disuelve en un vaso de precipitados 1g CTAB con 480mL de agua desionizada, en agitación lenta a 30/35°C. Se cubre a partir de este momento con un vidrio de reloj, se añade 3,5mL de NaOH, a concentración 2M, y se establece una temperatura de la disolución de 80°C con agitación magnética de 500rpm con un imán de forma cilíndrica de 6cm en un termoagitador magnético.

Una vez alcanzada la temperatura de 80°C de forma estable, se añade 5mL de TEOS puro para síntesis gota a gota con la ayuda de una pipeta a una velocidad de 5mL/min. TEOS es un surfactante, al añadirlo se forma un precipitado blanco que se deja formar por 2 horas, siempre con el vidrio de reloj para evitar la preconcentración por evaporación del agua.

Tras la reacción, el producto sólido es lavado y filtrado al vacío con agua desionizada hasta alcanzar un pH neutro (aproximadamente 1L de agua es necesario). Después se seca *overnight* a 68°C en una estufa, se moltura (MCM-41 *as made*) y finalmente se calcina en la mufla a una temperatura ascendente de 2°C/min hasta alcanzar los 550°C (3h) y manteniendo dicha temperatura por 5 horas empleando una atmósfera oxidante para eliminar el CTAB que ha quedado en el interior de la nanopartícula (MCM-41 calcinada) y afianzar la estructura cristalina.

#### 4.1.2 Carga de la MCM-41 con colorante Ru(bpy)<sub>3</sub>

El cargo seleccionado como colorante a liberar ante la presencia de la secuencia de CMV se trata del Tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II) o Ru(bpy)<sub>3</sub>, un compuesto organometálico que se compone de un ion de rutenio (Ru) en estado de oxidación +2, unido a tres moléculas de 2,2'-bipiridina (bpy) a través de enlaces coordinativos como se refleja en la figura 7a. Este compuesto es conocido por sus propiedades luminiscentes. En su espectro de absorción, en la figura 7b, existe un pico de interés a 450nm en cuya relajación se produce una señal de emisión centrada en 610nm. (Villani et al., 2022)

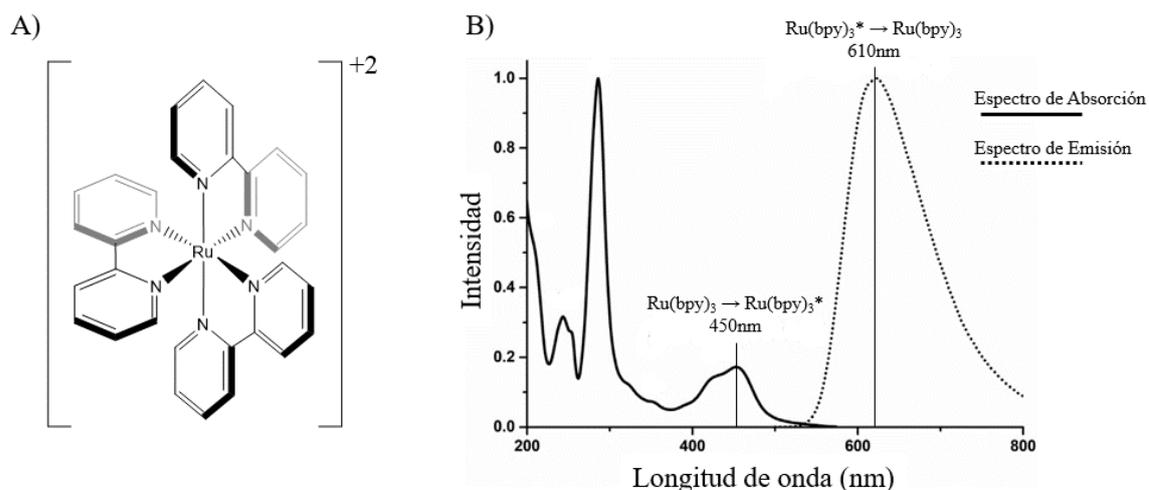


Figura 6: A) Estructura química de Ru(bpy)<sub>3</sub>, diseñado en Chemdraw B) Espectro de absorción y de emisión de Ru(bpy)<sub>3</sub>, siendo Ru(bpy)<sub>3</sub>\* el estado excitado (Villani et al., 2022)

La carga de las partículas de MCM-41 se realiza en una proporción de 0,8mmol/g de MCM-41 de forma estándar para cualquier cargo, así pues, en el caso de Ru(bpy)<sub>3</sub> se utilizan unos 60mg de colorante en su formulación hexahidratada por cada 100mg de sílice calcinada en 20mL disolvente acetonitrilo. Esta carga se ha de dejar *overnight* con agitación magnética, posteriormente retirar el acetonitrilo y dejar secar en la estufa de 38°C. Se obtiene MCM-41/Ru(bpy)<sub>3</sub>, que sirve como base sobre el que se genera la puerta molecular.

#### 4.1.3 Anclaje del oligonucleótido *oligolinker* mediante diferentes alcoxisilanos

Se prueban tres alcoxisilanos como enlace del primer oligonucleótido: el primer método con sal trisódica de ácido N-[(3-Trimetoxisilil)propil]etilendiaminatriacético (tricarboxisilano), isocianato de metiltrimetoxisilano (isocianato) y aminopropiltriethoxisilano derivatizado con anhídrido succínico (APTES-COOH).

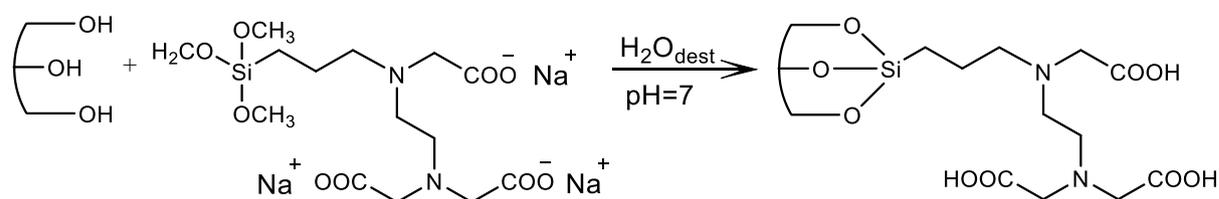
Una vez cargado el colorante en la nanopartícula se procede a anclar el primer oligonucleótido que conforma la puerta molecular: *oligolinker*, que tiene la siguiente secuencia:

##### Oligolinker

5' - NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-AAA AAA CCC CCC-3'

En el extremo 5' de la secuencia nucleotídica del *oligolinker* hay una modificación de amino terminal unida por una cadena de 6 carbonos al nucleótido inicial. Esta modificación es fundamental para el entrecruzamiento realizado por varios métodos, que se detallan a continuación:

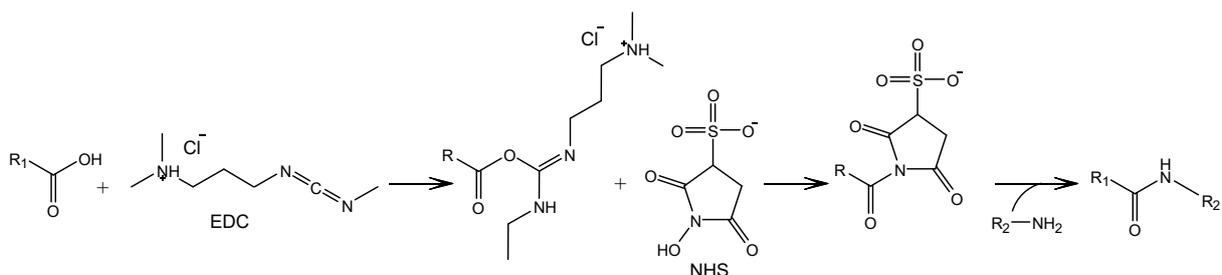
##### Método del tricarboxisilano



Esquema 1: Funcionalización de los grupos silanoles de la MCM-41 con un grupo tricarboxisilano.

El primer paso es una reacción *overnight* en agitación orbital, se añade por cada 1mg de MCM-41/Ru(bpy)<sub>3</sub> una disolución de 1,85µL de N-[(3-Trimetoxisilil)propil]etilendiaminatriacético (tricarboxisilano) y 30µL de agua destilada, previamente ajustada a pH 7 con el uso de HCl, para neutralizar la elevada basicidad del tricarboxisilano. Esta reacción permite funcionalizar los grupos silanoles del material con grupos carboxilo.

Tras la reacción se llevan a cabo dos lavados haciendo uso de una minicentrífuga para precipitar el material, sin superar las 5500g de fuerza de rotación, evitando así la degradación del material. Estos lavados se realizan eliminando el sobrenadante tras la centrifugación y resuspendiendo en agua destilada con colorante Ru(bpy)<sub>3</sub> para evitar la salida del colorante, puesto que el material todavía no está bloqueado con ninguna molécula que actúe como puerta molecular.

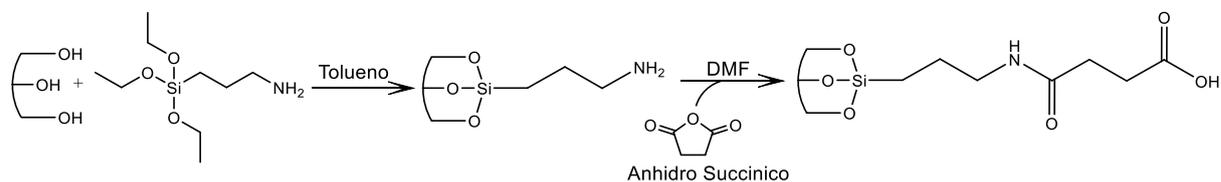


Esquema 2: Reacción de activación y formación del enlace amida entre grupos carboxilo y grupos amina, gracias a la acción combinada de EDC y NHS

A continuación, se prepara una disolución en 500 $\mu$ L de tampón MES (100mM, pH 5'5) de 3mg de EDC y 3 mg de NHS por cada miligramo de MCM-41/Ru(bpy)<sub>3</sub> inicial. Transcurridos 20min se realizan dos lavados con tampón TRIS+MgCl<sub>2</sub> (37'5mM, 20mM, pH 7'6) con colorante Ru(bpy)<sub>3</sub>, se resuspende en un volumen de 500 $\mu$ L de tampón y se añaden 20  $\mu$ L del *oligolinker* 100 $\mu$ M, por cada gramo inicial de nanomaterial. Esta reacción (Esquema 2) permite anclar a los grupos carboxilo funcionalizados en la primera etapa el *oligolinker* mediante un enlace amida. Se deja en agitación orbital *overnight* para garantizar una completa reacción de entrecruzamiento.

Una vez entrecruzado el *oligolinker*, se han de realizar 2 lavados con el tampón, y añadiendo el volumen correspondiente, se lleva a la siguiente etapa con una concentración de 2mg/mL, haciendo uso de la precipitación por centrifugación, eliminación de sobrenadante y resuspensión.

#### Método de APTES derivatizado (APTES-COOH)



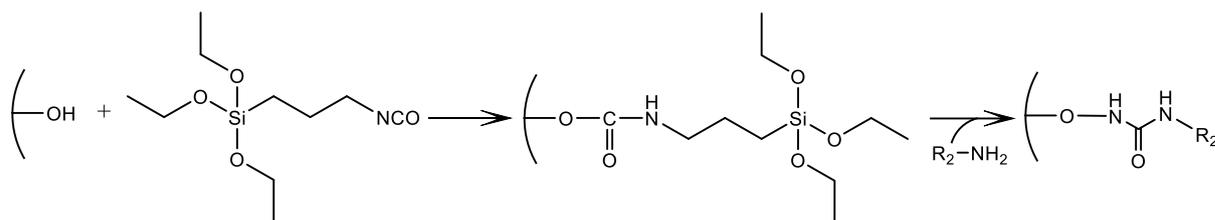
Esquema 3: Funcionalización de 3 grupos silanoles con un grupo carboxilo por la unión de APTES y la derivatización posterior:

En primer lugar, cada 1mg de MCM-41/Ru(bpy)<sub>3</sub> se disuelve en 133 $\mu$ L de tolueno y se añade 1,17 $\mu$ L de aminopropiltrióxidosilano (APTES) en una reacción que dura 5h 30min tras los cuales se llevan a cabo dos lavados con acetonitrilo con colorante Ru(bpy)<sub>3</sub> y llevados a la estufa de 38°C *overnight*, concluyendo la primera reacción del esquema 4.

Una vez seco, el producto es resuspendido en 300 $\mu$ L de alcohol etílico por cada gramo de material inicial a los que se añaden 6 $\mu$ L de DMF y 0,6mg de anhídrido succínico, y se deja reaccionar *overnight* a 40°C en el Thermoshaker a 1000rpm.

Tras la reacción, se lleva a cabo la reacción con EDC y NHS del esquema 2 que nos permitirá anclar al nuevo grupo carboxilo el grupo amina del *oligolinker*. En este caso, al haber tan solo 1 grupo carboxilo por cada funcionalización, la reacción se lleva a cabo con 1mg de EDC y 1mg de NHS por cada 1mg de MCM-41, y al añadir 20 $\mu$ L del *oligolinker* 100 $\mu$ M por cada 1mg de material, se formará a lo largo de una reacción *overnight* en agitación orbital el enlace amida con el oligonucleótido de anclaje.

### Método del isocianato



Esquema 4: Reacción de formación de un enlace urea entre un grupo silanol y un grupo amina, por el método del isocianato.

Para la primera reacción se suspende 1mg de MCM-41/Ru(bpy)<sub>3</sub> en 34,48μL de CH<sub>3</sub>CN con colorante Ru(bpy)<sub>3</sub> y 1,238μL de isocianato de metiltrimetoxisilano y se lleva a agitación magnética por 6h. Tras este tiempo, se realizan dos lavados con acetonitrilo con colorante.

La segunda reacción se suspende en 500μL de CH<sub>3</sub>CN con colorante, 40μL de *oligolinker* y 2μL de TEA por 3h en agitación orbital. Tras esto, se forma un enlace urea como se refleja en el esquema 3 y se realizan dos lavados con acetonitrilo con colorante seguido de dos lavados de PBS (0.25x) con colorante, cambiando a un medio adecuado para la posterior unión del segundo péptido.

#### 4.1.4 Hibridación del *oligosenser*

Esta etapa concluye el proceso de síntesis y supone el cierre de la puerta molecular. Se ha de llevar la concentración de nanomaterial a 2mg de MCM-41/Ru(BPY)<sub>3</sub> inicial por mL de tampón TRIS+MgCl<sub>2</sub> (37'5mM, 20mM, pH 7'6) con colorante y añadir 40μL del segundo oligonucleótido (100μM). Los oligonucleótidos son los siguientes:

*Oligosenser pp65:*

5'-**TTT TGG GGG GGG** GGAC ACA ACA CCG TAA AGC CAG CGT TCG TGT TTC C **GGG GGG TTT T**-3'

*Oligosenser gB:*

5'-**TTT TGG GGG GGG** GATAGGAGGCGCCACGTATTCTACCCCTATCGCGTGTGTTC **GGG GGG TTT T**-3'

Las bases señaladas son las encargadas de la hibridación con el *oligolinker* mientras que el resto son las complementarias a la secuencia que se pretende identificar, y que, en caso de unión, abre la puerta y genera una señal. Ambos oligonucleótidos, en su región central son complementarios a una porción de la secuencia de los genes pp65 y gB, ambos de gran relevancia en el proceso de infección del CMV, motivo por el que fueron seleccionados.

La hibridación es un proceso de 3h en agitación y a 33°C en un Thermoshaker a 1000rpm. Tras este paso, se realizan lavados con TRIS+MgCl<sub>2</sub> (37'5mM, 20mM, pH 7'6) sin colorante esta vez ya pues la puerta se ha cerrado hasta obtener un sobrenadante transparente: unos 4 lavados, el último se realiza tras 30mins de agitación orbital, para asegurar que la superficie del material queda libre de colorante. Tras el último lavado se almacena a 1mg/mL y concluye el proceso de síntesis.

## 4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES SINTETIZADOS

Para comprobar que la síntesis ha sido exitosa, es fundamental llevar a cabo una serie de ensayos de caracterización que nos permitirán definir las características básicas de la partícula básica como control de calidad de la reacción de síntesis de la MCM-41 así como asegurar que en las diferentes etapas de funcionalización se han llevado a cabo correctamente.

Sin embargo, esta caracterización no se ha realizado para el anclaje del *oligolinker* por método del isocianato ni para el *oligosenser* pp65 debido a sus insatisfactorios resultados en pruebas de liberación. (Ver apartados 4.3 y 5.2 correspondientes a pruebas de estabilidad y sus resultados).

### 4.2.1 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

La microscopía de transmisión electrónica (TEM) es una técnica de toma de imágenes a escala nanométrica que aplica un haz de electrones para la obtención de fotografías de gran resolución de la estructura de los materiales. En concreto se ha empleado el TEM de 100kV del servicio de microscopía de la UPV, que emplea un cañón de electrones acelerados mediante una diferencia de potencial de 100kV que atraviesa la muestra viendo alterada su trayectoria en función de la densidad electrónica y la estructura del material, permitiendo la formación de imágenes de alta resolución.

La muestra ha de ser depositada en rejillas de específicas de un material conductor que no interfiera significativamente con el haz de electrones, las rejillas empleadas son de cobre con un diámetro de 3mm y recubiertas de una película de soporte de carbono para sostener la muestra. La muestra debe estar seca y es fundamental su manejo con sumo cuidado para evitar alteraciones.

Con las imágenes tomadas, se comprueba la presencia de los poros en la superficie de la partícula y se estudia su tamaño, mediante el análisis del diámetro Feret (distancia máxima entre dos puntos del contorno de una partícula) con el software ImageJ.

### 4.2.2 Difracción de rayos X y porosimetría

#### Difracción de rayos X

La técnica de rayos X permite analizar la estructura cristalina de un material, por lo que se puede emplear como prueba de calidad para asegurar la formación de cristales de sílice, necesarios para la estructura porosa. En concreto se hace incidir un haz de Rayos X que son difractados por la muestra, obteniendo una señal más intensa en los materiales cristalinos registrando una intensidad, en diferentes ángulos. Comparar el patrón de Rayos X entre la MCM-41-*as made* y la MCM-41-calcinada, permite comprobar si ha ocurrido una correcta cristalización y calcinación, pues se generan picos de intensidad mayor correspondientes a la difracción en los diferentes planos debido a que la presencia del surfactante en el interior interfiere en la medida, mostrando que el material es menos cristalino al estar cargado.

Para ello, se genera una fina capa de nanopartículas, tanto *as made* como calcinadas en un portaobjetos específico para este ensayo y se introduce en el instrumento de análisis de Rayos X. Los espectros generados se hacen solapar en una misma gráfica para poder comparar los resultados.

#### Porosimetría

En cuanto al análisis de porosimetría, La técnica de adsorción de nitrógeno es una de las metodologías más utilizadas para caracterizar la superficie y la porosidad de materiales. Se basa en medir la cantidad de nitrógeno que se adsorbe en la superficie de un material a bajas temperaturas, generalmente cerca del punto de ebullición del nitrógeno líquido (77 K). Posteriormente, se mide también la desorción de este gas por aumento de presión. Este proceso genera isotermas de adsorción y de desorción que se puede analizar para obtener información sobre el área superficial específica, la distribución del tamaño de poros y el volumen de poros del material con los que se puede confirmar finalmente la calidad de la síntesis y la presencia de colorante en el interior de los poros. Esta información se obtiene a partir de la isoterma mediante dos métodos matemáticos: mediante el método BET se puede calcular el área superficial específica, mientras que con el método BJH se obtiene el volumen y el tamaño de poro.

#### **4.2.3 Termogravimetría (TGA)**

Se realiza un análisis de termogravimetría para analizar y cuantificar en qué medida el colorante Ru(bpy)<sub>3</sub> alcanza el interior de la sílice porosa partiendo de una carga de 0,8mmol/mg de MCM-41 y posteriormente estudiar qué parte de ese colorante se mantiene en el interior tras las primeras reacciones de derivatización. Además, nos permitirá identificar también la cantidad de grupo funcional que había quedado covalentemente unido al material, así como la cantidad de grupos silanoles propios de la partícula.

El fundamento aplicado en esta técnica es el siguiente: a través de la medición de la masa de la muestra y aplicando un programa de calentamiento progresivo se pueden observar los cambios de masa que se producen, debidos al paso a fase gas de los componentes de la nanopartícula.

En concreto se estudia 3 muestras de unos 5mg en TGA: una primera muestra de MCM/Ru(bpy)<sub>3</sub> en la que se podrá estudiar la capacidad de retención del colorante por parte de la partícula de sílice, una segunda muestra de MCM/Ru(bpy)<sub>3</sub> con el grupo tricarboxisilano como funcionalización y una tercera muestra de MCM/Ru(bpy)<sub>3</sub> con APTES derivatizado. En estas segunda y tercera muestra se estudia en qué medida se consigue mantener el colorante en su interior tras la primera reacción de funcionalización y qué cantidad de grupos de anclaje ha quedado unido covalentemente en la estructura.

En este tipo de muestras se espera un primer descenso de masa correspondiente a la evaporación del disolvente, un segundo descenso en el que se evapora en conjunto de moléculas orgánicas presentes en la muestra y una tercera evaporación de los grupos silanoles. La evaporación del Ru(bpy)<sub>3</sub> y de los grupos de enlace se espera en la segunda reducción de masa, por lo que estudiando estos cambios podremos calcular la cantidad de material que había en nuestra muestra.

#### **4.2.4 Zetasizer**

##### Potencial Z

El potencial Zeta es una medida del potencial eléctrico en la interfaz partícula-líquido y es fundamental para entender y hacer un seguimiento al proceso de síntesis y recubrimiento de las nanopartículas. Para ello se disuelve 1mg de nanopartícula en 1mL de agua destilada y se introduce en una cubeta específica que permite aplicar una diferencia de potencial, debido a que tiene electrodos incorporados. Es posible medir la carga superficial porque al aplicar un campo eléctrico

se produce un movimiento de las partículas y se mide el cambio de frecuencia de la luz que las atraviesa, causado por el efecto Doppler, que permite calcular la carga superficial.

Así pues, se toman medidas de diferentes muestras, obtenidas a lo largo del proceso de síntesis del método del tricarboxisilano y del método de APTES derivatizado (APTES-COOH).

En ambos métodos se toma medida del potencial de la MCM-41 y de la MCM-41/Ru(bpy)<sub>3</sub>. En el caso del tricarboxisilano se toma medida tras la adición del propio grupo, tras la unión del *oligolinker* y tras la hibridación del *oligosenser*. En el caso del APTES-COOH, se toma medida tras su unión, tras su derivatización (adición del grupo carboxilo), tras la unión del *oligolinker* y tras la hibridación del *oligosenser*. Posteriormente, se analizan las medidas para comprobar si el proceso de síntesis está funcionando correctamente.

## DLS

La técnica de DLS (dispersión de luz dinámica) es empleada para medir el tamaño de partículas analizando el patrón de interferencia causado por partículas en movimiento en una disolución, que permite calcular el tamaño de su rango hidrodinámico. Se trata de una técnica no destructiva en la que se requiere muy poco volumen de muestra, pero en la que es necesario asegurar una correcta dispersión de las nanopartículas para una medición adecuada: será imprescindible el uso de baños de ultrasonidos que permitan reducir y dispersar al máximo la muestra.

Así pues, se toman medidas a partir de una disolución de 1mg/mL de nanopartícula de los resultados de las diferentes etapas de síntesis, después de haber sonicado y aplicado un pequeño pulso de centrifugación para hacer caer los agregados que no se hayan disgregado. Se mide por tanto la partícula de MCM-41, la MCM-41 con el colorante, la partícula con el *oligolinker* anclado: tanto por el método de tricarboxisilano como por el método de APTES y la partícula con el *oligosenser* hibridado. Los resultados obtenidos son representados en una gráfica de barras con los que se podrá comprobar si la partícula aumenta de tamaño, consecuencia de su recubrimiento.

## **4.3 PRUEBAS DE ESTABILIDAD**

En esta etapa, se busca determinar cuál de las 3 posibilidades de anclaje del *oligolinker* ofrecía una mayor estabilidad al ser depositada en tiras reactivas y proseguir con la caracterización de la solución que nos ofrezca mejores resultados. De igual forma se selecciona el *oligosenser* que mejores resultados aporte. La importancia de seleccionar el mejor nanomaterial por su estabilidad es de gran importancia, entendiendo la estabilidad como la capacidad de mantener la puerta cerrada ante la ausencia de analito.

### **4.3.1 Cinéticas en disolución para selección de *oligosenser***

Para la selección del *oligosenser*, se lleva a cabo un ensayo en suspensión, en que se prepara una suspensión de 0,5mg/mL de material: MCM41/Ru(bpy)<sub>3</sub> con ambos *oligosenser* anclados por el método del APTES derivatizado en medio TRIS+MgCl<sub>2</sub> (37'5mM, 20mM, pH 7'6).

Así pues, se tienen dos nanomateriales distintos, cada uno sellado con un *oligosenser* distinto, capaces de reconocer a diferentes genes del CMV, en disolución. A una mitad de cada disolución se

añade 10µL de oligonucleótido complementario mientras que a la otra mitad de cada, se añade 10µL de agua libre de ADNasas, por cada mL de disolución. Estos oligonucleótidos complementarios son los siguientes:

Complementaria al Oligosenser pp65:

5'- GGA AAC ACG AAC GCT GGC TTT ACG GTG TTG TG TC -3'

Complementaria al Oligosenser gB:

5'-GAACACACGCGATAGGGGTAGAATACGTGGCGCCTCCTAT-3'

Así pues, se coloca en el Thermoshaker a 1000rpm y 33°C y se extraen alícuotas en diferentes tiempos entre 0 y 60min (0, 2'5, 5, 10, 15, 30 y 60 min) que se centrifugan para hacer caer en el *pellet* al material mesoporoso y se toma el sobrenadante donde se encuentra en disolución el colorante liberado. Este sobrenadante se mide en el fluorímetro con una longitud de onda de excitación de 450nm y se registra la emisión generada en 585nm (ligeramente menor a su pico en agua destilada por efecto de otros solutos que contiene el medio). Al representar los valores de intensidad de emisión en el tiempo, se elegirá el material con el oligonucleótido que mejor cierra la puerta molecular sin presencia del oligonucleótido complementario y que más colorante libera en presencia del oligonucleótido complementario.

#### **4.3.2 Selección del método de anclaje del *oligosenser***

Una vez seleccionado el oligonucleótido que mejor sirve para el propósito del trabajo, se analiza con qué método de anclaje se obtienen mejores resultados y en concreto buscar el nanomaterial que mejor diferencia de señal genere entre la ausencia de analito y su presencia, en este caso en tiras reactivas.

Para este ensayo, se prepararon tiras reactivas de fibra de vidrio con un tamaño de 0,5cm de grosor y 5cm de longitud. A una altura de 1cm se depositan 5µg de material con la puerta molecular ya cerrada, como se representa en la figura 8A. Esta tira es el producto final, y la detección ocurre al sumergirla en un recipiente (pocillo placa ELISA) con medio TRIS+MgCl diluido (9,375mM, 5mM, pH 7'6) en el que se encuentre el analito, en concreto la secuencia nucleotídica complementaria al *oligosenser*. El motivo de la dilución del tampón es reducir la fuerza iónica del medio y así evitar liberaciones inespecíficas en tiras.

El contenido el pocillo ascenderá por la tira reactiva gracias al fenómeno de capilaridad, como se representa en la figura 8B y en caso de producirse una correcta hibridación entre el oligonucleótido complementario y el *oligosenser*, se liberará el contenido interior generando un *release* que será indicativo de la presencia de analito, mientras que, en caso de ausencia de complementariedad, no se producirá la liberación tal y como se muestra en la figura 8C.

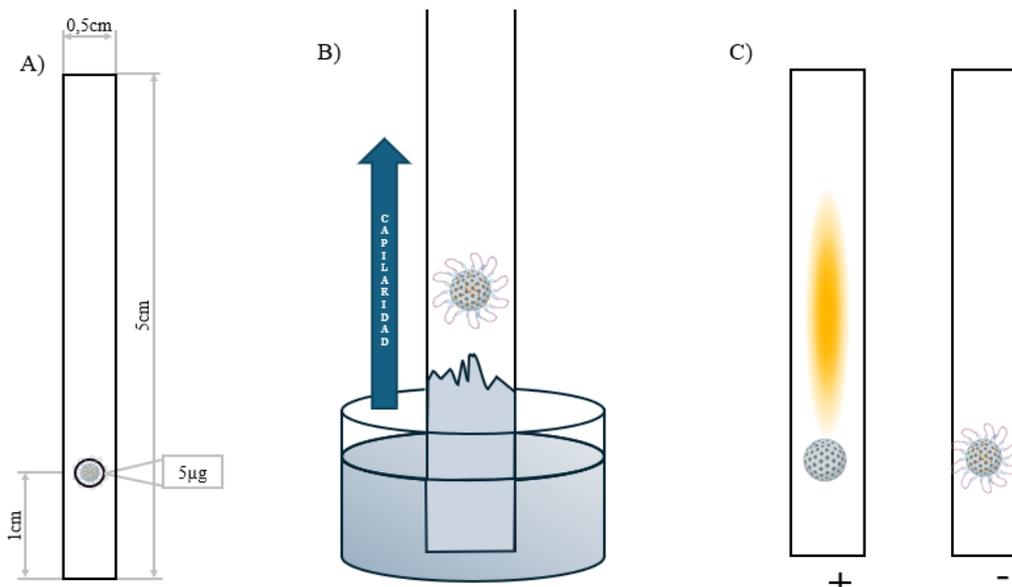


Figura 7: Aspectos generales de las tiras reactivas. A) Diseño de las tiras reactivas B) Mecanismo de puesta en contacto entre el nanomaterial detector y el fluido a analizar C) Comparación entre un material que ha liberado su contenido (+) y un material que se ha mantenido inalterable sin producir señal.

Sin embargo, el material puede no ser completamente estable en su uso en tiras y podrían obtenerse falsos positivos pues se produciría la liberación en ausencia de analito. Por ello, se lleva a cabo un estudio comparativo de los diferentes nanomateriales para seleccionar aquel que ofrezca una mayor estabilidad en su formulación final. Para ello, se sumergen 3 tiras con cada material en 3 pocillos con TRIS+MgCl<sub>2</sub> (9,375mM, 20mM, pH 7'6) concentración 1µM del oligonucleótido complementario y 3 tiras en pocillos donde se añade tan solo agua al tampón, actuando de blanco.

Se toman fotografías (ISO= 200, Velocidad de obturación 0,5s) con la cámara en la caja seleccionando el led de 465nm a la vez que se aplica el filtro polarizador para excitar de forma específica el colorante de la liberación y mediante el software de análisis de imagen ImageJ se mide la intensidad la liberación para poder comparar los resultados. Se evita el ruido de posibles contaminaciones con otros materiales fluorescentes filtrando y tomando tan solo el canal de color rojo durante el análisis de imágenes y se establece un parámetro con la siguiente fórmula:

$$I_x = \frac{I_{R-R0}}{I_{S-S0}}$$

Este parámetro  $I_x$  pone en relación la intensidad la liberación generada ( $I_R$ ) con la intensidad del punto donde se deposita el material( $I_S$ ) . En ambos casos se resta a los valores de intensidad una segunda medida de igual forma de una zona cercana donde no haya material depositado para eliminar el ruido de fondo ( $I_{R0}$  y  $I_{S0}$  respectivamente).

Comparar la media de los parámetros calculados de las diferentes combinaciones de síntesis, permite elegir el material de mayor interés por presentar una mayor relación entre la señal generada por una muestra con analito y una señal negativa. Este material, es sometido a una serie de caracterizaciones, optimizaciones y posteriores análisis de liberación.

#### 4.4 Optimización de la liberación en tiras reactivas

Para llevar a cabo el desarrollo del producto final en tiras reactivas, se buscan las condiciones que mejoran y maximizan las diferencias entre la respuesta positiva y la respuesta negativa: para ello se

analizan los resultados obtenidos alterando 3 parámetros diferentes: material de la tira reactiva, tiempo de contacto con la disolución y tipo de medio sobre el que depositar la muestra con el fluido a analizar.

#### 4.4.1 Preparación de diferentes tiras reactivas

Se preparan 6 tipos distintos de tiras reactivas. Todas las tiras son de 0,5cm de ancho y 5cm de largo. El primer tipo de tiras son de **GF/C** y **Fusion 5** (Fus.5) sin modificar, por lo que tan sólo se han de recortar a la medida necesaria.

En segundo lugar, se funcionalizan con polietilenglicol-silano (**GF/C-PEGS** y **Fus.5-PEGS**). Se prepara una disolución en tolueno al 2,6% de PEGS y se sumergen las tiras en agitación orbital a 40rpm *overnight*. Tras ello se cambia la disolución por etanol y se deja en agitación orbital por 15min. Se elimina el etanol y se deja secando en la estufa *overnight*.

En tercer lugar, las tiras de **GF/C** y **Fus.5** se impregnan con BSA (**GF/C-BSA** y **Fus.5-BSA**). Para ello se prepara una disolución al 0,1% de BSA, se sumergen las tiras y se lleva a agitación orbital a 40rpm durante 20min. Posteriormente se cambia la solución por agua destilada y se agita durante 5min más. Tras el lavado, se dejan secar sobre un vidrio de reloj en la estufa *overnight*.

#### 4.4.2 Ensayo de cinéticas de liberación en diferentes materiales de tiras y tampones.

Para seleccionar el tiempo en que la liberación se maximiza en condiciones de presencia del analito, se realiza una prueba donde se compara el parámetro  $I_x$  generado ante la presencia de analito y el generado en su ausencia ( $I_{x0}$ ): generando un cociente  $I_{xa}/I_{x0}$ . Este cociente nos permite saber cuánto más intensa es la señal del analito frente al blanco en los diferentes tiempos probados (1, 2, 3 y 4 min), seleccionando así el tiempo óptimo y en la tira reactiva idónea para el material.

Así pues, se preparan los pocillos con dos tampones diferentes: TRIS+MgCl<sub>2</sub> (9,375mM, 5mM, pH 7,6) y PBS (10mM). Se preparan 4 pocillos con una concentración de 1µM del oligonucleótido complementario al *oligosenser* gB y 4 pocillos sin el analito (añadiendo el mismo volumen de agua libre de ADNAsas), por cada uno de los materiales de las tiras y por cada uno de los medios de liberación.

Se miden los parámetros  $I_x$  de cada liberación y al analizar los datos se establecen las condiciones para futuros ensayos con el nanomaterial generado: aquellas que mayor valor tenga el cociente entre el parámetro  $I_x$  de los analitos y el parámetro  $I_{x0}$  de los blancos.

### 4.5 Estudio del comportamiento del material

Finalmente es necesario estudiar el límite de detección (LOD) del sistema planteado y realizar un ensayo de especificidad, para comprobar si en presencia de otros analitos podría abrirse la puerta o se mantiene cerrada y únicamente se abre en presencia del analito que se desea detectar.

#### 4.5.1 Recta de calibrado de la respuesta

Una vez estudiados los diversos parámetros de mejora y optimización del sistema, se busca analizar la capacidad del sistema de predecir la cantidad de secuencia complementaria al *oligosenser*. Para ello se selecciona el material con los mejores resultados y en las condiciones de máxima respuesta,

que es el anclaje del *oligosenser gB* por el método de APTES-COOH, y depositado en tiras de fibra de vidrio sin modificar, sumergiéndolo en una disolución de TRIS+MgCL (9,375mM, 5mM, pH 7'6) por 3 minutos (Consultar apartado de Resultados, en los puntos).

Para la recta se tomaron por triplicado tiras con el material depositado en el *spot* y se sumergieron en pocillos de concentraciones decrecientes partiendo de 1 $\mu$ M por 10 diluciones seriadas hasta alcanzar 9,77\*10<sup>-4</sup> $\mu$ M (0,97nM), así como 3 pocillos sin nada del oligonucleótido (los blancos). De esta forma, se lleva a cabo el ensayo, se toman las fotografías y de nuevo se calculan los valores del parámetro I<sub>x</sub>. El factor obtenido de dividir cada una de las señales I<sub>x</sub> sobre la señal de blanco I<sub>x0</sub> de su réplica nos permite dibujar una curva de calibrado que relaciona concentración de analito (oligonucleótido complementario a *oligosenser gB*) y la liberación de colorante.

#### 4.5.2 Análisis de selectividad del sistema

Finalmente se lleva a cabo un análisis para comprobar si otras cadenas nucleotídicas son capaces de producir una liberación del colorante, con el objetivo de evaluar la selectividad del material preparado. Para ello se preparan disoluciones 1 $\mu$ M de varios oligonucleótidos que se tiene en el grupo para diferentes propuestas y se lleva a cabo un ensayo por triplicado en el que se estudiará el parámetro I<sub>x</sub> tanto en los oligonucleótidos “interferentes” como en un control positivo y un control negativo. Se analiza posteriormente el promedio de los parámetros I<sub>x</sub> de cada caso y se lleva a cabo un análisis estadístico para comprobar la significancia de las diferencias.

Las secuencias de los oligonucleótidos que se prueban son secuencias de otros oligonucleótidos encargados para detección de patógenos en el laboratorio. Estos patógenos eran *Candida auris*, *Staphilococcus aureus* y Papilomavirus. Las secuencias de estos oligos son:

Oligonucleótido complementario al *oligosenser* para *Candida auris*:

5'-AGT TCT CTC ACG AGT GCT GC-3'

Oligonucleótido complementario al *oligosenser* para *Staphilococcus aureus*:

5'- GT TGT AGC ACG GTG GCG GTG TGA GGC TGG GAG GAC GGA CTG GGG GGG TTA  
GCG CCG TAG GGA - 3'

Oligonucleótido complementario al *oligosenser* para Papilomavirus:

5'-TT AAA TTG TTG CAG GAT AAC AAA AGT GAA GTA CCA TTG GAT ATT TGT CAG TCT  
-3'

Además, se empleó el oligonucleótido complementario al *oligosenser* pp65 descartado en las primeras etapas del trabajo:

Complementaria al *Oligosenser* pp65:

5'- GGA AAC ACG AAC GCT GGC TTT ACG GTG TTG TG TC -3'

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Resultados de caracterización

#### 5.1.1 Análisis de las fotografías tomadas por TEM

Resultado de las fotografías tomadas en el microscopio de transmisión electrónica se comprueba varios aspectos de relevancia para comprobar la calidad de la síntesis de MCM-41. En primer lugar, se puede observar una aparente porosidad de las nanopartículas (Figura 8A), así como su forma redonda, lo cual sería indicativo de una correcta síntesis y por tanto presenta la calidad suficiente para continuar el proceso de síntesis, a falta de confirmación por pruebas como porosimetría o rayos X.

En cuanto al tamaño de estas partículas, se ha representado un histograma de tamaños (Figura 8b) se observa una distribución normal de los valores: se ha realizado una prueba de Anderson Darling, obteniendo un valor p de 0,8285 que es mayor a  $\alpha=0,05$ , por lo que no hay ningún motivo para pensar que no se trata de una distribución normal de los tamaños muestrales. Además, se encuentra un tamaño medio de partícula de 94,61nm de diámetro Feret, con una desviación estándar de 21,72. Así pues, el 90% de las medidas se encuentran entre un tamaño de 59,29nm y 131,5nm lo cual se considera satisfactorio y permite continuar las etapas de funcionalización.

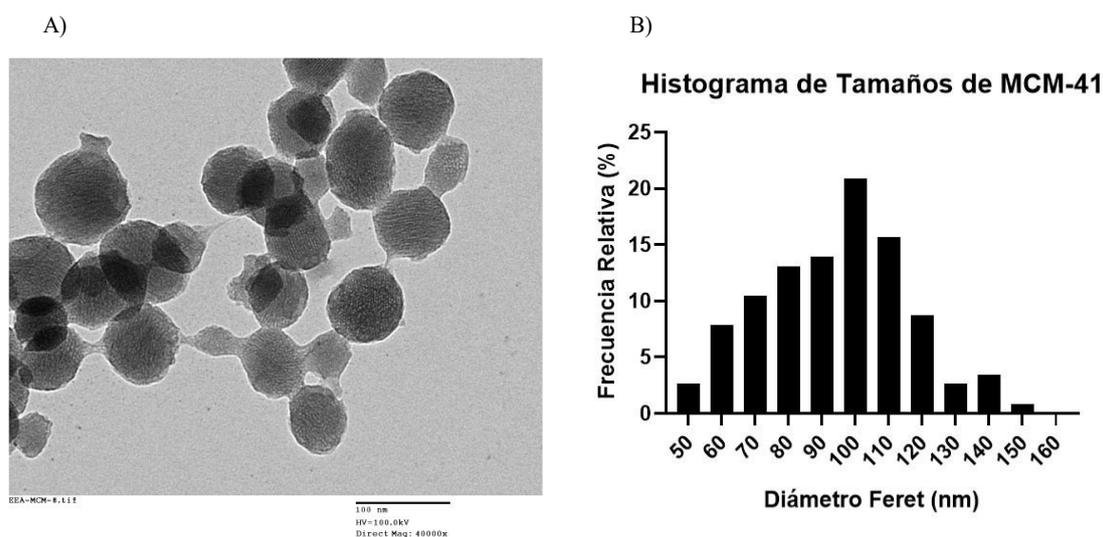


Figura 8: Resultados de la toma de microscopía de transmisión electrónica. A) Fotografía de 4 MCM-41 de 50000 aumentos. B) Histograma de la cuantificación del diámetro Feret de 100 nanopartículas de MCM-41 a partir de imágenes de TEM.

#### 5.1.2 Análisis de la caracterización por difracción de rayos X y porosimetría

##### Difracción de rayos X

En la figura 9, se agrupa el difractograma de rayos X de la MCM-41 *as made* y de la MCM-41 calcinada. La distribución de los picos de difracción confirma una estructura hexagonal ordenada y una alto orden y simetría en los poros correspondientes a los planos de difracción [100] entre 2 y 3 grados  $2\theta$ , [110] entre 4 y 5 grados  $2\theta$  y [200] sobre 5 grados  $2\theta$ . La primera diferencia clara entre ellos es la intensidad de la señal del pico de difracción [100] debida a la eliminación del surfactante y al aumento de contraste. Por otro lado, el desplazamiento de este pico en el material calcinado se

corresponde con la contracción de los poros durante la calcinación a causa de una mayor condensación de los grupos silanoles.

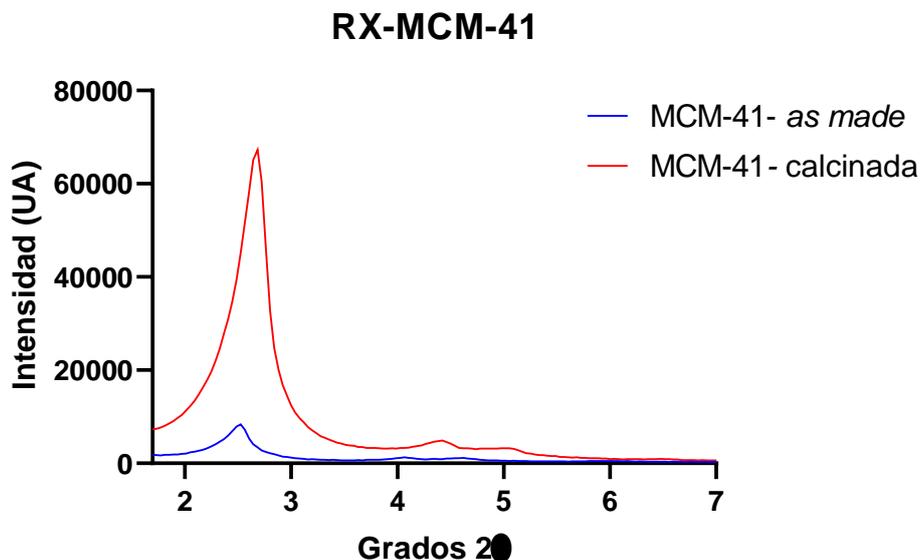


Figura 9: Difractograma de Rayos X de una muestra de MCM-41-as made y de MCM-41-Calcinada.

### Porosimetría

En el análisis de porosimetría se genera isoterma de adsorción y desorción (Figura 10). A partir de estos datos se calcula el área superficial específica de la MCM-41 que es de  $1180,70\text{m}^2/\text{g}$ , su volumen de poro de  $1,033\text{cm}^3/\text{g}$  y el tamaño de poro de  $2,86\text{nm}$ . Al comparar con los datos de MCM-41/Ru(bpy):  $590,21\text{m}^2/\text{g}$  de área superficial específica, su volumen de poro de  $0,104\text{cm}^3/\text{g}$  y el tamaño de poro de  $1,848\text{nm}$ , observamos cómo se ha reducido su porosidad, consecuencia de una carga exitosa del colorante en la nanopartícula.

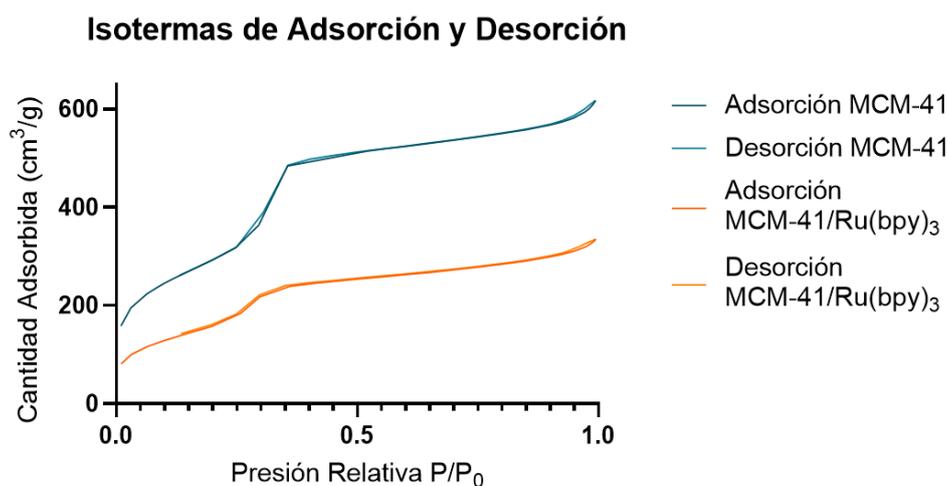


Figura 10: Isotermas de Adsorción y Desorción de gas nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) a  $77\text{K}$  de MCM-41 y MCM-41/Ru(bpy) $_3$  para estudiar la porosimetría de los materiales.

### 5.1.3 Análisis de la caracterización por TGA.

En la figura 11 se reflejan los datos del análisis termogravimétrico. En esta técnica, se puede apreciar tres principales saltos en cuanto a la pérdida de masa. El primero de estos saltos (25°C-120°C) corresponde a la pérdida de masa por adsorción de diferentes disolventes, en el segundo de los descensos (120°C-600°C) se pierde la materia orgánica y en el último de los saltos (600°C-1000°C) los grupos silanoles de la partícula.

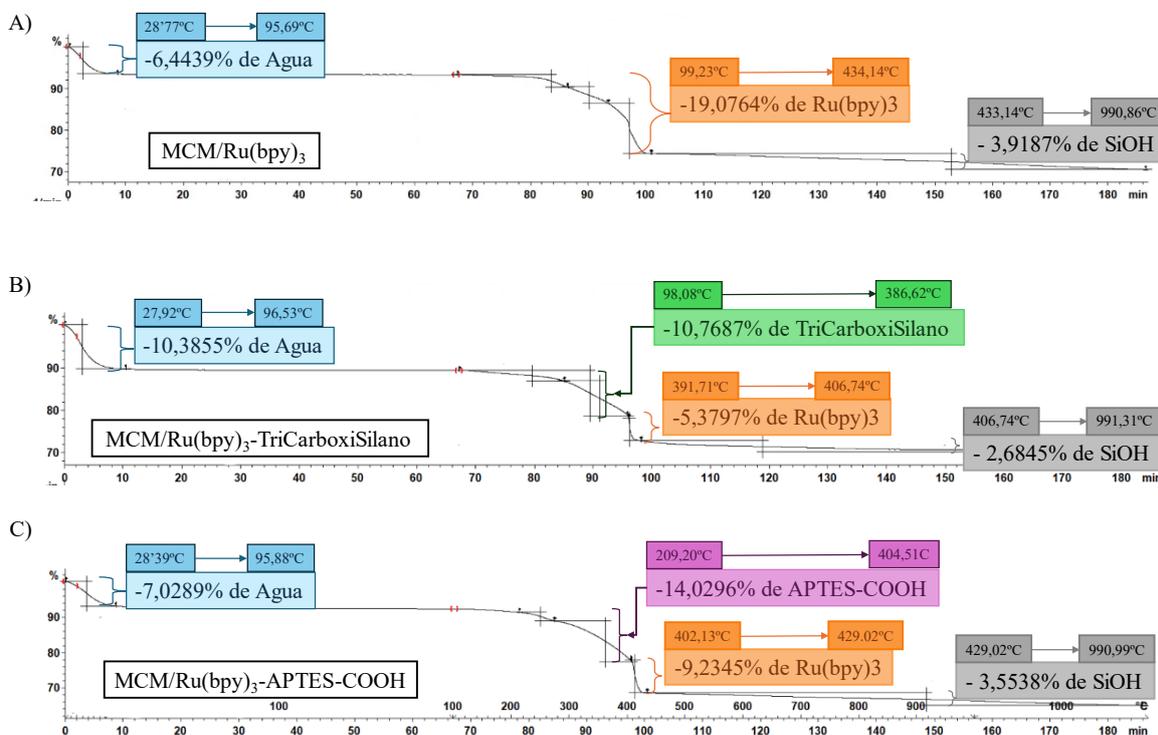


Figura 11: Resultado del análisis termogravimétrico de A) MCM41/Ru(bpy)<sub>3</sub> B) MCM41/Ru(bpy)<sub>3</sub>- tricarboxisilano y C) MCM-41/ Ru(bpy)<sub>3</sub>- APTES-COOH

En la figura 11A se aprecia una reducción de aproximadamente el 19% en el segundo descenso (99,33°C a 434,14 °C), correspondiente a moléculas orgánicas y por tanto indicaría que, en la muestra inicial, de nanomaterial con colorante, se había cargado en torno a 0,35mmol de colorante por cada gramo de material. El cargado se realiza a una razón de 0,8mmol/gMCM-41 por lo que se ve como sí que se ha podido internalizar parte de este colorante a la estructura del material.

En las figuras 11B y 11C, las pérdidas de materia correspondientes a la eliminación de la materia orgánica no se pueden atribuir en su totalidad al colorante: la primera reducción corresponde a la pérdida de los grupos de enlace (98,08°C a 386,62 en MCM41/Ru(bpy)<sub>3</sub>-tricarboxisilano y 209,20°C a 404,51°C en MCM-41/Ru(bpy)<sub>3</sub>-APTES-COOH) con una temperatura de evaporación menor al Ru(bpy)<sub>3</sub> al que corresponde por tanto le corresponde la segunda parte de la reducción de materia orgánica (391,71°C a 406,74°C en MCM41/Ru(bpy)<sub>3</sub>-tricarboxisilano y 402,13°C a 429,02°C en MCM-41/ Ru(bpy)<sub>3</sub>- APTES-COOH).

Así pues, en cuanto al colorante en las figuras 11B y 11C, se observa una menor cantidad de Ru(bpy)<sub>3</sub> (0,098 y 0,17mmol/g respectivamente) resultado de los procesos de reacción donde se pierde parte de material. Esto no es un problema ya que la cantidad de colorante remanente se ha demostrado suficiente en el resto de las pruebas.

Finalmente, en cuanto a la cantidad de moléculas funcionalizadas en los materiales, se observa cómo la cantidad de APTES-COOH que se ha retenido (0,75mmol/g) es mayor que en el caso de la síntesis con el tricarboxisilano (0,36mmol/g). (Tabla 2)

Tabla 2: Composición de las nanopartículas medidas por la técnica de TGA (mmol/g de sólido)

Nanopartícula	Ru(bpy) <sub>3</sub>	Tricarboxisilano	APTES-COOH
MCM-41/Ru(bpy) <sub>3</sub>	0,35	----	----
MCM-41/Ru(bpy) <sub>3</sub> - Tricarboxisilano	0,098	0,36	----
MCM-41/ Ru(bpy) <sub>3</sub> - APTES-COOH	0,17	----	0,75

### 5.1.4 Análisis de los resultados obtenidos en Zetasizer

#### Potencial Z

Al analizar las representaciones de la figura 12, se observa que las medidas de MCM-41(C1) presentan una carga negativa en torno a -27,3mV, característico de los grupos silanoles, mientras que al realizar el cargado con el colorante (C2), se alcanza una fuerte carga positiva (28,7mV) por la adsorción del Ru(bpy)<sub>3</sub> en la superficie de la partícula, ambos resultados son comunes para ambos métodos.

En la figura 12A, se representan todas las muestras intermedias el proceso de APTES-COOH. En concreto las muestras A3, es la tomada al añadir APTES a la superficie de los silanoles de la MCM-41. Se aprecia una reducción de la carga, pero manteniendo la carga positiva (6,56mV) por el carácter básico de la amina terminal del componente. Al derivatizar y añadir grupos carboxilo (A4), se observa una clara reducción de la carga a valores negativos con media en -24,5mV. La adición de la cadena de *oligolinker* (A5) con una carga de -20,4mV y de la cadena de *oligosenser* (A6) con -26,6mV no parecen suponer en este caso un gran cambio en las cargas ya que también son moléculas cargadas negativamente por los fosfatos de su estructura, aunque si se aprecia una mayor carga negativa en la partícula completa.

En la figura 12B se sigue el proceso de síntesis y anclaje por el método del tricarboxisilano, tras las medidas comunes C1 y C2, se observa en S3 una fuerte reducción del potencial Z, hasta valores de -43,5mV, explicada por la gran densidad de carga que supone los tres grupos carboxilo por cada funcionalización del grupo silanol. En T4 (anclaje del *oligolinker*) y T5 (*oligosenser* hibridado) se da un comportamiento similar al de sus equivalentes en 12A (A5 y A6), con una moderación de la carga negativa cuando se añade el *oligolinker*, pero manteniendo una carga de -18,5mV que aumenta ligeramente hasta -25,4mV al realizar la hibridación con el segundo oligonucleótido.

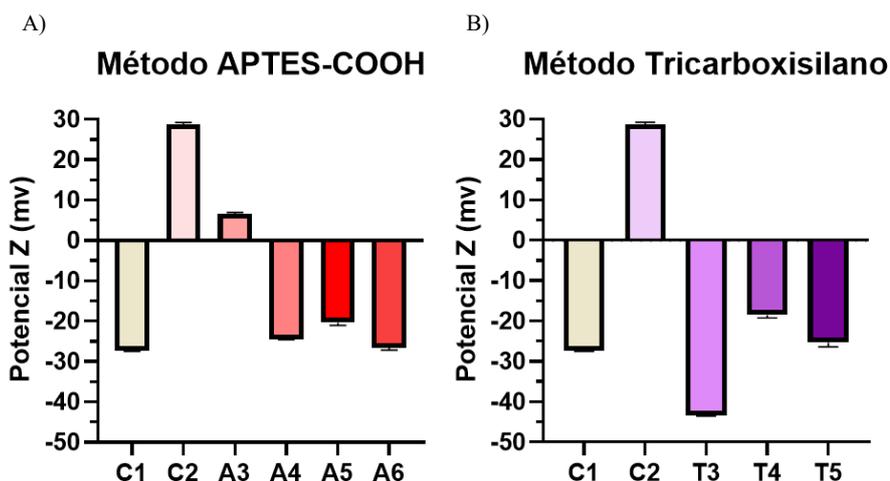


Figura 12: Resultados de las medidas de potencial Z en las muestras tomadas en el proceso de síntesis de dos métodos, siendo las dos primeras medidas C1: MCM-41 y C2 es MCM-41 cargada con  $Ru(bpy)_3$  comunes y el resto específicas de cada método: A) Medidas del proceso de síntesis por el método de APTES-COOH: A3 es el material tras el anclaje de APTES, A4 tras la derivatización a APTES-COOH, A5 con el oligolinker anclado y A6 con el oligosenser hibridado. B) Medidas de proceso de síntesis por el método tricarboxisilano: T3 es la partícula tras el anclaje de tricarboxisilano, T4 tras la unión de oligolinker y T5 tras la hibridación del oligosenser.

## DLS

El rango hidrodinámico medio de la MCM-41 (S1) es de  $150'4 \pm 2'9$  nm, mayor al su tamaño medido por microscopía de transmisión electrónica, valor lógico ya que el rango hidrodinámico incluye las moléculas de agua sobre las que genera un efecto la nanopartícula. Al realizar el cargado de la nanopartícula (S2), se aprecia cómo esta aumenta ligeramente su tamaño hasta  $177'6 \pm 3'066$  nm por la adsorción de  $Ru(bpy)_3$  a la superficie de la nanopartícula. Un nuevo salto de tamaño ocurre al anclar el oligonucleótido de unión (S3a) hasta alcanzar  $215'2 \pm 0'9$  nm en el caso del anclaje por el método de tricarboxisilano o el tamaño de  $212'6 \pm 5'3$  nm en caso del anclaje a través de aptes derivatizado (S3b). un valor muy similar que supone un aumento atribuible a una correcta unión del *oligolinker*. Finalmente, se observa un salto hasta los  $253'5 \pm 4'8$  nm en el caso de la nanopartícula con ambos nucleótidos: el *oligolinker* y el *oligosenser* (S4), lo cual es indicativo que la hibridación entre ambos ácidos nucleicos es exitosa, confirmando la síntesis adecuada de la puerta molecular. En la Figura 13A, se resumen estos aumentos de tamaño, que se ven reflejados también en la Figura 13B, donde se aprecia un desplazamiento a la derecha (mayor tamaño) de la curva de distribución de tamaños.

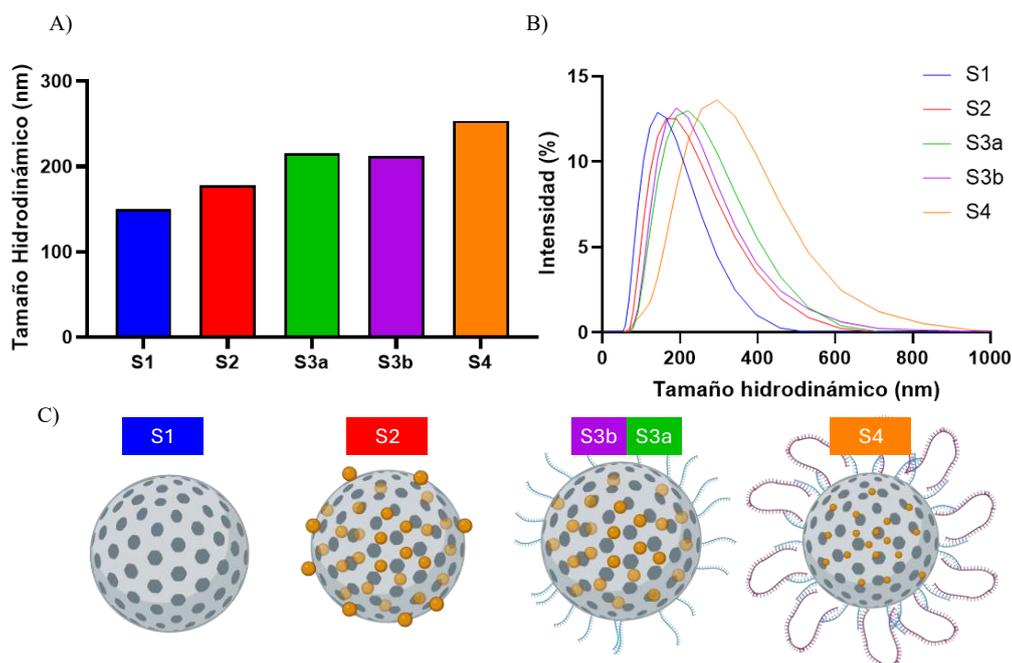


Figura 13 Resultados del análisis de partículas por DLS donde S1 es la MCM-41 sin modificar, S2 es la MCM-41 cargada con el colorante Ru(bpy)<sub>3</sub>, S3 es la partícula con el oligolinker anclado y S4 es la muestra con el oligosensor hibridado al oligolinker. A) Tamaño medio de las medidas B) Distribución del tamaño hidrodinámico en las diferentes muestras C) Esquema representativo de las muestras analizadas.

## 5.2 Resultados del análisis de estabilidad

### 5.2.1 Resultado de la cinética en disolución: selección de *oligosensor*

Tras analizar los datos de la cinética en disolución donde se compara las diferentes respuestas de los nanomateriales recubiertos con uno u otro oligonucleótido ante la presencia de su complementario, se hace manifiesta una clara diferencia en el comportamiento entre los materiales cerrados por los distintos oligonucleótidos, como se puede apreciar en la figura 14. Por una parte, se observa cómo el nanomaterial cerrado con el *oligosensor* gB genera una respuesta diferente si ha estado en contacto con su oligonucleótido complementario o si el nanomaterial que no lo ha estado, siendo la respuesta mayor en el caso de la presencia del analito y prácticamente nula en el blanco, al menos en los primeros 30 minutos, lo que reflejaría la estabilidad de la puerta molecular.

Sin embargo, por la otra parte, se ve como la puerta basada en el *oligolinker* pp65 no ha sido capaz de retener el colorante en su interior, lo cual arroja unos resultados de intensidad de fluorescencia en el sobrenadante de las alícuotas no distinguibles a lo largo de todo el experimento.

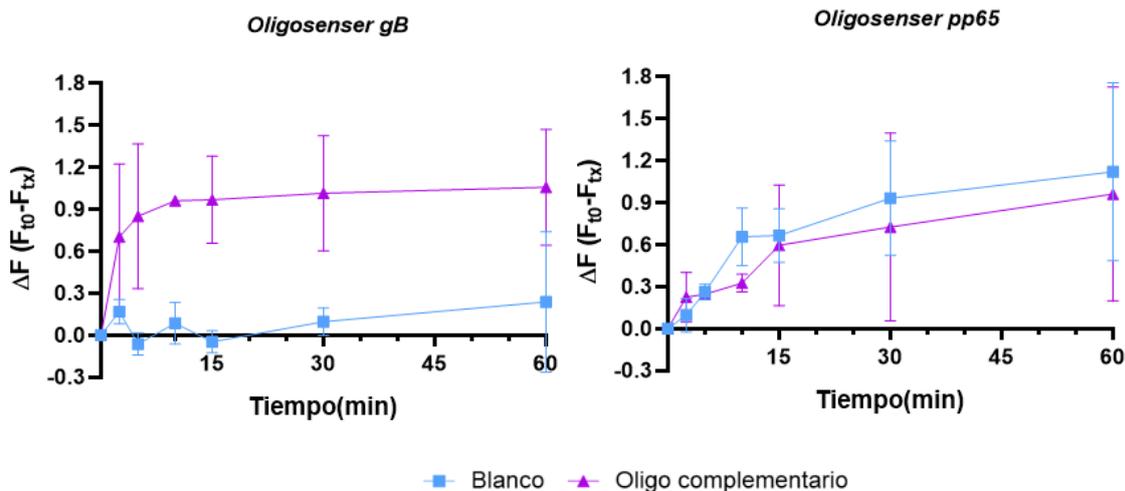


Figura 14: Cinéticas de liberación de  $Ru(bpy)_3$  de material anclado con oligosenser gB y pp65: en el eje X se representa el tiempo tras la inoculación del oligonucleótido complementario (morado) o agua (celeste) y en el eje Y el incremento de la intensidad de fluorescencia del sobrenadante obtenido tras centrifugar respecto a la medida inicial.

### 5.2.2 Resultado del ensayo en tiras para selección del método de anclaje de *Oligolinker*

Tras analizar las fotografías realizadas, se observa cómo tanto el material cuyo *oligolinker* ha sido anclado con el método de APTES derivatizado, como el anclado por el método del tricarboxisilano manifiestan diferencias significativas entre las señales positivas y las negativas (Figura 15).

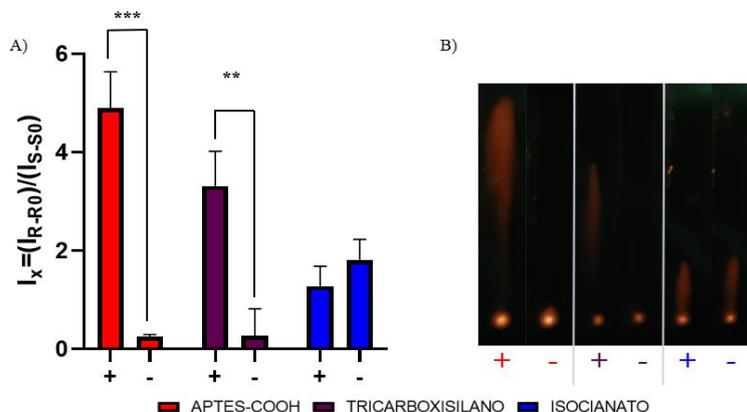


Figura 15: Estudio de estabilidad en tiras reactivas de GFC: A) Comparación entre la liberación del nanomaterial en tiras al ser impregnada por capilaridad con una solución con el oligonucleótido (+) y sin él (-), en tres métodos de anclaje distintos: método APTES-COOH(rojo), el método del isocianato (azul) y el método del tricarboxisilano(morado) B) Representación de fotografías empleadas para la medición del

Estas diferencias son aún más remarcables y significativas en el método de APTES derivatizado, donde se obtienen blancos de gran estabilidad y liberación en los positivos de alta intensidad. Por otra parte, en el caso de la unión por el método del isocianato, no se puede distinguir entre la respuesta generada en presencia de analito de aquella generada sin él, lo cual indica que no se ha obtenido la estabilidad necesaria para esta aplicación.

### 5.3 Resultados de la optimización de liberación en tiras

Los datos generados al hacer el estudio comparado entre la respuesta del material ante medio con el oligonucleótido complementario y medios sin oligonucleótidos permiten seleccionar el material GF/C para las tiras, el medio tamponado con TRIS+MgCl<sub>2</sub> (9,375mM, 5mM, pH 7'6) y seleccionar el tiempo 3min, todo con el objetivo de maximizar la respuesta generada por el material, ya que es esta combinación la que de una forma clara aporta mejores resultados, como se puede observar en la primera gráfica de la figura 16A. En cuanto al resto de resultados se puede observar cómo las liberaciones en tampón PBS (10mM) aportan resultados insatisfactorios por su incapacidad de retener el colorante en su interior, como también se puede observar en las imágenes de la figura 16B de las liberaciones en PBS, así como en el caso de tampón TRIS+MgCl<sub>2</sub> y **Fus5-BSA** (**Fus5-BSA** ha sido seleccionado como representante de los resultados de Fus5 pues en todos los casos ha generado resultados insatisfactorios, por tanto en pro de simplificar las figuras generadas se ha decidido omitir su análisis conjunto). En el caso de **GF/C-BSA** y **GFC-PEGS** se obtenía en tiempo 3 una mejor respuesta frente a blanco, pero no se obtenía la gran estabilidad que sí se hacía con tiras de **GF/C**.

En conclusión, el uso de tiras de **GF/C** y realizando la liberación con tampón TRIS+MgCl<sub>2</sub> obtenía unos resultados satisfactorios de estabilidad de las señales negativas, en todos los tiempos como se puede apreciar en la figura 16C. Sin embargo, la gran diferencia que aportaba la señal en tiempo 3, fue motivo para seleccionar esta combinación como la idónea para los siguientes ensayos.

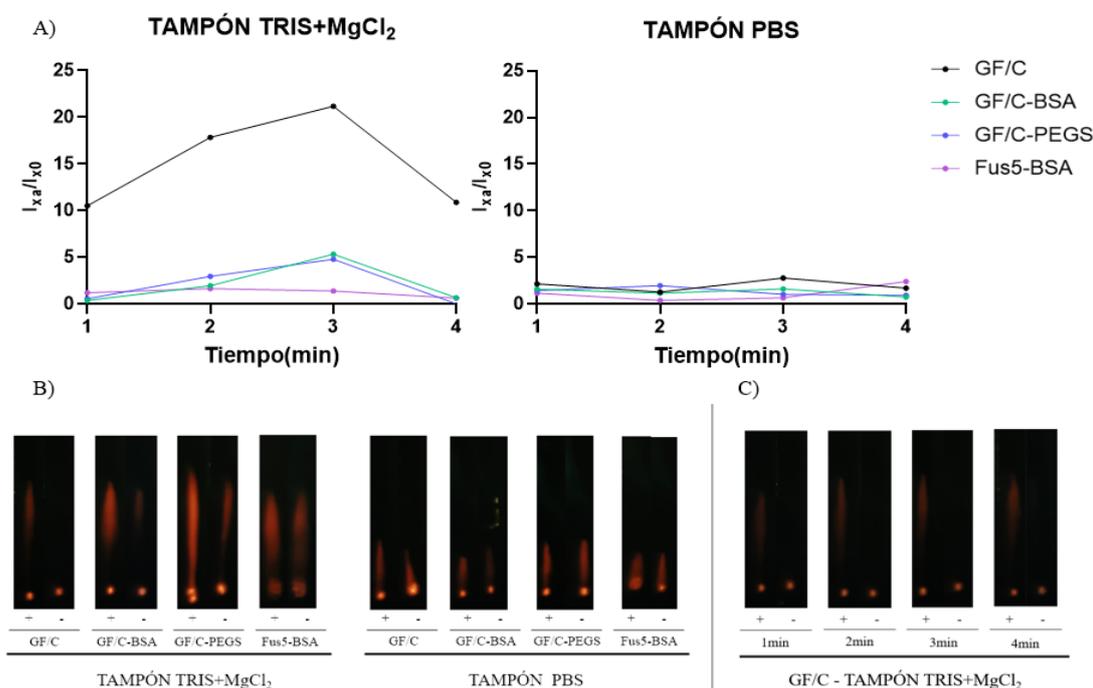


Figura 16: Resultados de la optimización en tiras A) Cociente entre el parámetro Ix de muestras con oligonucleótido sobre Ix del blanco en diferentes materiales de tiras y usando como medio dos tampones: Tampón Tris+MgCl<sub>2</sub> (9,375mM, 5mM, pH 7'6) o tampón PBS (10mM). B) Fotos de los estudios de liberación en tiras en las condiciones y materiales indicadas, tomadas en el tercer minuto C) Fotografías de la cinética del material sobre **GF/C** liberado con medio Tris+MgCl<sub>2</sub>.

## 5.4 Resultado del estudio del comportamiento del material

### 5.4.1 Curva de calibrado

Tras la medición de los valores de intensidad respecto del tiempo de elución, se realiza una curva de calibrado para estudiar la respuesta del sistema en función de la concentración de analito en el medio. El resultado es un comportamiento exponencial de la respuesta que sigue la curva  $I_x/I_{x0}=4,017\text{Ln}[\text{ANALITO}]+13,48$  con un  $R^2 = 0,8744$ , lo cual manifiesta la capacidad del material de generar una respuesta de intensidad dependiente de la dosis de analito (Figura 17). Además, con los valores obtenidos, debido a la elevada estabilidad de los blancos de la recta, se obtiene un LOD (límite de detección) inferior a 0,97nM, alcanzando pues una gran capacidad de detección. Para ello, los datos experimentales se ajustaron a una función logarítmica de tipo dosis-respuesta de 4 parámetros, típicamente utilizada en estos sistemas de detección.

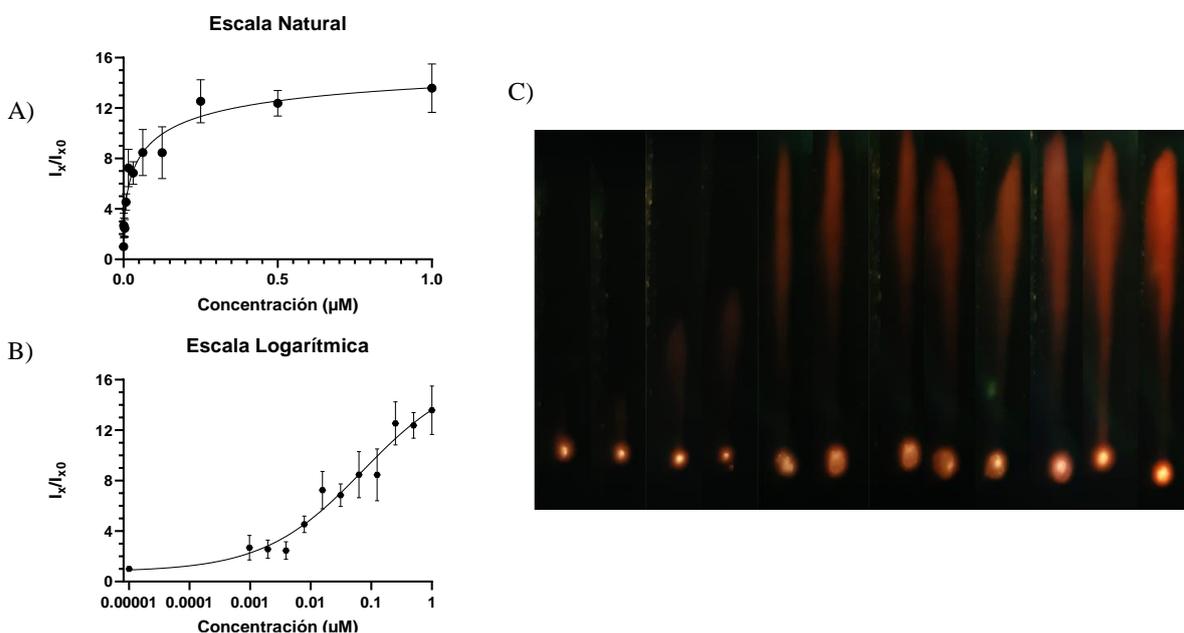


Figura 17: Curvas de calibrado de la relación entre la intensidad de la señal del analito sobre la intensidad de la señal liberada por la nanopartícula creada por el método APTES-COOH del blanco a los 3mins de elución. a) Escala natural b) Escala logarítmica c) Imágenes tomadas de la recta de calibrado, 0 $\mu\text{M}$  (izquierda) y acabando en 1 $\mu\text{M}$  (derecha).

### 5.4.2 Efecto de interferentes

Comparar las señales generadas por los pocillos con el oligonucleótido complementario al *oligosenser gB* al entrar en contacto con el nanomaterial con el ADN anclado por el método de APTES-COOH arroja resultados significativos en su comparación con el resto de las combinaciones y especialmente con el resultado del blanco. Sin embargo, al realizar un análisis ANOVA entre la señal del blanco y la señal producida por los interferentes no señala la existencia de una interferencia entre las cadenas testadas y el control negativo. Con estos resultados (Figura 18), se asegura la capacidad del nanomaterial de discernir entre diferentes cadenas nucleotídicas y la cadena específica a detectar.

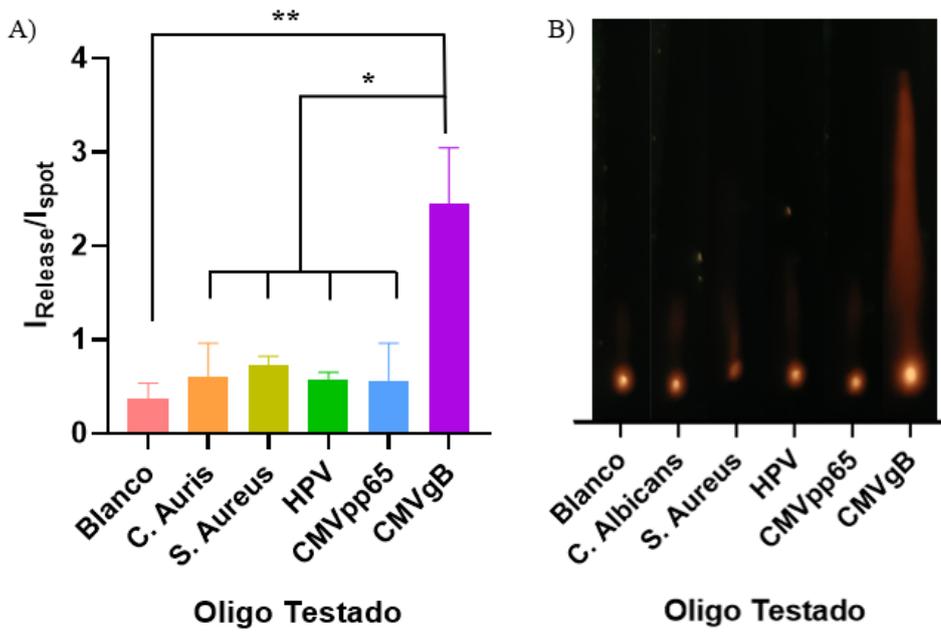


Figura 18: Resultado del análisis de interferentes. A) Representación de la señal generada por diversas condiciones. B) Se representa un ejemplo de fotografía de cada análisis realizado.

## 5. CONCLUSIONES

A lo largo del trabajo, se ha desarrollado un material que es capaz de identificar una secuencia nucleotídica específica con una gran sensibilidad a la vez que aportaba una alta estabilidad a la hora de cerrar la puerta molecular en ausencia de dicha secuencia.

Tras un proceso de optimización de las condiciones de liberación se ha obtenido un resultado que es capaz de generar una respuesta que se relaciona con la concentración de analito presente en una muestra, abriendo la posibilidad de llevar a cabo estimaciones de la concentración de analito, posibilitando en un futuro su capacidad de no sólo detectar la presencia de Citomegalovirus, sino también de estimar la carga viral.

Además, se ha comprobado que otras secuencias nucleotídicas no son capaces de abrir la puerta molecular que retiene el colorante dentro.

Así pues, supone una gran oportunidad en la continuación del desarrollo de una plataforma para el testeo y cribado masivo para la detección de este virus en recién nacidos con el objetivo final de llegar a detecciones tempranas de la infección y tener la oportunidad de reducir los efectos adversos sobre la audición.

No obstante, se trata de un proyecto que ha de seguir testándose para analizar cuál es el efecto de otros posibles interferentes no nucleotídicos propios de muestras humanas y determinar el mejor fluido (orina, saliva, etc.) para llevar a cabo la detección y una vez estandarizado llevar a cabo el dimensionado para su producción a gran escala y poder así generalizar su uso clínico.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Ahmadpour, H., & Hosseini, S. M. M. (2019). A solid-phase luminescence sensor based on molecularly imprinted polymer-CdSeS/ZnS quantum dots for selective extraction and detection of sulfasalazine in biological samples. *Talanta*, 194, 534-541. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.053>

Álvarez, J. C. D., Avelar, C. M., & Almaguer, D. M. (2020). El papel de la nanociencia y la nanotecnología en el marco de la pandemia de COVID-19. *Mundo Nano*, 14(27), 1e-29e. <https://doi.org/10.22201/ceich.24485691e.2021.27.69647>

Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 25(1), 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>

Caballos, I., Aranda, M. N., López-Palacios, A., Pla, L., Santiago-Felipe, S., Hernández-Montoto, A., Tormo-Mas, M. Á., Pemán, J., Gómez-Ruiz, M. D., Calabuig, E., Sánchez-Sendra, B., Francés-Gómez, C., Geller, R., Aznar, E., & Martínez-Máñez, R. (2023). Aptamer-Capped Nanoporous Anodic Alumina for SARS-CoV-2 Spike Protein Detection. *Advanced Materials Technologies*, 8(11). <https://doi.org/10.1002/admt.202201913>

Cheng, Z., Li, M., Dey, R., & Chen, Y. (2021). Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives. *Journal Of Hematology & Oncology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01096-0>

Climent, E., Biyikal, M., Gröninger, D., Weller, M. G., Martínez-Máñez, R., & Rurack, K. (2020). Multiplexed Detection of Analytes on Single Test Strips with Antibody-Gated Indicator-Releasing Mesoporous Nanoparticles. *Angewandte Chemie*, 59(52), 23862-23869. <https://doi.org/10.1002/anie.202009000>

Climent, E., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Marcos, M. D., Soto, J., Maquieira, A., & Amorós, P. (2010). Controlled delivery using Oligonucleotide-Capped mesoporous silica nanoparticles. *Angewandte Chemie*, 49(40), 7281-7283. <https://doi.org/10.1002/anie.201001847>

Climent, E., Mondragón, L., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Marcos, M. D., Murguía, J. R., Amorós, P., Rurack, K., & Pérez-Payá, E. (2013b). Selective, Highly Sensitive, and Rapid Detection of Genomic DNA by Using Gated Materials: Mycoplasma Detection. *Angewandte Chemie*, 52(34), 8938-8942. <https://doi.org/10.1002/anie.201302954>

Climent, E., & Rurack, K. (2021). Combining Electrochemiluminescence Detection with Aptamer-Gated Indicator Releasing Mesoporous Nanoparticles Enables ppt Sensitivity for Strip-Based Rapid Tests. *Angewandte Chemie*, 60(50), 26287-26297. <https://doi.org/10.1002/anie.202110744>

Franco, Y. L., Vaidya, T. R., & Ait-Oudhia, S. (2018). Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer*, Volume 10, 131-141. <https://doi.org/10.2147/bctt.s170239>

Garrido, E., Alfonso, M., De Greñu, B. D., Marcos, M. D., Costero, A. M., Gil, S., Sancenón, F., & Martínez-Máñez, R. (2020). A Sensitive Nanosensor for the In Situ Detection of the Cannibal Drug. *ACS Sensors*, 5(9), 2966-2972. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01553>

- Garrido-Cano, I., Pla, L., Santiago-Felipe, S., Simón, S., Ortega, B., Bermejo, B., Lluch, A., Cejalvo, J. M., Eroles, P., & Martínez-Máñez, R. (2021). Nanoporous Anodic Alumina-Based Sensor for miR-99a-5p Detection as an Effective Early Breast Cancer Diagnostic Tool. *ACS Sensors*, 6(3), 1022-1029. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c02222>
- Gámez, S. S., Ruiz, M. P., & Marí, J. M. N. (2014). Infección por citomegalovirus humano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32, 15-22. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(14\)70145-4](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(14)70145-4)
- Gkrania-Klotsas, E., Langenberg, C., Sharp, S. J., Luben, R., Khaw, K., & Wareham, N. J. (2013). Seropositivity and Higher Immunoglobulin G Antibody Levels Against Cytomegalovirus Are Associated With Mortality in the Population-Based European Prospective Investigation of Cancer–Norfolk Cohort. *Clinical Infectious Diseases/Clinical Infectious Diseases (Online. University Of Chicago. Press)*, 56(10), 1421-1427. <https://doi.org/10.1093/cid/cit083>
- Griffiths, P. (2009). Cytomegalovirus. En *Principles and Practice of Clinical Virology* (pp. 161-197). <https://doi.org/10.1002/9780470741405.ch8>
- Griffiths, P., Baraniak, I., & Reeves, M. (2014). The pathogenesis of human cytomegalovirus. *Journal Of Pathology*, 235(2), 288-297. <https://doi.org/10.1002/path.4437>
- Griffiths, P., Grundy, J., Ali, A., Sweny, P., Trompeter, R., Fernando, O., & Moorhead, J. (1988). CYTOMEGALOVIRUS MATCHING IN RENAL TRANSPLANTATION. *Lancet*, 332(8617), 971. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)92645-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)92645-1)
- Insst. (s. f.). Herpesvirus humano 5 beta (citomegalovirus). Portal INSST. <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/virus/herpesvirus-humano-5-beta-citomegalovirus>
- Navas, R. C., & García, J. C. (2011). Infección congénita por citomegalovirus: la gran desconocida. *SEMERGEN. Sociedad Española de Medicina Rural y Generalista*, 37(10), 549-553. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2011.08.005>
- Parra, M., Gil, S., Gaviña, P., & Costero, A. M. (2021). Mesoporous Silica Nanoparticles in Chemical Detection: From Small Species to Large Bio-Molecules. *Sensors*, 22(1), 261. <https://doi.org/10.3390/s22010261>
- Racero, I. T., Gómez, N. C., Leal, C. R., & Tinoco, E. L. (2014). Infecciones por el virus de Epstein-Barr y citomegalovirus. *Medicine*, 11(50), 2954-2964. [https://doi.org/10.1016/s0304-5412\(14\)70722-x](https://doi.org/10.1016/s0304-5412(14)70722-x)
- Ryan, P. J., Davis, M. A., DeGaeta, L. R., Woda, B., & Melchior, D. L. (1984). Liposomes loaded with contrast material for image enhancement in computed tomography. *Work in progress. Radiology*, 152(3), 759-762. <https://doi.org/10.1148/radiology.152.3.6611564>
- Stagno, S., Pass, R. F., Dworsky, M. E., Henderson, R. E., Moore, E. G., Walton, P. D., & Alford, C. A. (1982). Congenital cytomegalovirus infection. *New England Journal Of Medicine* / *The New England Journal Of Medicine*, 306(16), 945-949. <https://doi.org/10.1056/nejm198204223061601>
- Swanson, E. C., & Schleiss, M. R. (2013). Congenital cytomegalovirus infection. *Pediatric Clinics Of North America* / *The Pediatric Clinics Of North America*, 60(2), 335-349. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.12.008>

Valdez, J., Bawage, S., Gomez, I., & Singh, S. R. (2016). Facile and rapid detection of respiratory syncytial virus using metallic nanoparticles. *Journal Of Nanobiotechnology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0167-z>

Villani, E., Sakanoue, K., Einaga, Y., Inagi, S., & Fiorani, A. (2022). Photophysics and electrochemistry of ruthenium complexes for electrogenerated chemiluminescence. *Journal Of Electroanalytical Chemistry*, 921, 116677. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116677>

Zarama Ortiz, Á. M. (2014). Efecto de la infección del citomegalovirus sobre receptores SLAM en macrófagos murinos. En TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). [http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/96702/1/AMZO\\_TESIS.pdf](http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/96702/1/AMZO_TESIS.pdf)

## 7. ANEXO I: RELACIÓN DEL TRABAJO CON LA AGENDA 2030 PARA LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE.

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS):

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. <b>Fin de la pobreza.</b>				X
ODS 2. <b>Hambre cero.</b>				X
ODS 3. <b>Salud y bienestar.</b>	X			
ODS 4. <b>Educación de calidad.</b>				X
ODS 5. <b>Igualdad de género.</b>				X
ODS 6. <b>Agua limpia y saneamiento.</b>				X
ODS 7. <b>Energía asequible y no contaminante.</b>				X
ODS 8. <b>Trabajo decente y crecimiento económico.</b>				X
ODS 9. <b>Industria, innovación e infraestructuras.</b>		X		
ODS 10. <b>Reducción de las desigualdades.</b>		X		
ODS 11. <b>Ciudades y comunidades sostenibles.</b>				X
ODS 12. <b>Producción y consumo responsables.</b>				X
ODS 13. <b>Acción por el clima.</b>				X
ODS 14. <b>Vida submarina.</b>				X
ODS 15. <b>Vida de ecosistemas terrestres.</b>				X
ODS 16. <b>Paz, justicia e instituciones sólidas.</b>				X
ODS 17. <b>Alianzas para lograr objetivos.</b>				X

Descripción de la alineación del TFG/M con los ODS con un grado de relación más alto:

El presente trabajo aspira a desarrollar una plataforma de detección de un virus que tiene una alta prevalencia, por lo que contribuirá de forma directa en el desarrollo del Objetivo 3) Salud y Bienestar puesto que una detección barata, rápida y precisa permitirá poder hacer cribados universales que reduzcan, principalmente, las consecuencias a nivel auditivo en aquellas infecciones de carácter congénito.

Además, al tratarse de una enfermedad con una prevalencia mayor en países en desarrollo, esta herramienta puede suponer un avance en aquellos países al reducir las consecuencias sociales y económicas que pueda ocasionar esta infección, contribuyendo al Objetivo 10) Reducción de las desigualdades.

Finalmente, la posibilidad futura de desarrollar este material a gran escala para su venta y puesta en uso generalizada, lo relaciona directamente con el Objetivo 9) de Industria, Innovación e Infraestructuras.