



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

## **MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

### **Trabajo Fin de Máster**

#### **Detección precoz de infecciones en recién nacidos mediante el empleo de nanopartículas y sistemas de amplificación de la señal**

*“Early detection of infections in newborns through the use of nanoparticles and signal amplification systems”*

**SAMUEL PÁEZ GIL**

**Oviedo, 07, 2023**

# RESUMEN

Una de las principales causas de muerte de neonatos y recién nacidos son las infecciones denominadas sepsis de transmisión vertical. Actualmente, se considera un problema grave de salud pública, ya que los resultados se obtienen tras la realización de hemocultivos, los cuales tardan entre 48-72 horas en obtener un resultado y, por lo tanto, se consideran métodos no suficientemente rápidos. Mientras se obtiene dicho resultado, el recién nacido es ingresado en UCI neonatal donde se le administra un tratamiento con antibiótico, además de la separación de la madre, con los consiguientes riesgos que poseen estas acciones en un recién nacido.

Actualmente, se están desarrollando alternativas para la determinación precoz de este tipo de infecciones, para evitar así la administración innecesaria de antibióticos a niños que no lo necesiten. Las metodologías alternativas buscan la sensibilidad y selectividad frente al patógeno que provoca la infección, buscando sobre todo fiabilidad y rapidez, es decir, la obtención de resultados en un tiempo relativamente corto y evitando falsos positivos.

Por ello se lleva a cabo este Trabajo Fin de Máster, en el cual se expone y se lleva a cabo una metodología analítica que tiene la capacidad de detectar la presencia o ausencia del material genético de las bacterias que causan dicha infección, obteniéndose un resultado fiable en un periodo de tiempo breve, del orden de horas, proporcionando un resultado visual fácil de entender.

Para dicho objetivo, se emplean nanopartículas de oro (AuNPs) que dependiendo de si se encuentran agregadas o no, la señal colorimétrica es diferente. Las AuNPs se combinan con enzimas de ácido nucleico multicomponente (MNAzymes) para detectar el material genético de interés de la región constante de la bacteria ("*target*"). Con objeto de obtener una mayor sensibilidad, se utilizan medidas de los parámetros de descomposición de colores mediante técnicas como RGB.

**Palabras clave:** sepsis de transmisión vertical, AuNPs, MNAzymes, RGB.

## ABSTRACT

One of the main causes of death of neonates and newborns are infections called vertically transmitted sepsis. Currently, it is considered a serious public health problem, since the results are obtained after performing blood cultures, which take between 48-72 hours to obtain a result, which methods are considered not fast enough. While this result is obtained, the newborn is admitted to the neonatal ICU where an antiseptic treatment is administered, in addition to separation from the mother, with the consequent risks that these actions pose in a newborn.

Currently, alternatives are being developed for the early detection of this type of infection, in order to avoid the necessary administration of antibiotics to children who do not need it. Alternative methodologies seek sensitivity and selectivity against the pathogen that causes the infection, seeking above all reliability and speed, that is, obtaining results in a relatively short time and avoiding false positives.

For this reason, this Master's Thesis is carried out, in which an analytical methodology is exposed and carried out that has the capacity to detect the presence or absence of the genetic material of the bacteria that cause said infection, obtaining a reliable result in a short period of time, in the order of hours, requires an easy-to-understand visual result.

For this purpose, gold nanoparticles (AuNPs) are used which, depending on whether they are aggregated or not, the colorimetric signal is different. AuNPs are combined with multicomponent nucleic acid enzymes (MNAzymes) to detect genetic material of interest from the constant region of the bacterium ("target"). In order to obtain greater sensitivity, measurements of the color degradation parameters are used using techniques such as RGB.

**Key Words:** Vertically transmitted sepsis, AuNPs, MNAzymes, RGB.

## TABLA DE ABREVIATURAS

A continuación, se representan las diferentes abreviaturas adoptadas en este trabajo fin de máster:

Abreviatura	Significado
AuNP	Nanopartícula de oro
MNAzyme	Enzima de ácido nucleico multicomponente
ADN	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
DLS	Dispersión dinámica de la luz
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
HUCA	Hospital Universitario Central de Asturias
UV-Vis	Visible Ultravioleta
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
SPR	Resonancia de plasmón de superficie
RGB	Rojo, Verde y Azul
R	Rojo
G	Verde
B	Azul
PDI	Índice de polidispersividad
Agg	Cadena de Agregación de ADN
TLC	Cromatografía de capa fina

# Índice

<b>RESUMEN</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>TABLA DE ABREVIATURAS</b> .....	IV
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Infecciones neonatales y sepsis neonatal. ....	1
1.2. Utilización de MNAszymes como método de detección. ....	5
1.3. Nanotecnología en Química Analítica. ....	7
1.3.1 Clasificación de los Nanomateriales y Nanopartículas. ....	8
1.4. Nanopartículas de Oro y su estrategia de detección colorimétrica. ....	10
1.5. Bioconjugación y estrategia de detección. ....	11
1.6. Análisis cuantitativo mediante el estudio colorimétrico (RGB). ....	12
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3. MATERIALES, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN</b> .....	15
3.1. Materiales y Reactivos. ....	15
3.1.1. Síntesis de Nanopartículas de Oro de 15 nm (AuNPs) por el método de Turkevich. ....	15
3.1.2. Adsorción de diferentes ratios de ADN-SH en AuNPs de 15 nm. ....	15
3.1.3. Adsorción 200:1 AuNPs-ADN (2 sets diferentes). ....	15
3.1.4. Optimizaciones y ensayo. ....	15
3.2. Instrumentación. ....	16
<b>4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b> .....	18
4.1. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) de 15 nm. ....	18
4.2. Adsorción de diferentes relaciones molares de ADN-SH, para su optimización, en semillas de AuNPs de 15 nm: método ácido. ....	18
4.3. Bioconjugación con la relación molar ADN : AuNPs 200:1. ....	19
4.4. Optimizaciones para la realización de ensayo de estudio. ....	20
4.4.1. Optimización de la concentración de ADN " <i>linker</i> " en presencia de ADN " <i>target</i> ". ....	20
4.4.2. Optimización de la concentración de MgCl <sub>2</sub> en presencia de ADN " <i>target</i> ". ....	21
4.4.3. Optimización de la concentración de MNAszyme en presencia de ADN " <i>target</i> ". ....	21
4.4.4. Optimización del tiempo y temperatura en presencia de ADN " <i>target</i> ". ....	22

<b>5. RESULTADOS</b>	23
5.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro de 15 nm (AuNPs).	23
5.2. Bioconjugación de las AuNPs con las diferentes relaciones molares de ADN (Agg1 y Agg2).	25
5.3. Diseño y optimización de las condiciones experimentales del ensayo de estudio.	28
5.3.1. Optimización de la concentración de ADN " <i>linker</i> ".	31
5.3.2. Optimización de la concentración de MgCl <sub>2</sub> .	33
5.3.3. Optimización de la concentración de MNAzyme.	34
5.3.4. Optimización del tiempo de reacción (1ª etapa) y temperatura de incubación.	35
5.4. Evaluación de los resultados mediante análisis de parámetros RGB.	36
<b>6. CONCLUSIONES</b>	43
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	45

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Infecciones neonatales y sepsis neonatal.

Las infecciones neonatales son consideradas actualmente uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo, puesto que su incidencia se encuentra en torno al 1% en los países industrializados, pero dicho porcentaje aumenta en los países en desarrollo <sup>[1]</sup>.

La gran mayoría de dichas infecciones son causadas por microorganismos, en concreto, por bacterias, hongos y virus.

Una de las principales infecciones en recién nacidos es la sepsis neonatal, la cual posee una incidencia de 1 por cada 1000 nacidos vivos, aunque la tasa de mortalidad se eleva a un 20% en el caso de los nacidos prematuramente <sup>[2]</sup>.

Se denomina sepsis neonatal al síndrome clínico provocado por la invasión del torrente sanguíneo de microorganismos, que se caracteriza por padecer signos y síntomas de infección sistémica <sup>[3]</sup>.

La sepsis neonatal se puede clasificar siguiendo un criterio cronológico en dos categorías:

- **Sepsis de aparición temprana**, es aquella que normalmente aparece en los primeros tres días de vida.
- **Sepsis de aparición tardía**, la cual, a diferencia de la sepsis de aparición temprana, aparece tras los tres primeros días de vida y cursa con septicemia y neumonía.

Dicha clasificación es inespecífica y carece de validez, puesto que no tienen por qué aparecer todos los síntomas y signos relacionados con la septicemia en las primeras 72 horas (en el caso de la sepsis de aparición temprana) y, por lo tanto, dicha clasificación se encontraría obsoleta.

La clasificación más utilizada sería en función del mecanismo de transmisión, obteniendo dos tipos de infecciones <sup>[3]</sup>:

- **Sepsis de transmisión nosocomial.**
- **Sepsis de transmisión vertical.**

Las sepsis de transmisión nosocomial son producidas por microorganismos que se encuentran presentes en el entorno hospitalario, provocando la colonización del recién nacido por contacto con el personal sanitario. Existen protocolos para evitar este tipo de infecciones, pudiendo evitarse con una correcta esterilización del material de trabajo, como de una correcta limpieza de manos e higiene personal [3].

Mientras tanto, las sepsis de transmisión vertical son causadas por agentes microbianos que se encuentran localizados en el canal vaginal materno, produciéndose el contagio por vía ascendente antes o durante el parto, o por contacto directo en el momento del parto [3].

Esta sepsis de transmisión vertical es causada, principalmente por bacterias, siendo las más comunes los estreptococos beta-hemolíticos del grupo B (EGB) y *Escherichia Coli* (E. Coli), que son los microorganismos que con mayor frecuencia se encuentran aislados en el recto y vagina materna. Existen otros tipos de bacterias menos frecuentes que merecen una mención en dicho trabajo, como son en primer lugar entre los gram-positivos *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes* y, entre los gram-negativos se destaca *Klebsiella* y *Enterobacterias* [3].

Los principales factores de riesgo a la hora de contraer dicha infección serían los siguientes:

- I. La presencia de microorganismos patógenos en el canal genital materno (factor directo).
- II. Parto prematuro (factor indirecto).
- III. La rotura prematura prolongada de membranas, antes de las 24 horas (factor indirecto).
- IV. La presencia de corioamnionitis (factor indirecto), que puede sospecharse por la presencia de síntomas como fiebre materna, dolor abdominal bajo y líquido amniótico de olor desagradable.

Las manifestaciones clínicas son muy variadas e inespecíficas, sobre todo para los recién nacidos, que pueden permanecer inicialmente asintomáticos. Los síntomas más comunes cursarían con cuadros de apnea y dificultad respiratoria, vómitos, diarreas, apatía, irritabilidad y taquicardias entre otros [3].

Para la prevención de dicho cuadro clínico, se administra un tratamiento con antibióticos (ampicilina y gentamicina) ante la sospecha de la presencia de sepsis de transmisión vertical. La confirmación se obtiene mediante un hemocultivo, el cual es necesario para la continuación o la finalización del tratamiento con antibiótico [3].

Es necesaria la actuación rápida por parte del equipo hospitalario para garantizar buenos resultados en el proceso de recuperación. Este es el principal motivo por el que se inoculan dichos antibióticos antes de obtener la confirmación de dicha infección.

El principal inconveniente del uso de antibióticos, es la cantidad de efectos secundarios que poseen, como el aumento de resistencia bacteriana, alteraciones en el microbioma, e incluso alergias y enfermedades gastrointestinales. En los peores de los casos puede llegar a producir enterocolitis necrotizante e incluso la muerte del recién nacido [4].

Existen diferentes métodos para la identificación de la infección, entre los que se destacan el estudio de diferentes pruebas clínicas, cuyos resultados generan un método que ayudan a la detección de infecciones, pero no es decisivo. Dichas pruebas están conformadas por el recuento de diferentes componentes, como son los leucocitos, neutrófilos, neutrófilos inmaduros, la velocidad de sedimentación de los microeritrocitos y los niveles de proteína C reactiva [4].

El método oficial y rutinario consiste en la realización de un hemocultivo, debiéndose realizarse en todos los casos de sospecha de sepsis. Un hemocultivo positivo con sensibilidad al microorganismo aislado es fundamental para obtener una guía para la terapia microbiana. La principal desventaja de los hemocultivos es que se trata de un método lento, puesto que se tardan unas 72 horas en conocer el resultado tras el cultivo de dicha muestra de sangre del recién nacido [4].

Hoy en día, es posible el crecimiento bacteriano en 12-24 horas mediante el uso de técnicas de cultivo mejoradas, como las técnicas BACTEC y BACT/ALERT. Estas técnicas serían capaces de obtener una sensibilidad realmente buena en concentraciones de 1-2 Ufc/mL (unidades formadoras de colonias/ mL) [4].

También es útil para el diagnóstico de estas infecciones la extracción de líquido cefalorraquídeo mediante la punción lumbar, para el estudio de meningitis, que en muchos casos va unida a la septicemia <sup>[4]</sup>.

Por último, aunque con un bajo rendimiento, estarían los métodos de cultivo de orina. En la práctica, dicho método es descartado porque los procedimientos de obtención de muestra son dolorosos y el rendimiento es pobre, por lo que no se recomiendan los urocultivos en recién nacidos con septicemia. A pesar de ello, los recién nacidos con riesgo de sepsis deben ser sometidos un examen urinario para así descartar una infección de vejiga y riñones <sup>[4]</sup>.

El principal problema asociado a los métodos de detección previamente presentados sería la presencia de un alto porcentaje de falsos negativos y a la respuesta inespecífica de muchos de ellos, siendo el más fiable y utilizado la realización de un hemocultivo. Por ello, un número muy alto de recién nacidos son ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCI), que realmente son negativos en sepsis y que son tratados con terapia terapéutica preventiva. Además, esto conlleva la separación de la madre y su posible riesgo de pérdida de lactancia.

Aquí radica el principal problema sobre el que se centra este trabajo, puesto que el tratamiento con antibióticos de recién nacidos que carecen de dicha infección, acarrea efectos secundarios, como los mencionados anteriormente.

El principal objetivo de este trabajo es el desarrollo de un método sensible, específico y, sobre todo rápido, para así evitar el tratamiento innecesario de recién nacidos. El método se basa en el desarrollo de un sensor óptico, en el que mediante un cambio de color se pueda apreciar si la muestra es positiva o negativa al detectar el microorganismo específico. Se emplean nanopartículas de oro (AuNPs) bioconjugadas con una hebra complementaria a la de interés y, mediante la utilización de enzimas nucleicas multicomponentes (MNAzymes) se podrá detectar el ácido nucleico de interés.

## 1.2. Utilización de MNAzymes como método de detección.

Actualmente existe una gran demanda de biosensores para la detección de hebras de ADN de patógenos, debido a su especificidad a la hora de detectar una determinada secuencia. Se trata de un campo en estudio que, en la actualidad, se encuentra en pleno auge.

A pesar de ello, la técnica más común y más utilizada para el estudio de hebras de ADN es la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), la cual no se englobaría dentro de las técnicas de biosensores. Esta técnica incluiría un paso de amplificación de la señal enzimática para así lograr una detección altamente específica y selectiva. Sin embargo, la utilización de este tipo de técnica requiere un equipo costoso y personal cualificado para su utilización e interpretación de los resultados obtenidos. Por ello, existe la necesidad de seguir desarrollando métodos de detección de ADN más simples y menos costosos [5].

El método desarrollado se basa en la utilización de un MNAzyme, es decir, un sistema multicomponente compuesto por una secuencia de ADN que reconoce a la secuencia complementaria (la secuencia de interés), actúan como enzima, tal y como se observa en la Figura 1 [6].

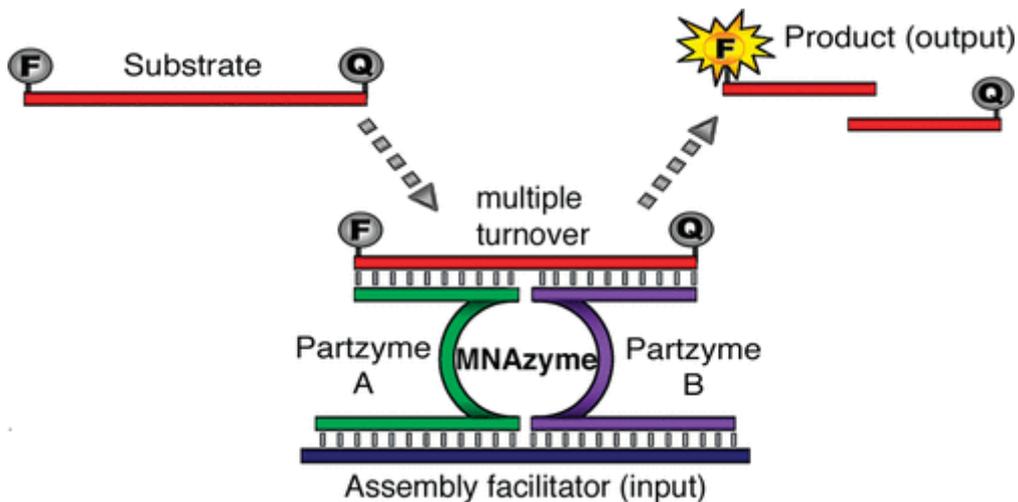


Figura 1 Funcionamiento y utilidad de un MNAzyme. Adaptada de E. Mokany [6].

De esta forma, es posible el diseño de un sistema en el cual las diferentes cadenas de ADN hibriden, activando con ello los MNAzymes en presencia de analito ("input" en la

Figura 1) y cortando un sustrato (el cual se denomina “*linker*”). Tras realizarse la escisión del sustrato, éste se libera y, el MNzyme queda disponible para hibridarse con otra cadena de “*linker*”. De esta forma, se realiza una amplificación de la señal analítica, puesto que con una única cadena de analito, sería posible la escisión de varias cadenas de “*linker*”. El “*linker*” posee dos bases de ARN, por las que se realiza el corte y, por lo tanto, la separación en dos productos [5].

El estudio se lleva a cabo tras añadir AuNPs con cadenas complementarias al ADN “*linker*” y, en el caso de producirse la escisión por la presencia de analito (ADN del microorganismo de estudio), no se produciría agregación, evidenciando así la presencia de analito. En el caso opuesto de que ocurriera la agregación, significaría que el MNzyme no cortaría al ADN “*linker*”, porque no se habría activado por la ausencia de analito. Por lo tanto, la presencia de una diana es necesaria para obtener la función catalítica del MNzyme [5].

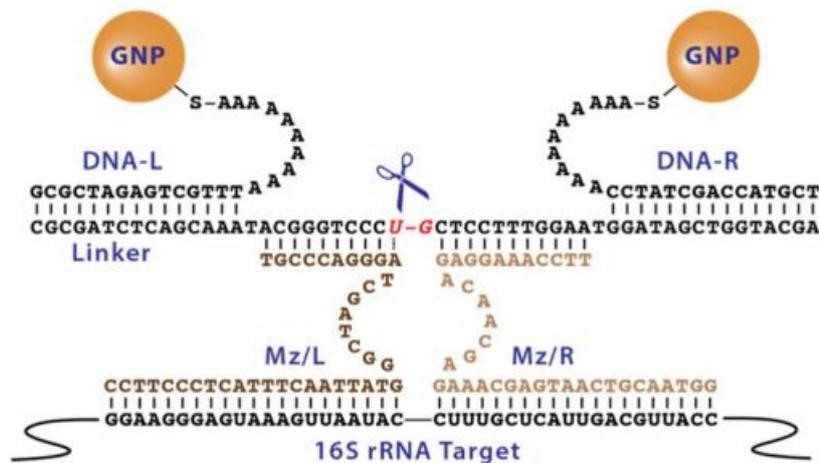


Figura 2 Esquema general del ensayo. Adaptada de K. Zagorovsky [22].

Como se representa en la Figura 2, el MNzyme está compuesto por dos partes (Parte A y Parte B) que son enzimáticas. Cada una de estas partes poseen una parte del brazo sensor capaz de unirse a una molécula facilitadora del ensamblaje, una parte del núcleo catalítico del DNzyme y, una porción de brazo de unión al sustrato [6].

Un ejemplo del funcionamiento del MNAzyme se representa en la Figura 1, donde mediante un ensayo de fluorescencia basado en la acción de estas enzimas. El sustrato o “*linker*” se marca en un extremo con un fluoróforo y en el otro extremo con un desactivante (*quencher*). Cuando el analito está presente, la enzima actúa realizando el corte y, separando el par fluoróforo - quencher, resultado en un aumento de señal fluorescente. Sin embargo, para la medida de dicha fluorescencia es necesario un equipo de fluorescencia, un fluorímetro [7].

La combinación de AuNPs con la amplificación del MNAzyme, permite desarrollar una metodología rápida y sencilla, proporcionando una alta selectividad para la detección de secuencias genéticas. Por este motivo, se selecciona esta metodología experimental para el estudio en este trabajo.

### 1.3. Nanotecnología en Química Analítica.

La nanotecnología se refiere al estudio de sistemas de materia en el orden de la escala nanométrica, de 1 a 100 nm y, se define como “*el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, instrumentos y sistemas que controlen forma y tamaño nanométrico*” [8].

El interés que provoca este campo viene dado por dos propiedades intrínsecas de estos tipos de materiales:

- El área superficial, el cual en un material con escala nanométrica es mucho mayor comparativamente que para un material macroscópico de la misma masa (les confiere diferentes propiedades, como mayor reactividad por ejemplo).
- Los efectos cuánticos en materiales con escala nanométrica no se rigen por las leyes convencionales de la física, si no que se rigen por modelos cuánticos, lo que confiere propiedades ópticas o eléctricas diferentes.

Dentro de la Química Analítica, la nanotecnología adopta un papel que en la actualidad representa un papel crucial, pudiendo ser utilizada para la detección de análisis, aprovechando sus propiedades únicas. Además, para el empleo de un nanomaterial de manera exitosa en este ámbito de la Química Analítica, se requiere una síntesis

controlada (del tamaño y forma) y reproducible y, además de una amplia caracterización para el empleo al que se pretende hacer a dicho nanomaterial.

### 1.3.1 Clasificación de los Nanomateriales y Nanopartículas.

Uno de los factores claves en el desarrollo de nuevos materiales es la capacidad de controlar el tamaño de la escala en la cual se generan dichos materiales, cada vez con la posibilidad de ser más pequeños. Dichos materiales que se estructuran con al menos una de sus dimensiones del orden nanométrico (1-100 nm) se consideran Nanomateriales <sup>[8]</sup>.

Dentro de los nanomateriales, se pueden clasificar en función de las dimensiones nanométricas que posean, como se observa en la Figura 3<sup>[8]</sup>.

- **Nanomateriales 0D**, son aquellos que poseen todas sus dimensiones en el orden nanométrico. Poseen niveles de energía discretos debido al confinamiento electrónico provocado por la nanoescala. En esta categoría se encontrarían las Nanopartículas.
- **Nanomateriales 1D**, son aquellos que poseen todas menos una de sus dimensiones en el orden nanométrico, es decir, una de sus dimensiones se sale del rango de 1-100 nm. Suelen ser materiales alargados o “nanotubos”.
- **Nanomateriales 2D**, son aquellos que poseen dos dimensiones fuera del rango nanométrico y, a estos materiales se los denomina Pozos Cuánticos, puesto que los electrones solo se mueven en un único plano. En este grupo se encuentran las películas finas o las nanoplacas.
- **Nanomateriales 3D**, son aquellos que poseen las tres dimensiones fuera del rango nanométrico. Debido a su tamaño, no existiría cuantización de la energía y los electrones se moverían libremente. Los materiales de esta categoría serían principalmente nanocompuestos.

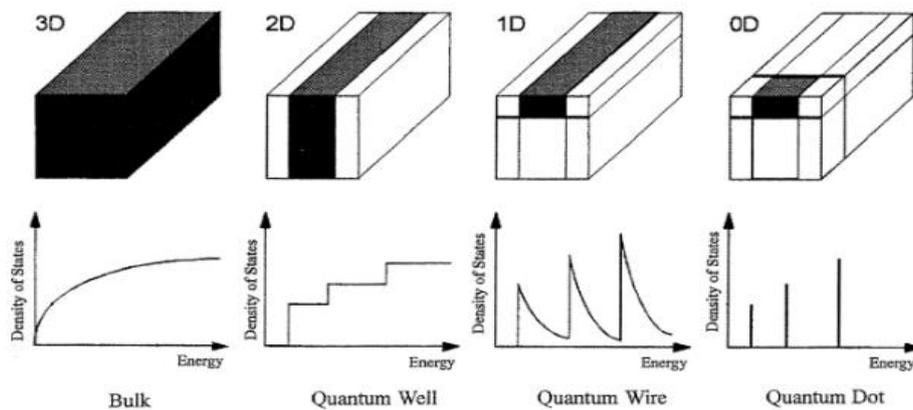


Figura 3 Clasificación de los Nanomateriales en función de sus dimensiones nanométricas. Adaptada de Royal Society [8].

Este Trabajo Fin de Máster se centra, principalmente, en los nanomateriales 0D debido a sus características diferenciales y, más concretamente, se hace utilidad de nanopartículas metálicas como son las AuNPs.

Las nanopartículas son uno de los principales nanomateriales con mayor impacto en un gran campo de aplicación y gran versatilidad.

Existen diferentes formas de sintetizar estas nanopartículas, pero generalmente se habla de dos principales vertientes, “*bottom-up*” y “*top-down*”. La principal diferencia es el material del que se parte [8].

- En la técnica “*bottom-up*” se sintetiza la nanopartícula de interés a partir de átomos o moléculas, mediante la utilización de diferentes reacciones químicas y procesos físicos como centrifugaciones.
- En la técnica “*top-down*” se obtiene la nanopartícula de interés mediante reducción de la materia, por medio de acciones físicas, químicas o mecánicas.

Desde el punto de vista de reproducibilidad, homogeneidad y por lo tanto menor variabilidad, es preferible la utilización de la técnica “*bottom-up*”. Se representa en la Figura 4 un esquema general de ambas vertientes útiles en la obtención de nanopartículas [8].

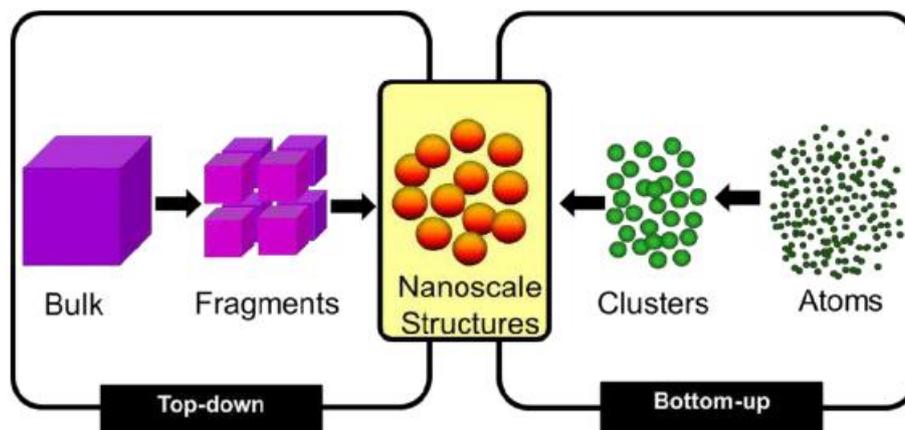


Figura 4 Vertientes disponibles para la síntesis de nanomateriales. Adaptada de Royal Society [8].

#### 1.4. Nanopartículas de Oro y su estrategia de detección colorimétrica.

Una vez introducido el término de nanopartícula, en este trabajo fin de máster se abordan unas nanopartículas metálicas por encima del resto, las AuNPs.

Las AuNPs corresponden a partículas de oro que poseen todas las dimensiones en el orden nanométrico y que, gracias a ello, les confiere propiedades y características ópticas interesantes de cara a una detección óptica.

La propiedad más interesante de las AuNPs es la presencia de resonancia de plasmón de superficie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR). El fenómeno de SPR es la base de muchas de las aplicaciones tecnológicas que posee [9].

El SPR se basa en el proceso de incidencia de la radiación electromagnética sobre electrones que se encuentran presentes en la superficie de las AuNPs, produciendo una oscilación coherente de los electrones de conducción. De este modo, el plasmón oscila alrededor de la nanopartícula con una frecuencia conocida como LSPR (*Localized Surface Plasmon Resonance*). La longitud de onda máxima de absorción causada por LSPR varía en función del tamaño de la AuNPs y, además, el máximo de absorbancia también se desplaza en el caso de agregación de AuNPs [9] [10].

Gracias a este fenómeno permite una detección cualitativa en función de un ensayo colorimétrico, sin necesidad de técnicas que consuman una mayor cantidad de tiempo, además de poseer una gran cantidad de ventajas en comparación con los métodos más tradicionales, requiriendo instrumentación más simple y barata, siendo técnicas más

robustas y sin necesidad de personal cualificado. Además, existe la posibilidad de miniaturización y, obtener famosos “*lab-on-chip*”<sup>[11]</sup>.

### 1.5. Bioconjugación y estrategia de detección.

Las AuNPs deben funcionalizarse con elementos de reconocimiento molecular que garanticen la selectividad con el objeto de estudio. Esta conjugación se obtiene mediante modificaciones en el extremo del ADN con un grupo con afinidad suficiente con las AuNPs como, por ejemplo, con grupos tiol. También se podrían utilizar otras relaciones de afinidad como la Biotina-Avidina.

El diseño se basa en la utilización de dos sets de la misma síntesis de AuNPs a una determinada concentración, a las que se añaden una sonda de ADN monocatenario diferente a cada set, con un grupo tiol (R-SH) para producirse la unión por quimisorción con la AuNPs. El ensayo consiste en la unión/hibridación de la sonda de detección bioconjugada a la AuNPs con el ADN objetivo<sup>[12][13]</sup>.

Este trabajo fin de máster se basa en el esquema representado en la Figura 5, junto con el sistema de amplificación por MNzyme. Además, otro de los componentes imprescindibles para el funcionamiento de este núcleo catalítico formado por MNzyme - AuNPs, es una secuencia de ADN añadido, que posee dos bases de ARN en el centro (por donde rompe si el ensayo es positivo), denominado ADN “*linker*”. La dispersión se mantiene de color púrpura, morado si las AuNPs se encuentran agregadas, es decir, si el núcleo catalítico del MNzyme no se activa debido a la ausencia del ADN diana u objetivo de estudio. Finalmente, el color de la dispersión coloidal se puede observar a simple vista, y ello indicará la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra del paciente<sup>[14]</sup>.

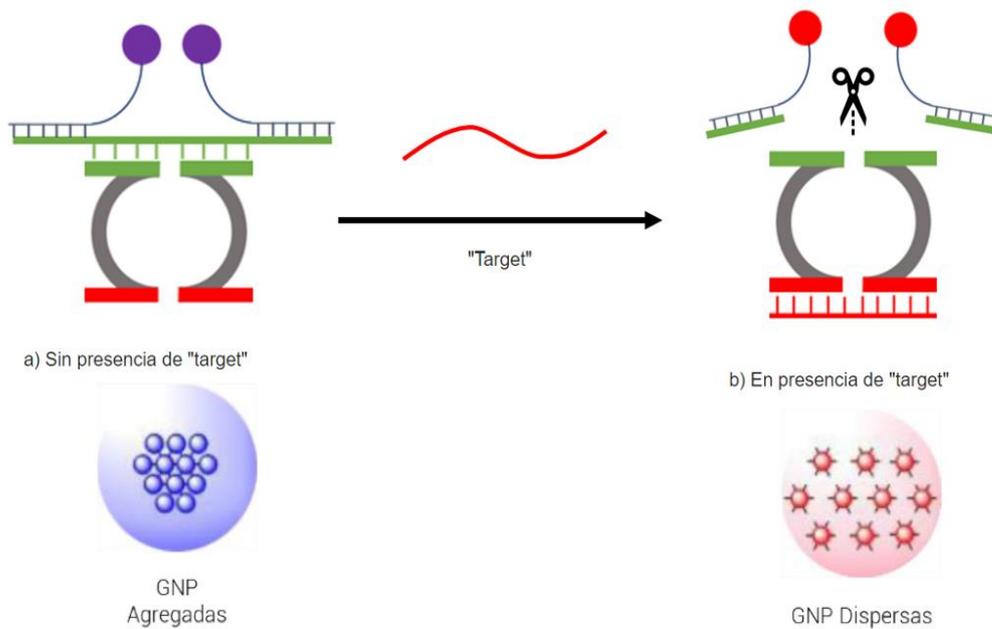


Figura 5 Estrategia de detección colorimétrica A) En ausencia de "target", obteniéndose un ensayo agregado y, por lo tanto, negativo. B) En presencia de "target" y, por lo tanto, obteniéndose un ensayo positivo con el consiguiente cambio de color. Realizada mediante BioRender.

### 1.6. Análisis cuantitativo mediante el estudio colorimétrico (RGB).

Mediante el complejo MNAzyme - AuNPs se puede llevar a cabo la detección basada en un cambio de color, permitiendo a simple vista obtener resultados de si existe secuencia de interés, siendo el resultado rosa para un ensayo positivo y morado (AuNPs agregadas) para un ensayo negativo.

El cambio de color se aprecia a simple vista, pero solo permite obtener resultados cualitativos, positivo o negativo, por encima de una determinada concentración de la secuencia diana. Con objeto de evaluar la posibilidad de llevar a cabo una cuantificación de la misma, se pueden evaluar herramientas como, por ejemplo, la descomposición de colores en rojo, verde y azul (RGB).

Este modelo de descomposición en colores se basa en que cualquier color, incluidos los colores de la luz dispersa, se pueden crear mediante la mezcla de tres colores: Rojo (R), Verde (G) y Azul (B). Por el contrario, un color se puede dividir en un grupo de valores enteros de R, G y B que pueden ir de 0 a 255 para un color en 24-bits de calidad en el ordenador <sup>[15]</sup>.

La información que se obtiene mediante la realización de un análisis RGB es más eficiente y valiosa que un espectro de dispersión en 2D. Los valores de R, G y B se pueden obtener mediante las **Ecuaciones 1,2 y 3**, y el porcentaje de cada color se representa como PR, PG y PB y, los valores de color del estudio como VR, VG y VB<sup>[15]</sup>.

$$PR = \frac{VR}{(VR + VG + VB)}$$

*Ecuación 1 Cálculo de PR*

$$PG = \frac{VG}{(VR + VG + VB)}$$

*Ecuación 2 Cálculo de PG*

$$PB = \frac{VB}{(VR + VG + VB)}$$

*Ecuación 3 Cálculo de PB*

Empleando esta herramienta se obtienen resultados reproducibles y, se obtiene información de una manera rápida, sensible y selectiva para el estudio de detección de secuencias diana presentes en bacterias<sup>[16]</sup>.

Por ello, los resultados obtenidos con la metodología basada en el empleo de MNzyme - AuNPs se evaluarán empleando esta herramienta de análisis del color basada en parámetros RGB.

## 2.OBJETIVOS

El principal objetivo de este Trabajo Fin de Máster es el desarrollo de una metodología rápida, sencilla, fiable y específica, que permita detectar de manera específica secuencias genéticas presentes en bacterias patógenas relacionadas con la sepsis neonatal de transmisión vertical.

Para la obtención de dicho objetivo se llevarán a cabo los siguientes objetivos parciales:

- En primer lugar, se llevará a cabo la síntesis y caracterización de AuNPs. Con objeto de evaluar la dispersión de tamaños obtenida, se emplean técnicas como UV-Vis, DLS y TEM.
- Posteriormente, se realizará un estudio de bioconjugación de las AuNPs con las diferentes secuencias de estudio (Agg1 y Agg2), para así determinar la concentración óptima para la correcta bioconjugación.
- Una vez se preparen los dos sets diferentes de bioconjugados, se realizarán las pertinentes optimizaciones de los parámetros que se utilizarán para la realización del estudio de colorimetría.
- Finalmente y tras realizar el ensayo, se evaluarán las medidas obtenidas mediante técnicas visuales, como placas TLCs, y mediante el estudio de RGB para la mejora de la sensibilidad.

## 3. MATERIALES, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

### 3.1. Materiales y Reactivos.

#### 3.1.1. Síntesis de Nanopartículas de Oro de 15 nm (AuNPs) por el método de Turkevich.

La síntesis de AuNPs se lleva a cabo mediante el método de Turkevich.

Disolución de  $\text{HAuCl}_4$  25mM, disolución de citrato de sodio en agua Milli-Q en una concentración de 33 mM, Tween 20 al 0,01% v/v y agua regia para la limpieza correcta del matraz Erlenmeyer (tres partes de ácido clorhídrico y una parte de ácido nítrico) <sup>[17]</sup>.

#### 3.1.2. Adsorción de diferentes ratios de ADN-SH en AuNPs de 15 nm.

AuNPs recién sintetizadas de 15 nm mediante reducción con citrato por el método de Turkevich <sup>[17]</sup>.

100  $\mu\text{M}$  de ADN modificado con un 5'-tiol (**Agg1**) y 100  $\mu\text{M}$  de ADN modificado con un 3'-tiol (**Agg2**) de un stock de ADN alícotado. Tween 20 al 0,01% v/v y TCHB (citrato de sodio - ácido clorhídrico, pH=3, 90 mM).

Para la preparación del gel de electroforesis: Para 50 mL de gel (0,5 gramos agarosa con 50 mL de 1X Tris Borato EDTA (TBE)) y disolución de sacarosa al 40% p/v (6 gramos de sacarosa + 15 mL 1X TBE).

#### 3.1.3. Adsorción 200:1 AuNPs-ADN (2 sets diferentes).

AuNPs recién sintetizadas de 15 nm por reducción con citrato, 100  $\mu\text{M}$  de Agg1 y Agg2 como ADN stock, Tween 20 0,01% v/v y TCHB (citrato de sodio - ácido clorhídrico, pH=3, 90 mM) <sup>[17]</sup>.

#### 3.1.4. Optimizaciones y ensayo.

Para la realización del ensayo de estudio y sus diferentes optimizaciones se hacen uso de los dos sets de AuNPs bioconjugadas, uno con Agg1 y el otro set con Agg2 y, bloqueadas con mPEG-SH<sub>1000</sub> en concentración 11 nM. Disolución reguladora de MNAszyme 10X (0,1 M Tris-HCl, 0,5 M KCl, pH=8,3). Agua ultrapura.

Para las diferentes optimizaciones del ensayo realizadas:

- Diferentes disoluciones a diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM y 400 mM).
- Diferentes concentraciones de ADN “*linker*” a partir de un stock de 1 μM (30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM y 70 nM).
- Diferentes concentraciones de MNAzyme- partzyme A y partzyme B de stocks de 100 μM (0,5 μM, 1 μM, 2 μM, 4 μM, 6 μM y 8 μM).

Preparación de diferentes concentraciones de ADN “*target*” para una concentración final en ocho tubos *ependorf* de 5000 pM, 2500 pM, 1000 pM, 500 pM, 250 pM, 100 pM, 50 pM y 0 pM.

### 3.2. Instrumentación.

Inicialmente, se realiza la caracterización de las AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich, controlando así tanto tamaño como índice de polidispersividad y homogeneidad de la muestra. Dicha caracterización se lleva a cabo mediante espectroscopia UV-Vis, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión de luz dinámica (DLS) <sup>[17]</sup>.

La espectrofotometría UV-Vis permite la medida de la absorbancia o de la transmitancia de una muestra cuando se expone a radiación de longitud de onda de esos rangos. Una vez la energía se transmite a través de la muestra de estudio (en una pertinente cubeta de medida), el detector convierte esa energía luminosa en una señal de absorbancia. Dicho proceso sigue la Ley de Lamber-Beer, que se representa en la **Ecuación 4**.

$$A = \epsilon bc$$

*Ecuación 4 Ley de Lamber-Beer*

Las medidas de absorbancia se realizan con un espectrofotómetro UV-Vis *Thermo Scientific™ GENESYS 10S*, la cual utiliza una lámpara de xenón de alta intensidad y geometría óptica de doble haz. Para las medidas, se emplea una cubeta de plástico de 1,5 mL y de 10 mm de paso de luz desechables.

Otra de las técnicas para la caracterización de las AuNPs es la dispersión de luz dinámica (DLS). Esta técnica se utiliza para medir el tamaño de partícula en la región submicrónica dispersas en un fluido. Esta técnica se basa en el movimiento Browniano, el cual se rige

por la aleatoriedad del movimiento de las partículas. La velocidad del movimiento browniano se define por el coeficiente de difusión translacional, donde a partir de este parámetro, se calcula el tamaño de las partículas haciendo uso de la **Ecuación 5**.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

*Ecuación 5 Fórmula para el cálculo del radio hidrodinámico*

En la **Ecuación 5** se calcula el diámetro correspondiente al radio hidrodinámico ( $d(H)$ ), que se refiere al valor correspondiente a cómo difunde una partícula en un fluido. El resto de parámetros relacionados son la constante de Boltzmann ( $k$ ), la temperatura absoluta ( $T$ ), la viscosidad ( $\eta$ ) y el coeficiente de difusión translacional ( $D$ )<sup>[18]</sup>.

El equipo que se utiliza corresponde al modelo *Zetasizer Nano ZS (Malvern instruments) DLS* y, se emplea para la medida del tamaño de AuNPs y de su PDI para obtener una primera idea.

El valor obtenido inicialmente en el DLS del índice de polidispersividad (PDI) sería mejorable (0,143), aunque no ha sido crítico a la hora de la realización del trabajo.

Finalmente, y tras una primera medida en el DLS, se hace uso para una caracterización más exacta de la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), la cual es una técnica poderosa, en la que un haz de electrones de alta energía pasa a través de una muestra delgada, previamente preparada sobre una rejilla, y la interacción entre electrones y átomos se utiliza para observar las características, como estructura o dislocaciones. El equipo utilizado es un JEOL-2000 EX II TEM, disponible en los Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo.

Posteriormente para la medida del ensayo MNAzyme – AuNPs se utiliza un espectrofotómetro lector de placas ELISA, que al igual que un espectrofotómetro UV-Vis, mide la cantidad de luz que transmite o absorbe una muestra en un rango de longitudes de onda (UV-Vis).

El equipo utilizado es un *espectrofotómetro lector de microplacas Multiskan SkyHigh Thermofisher*.

## 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 4.1. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) de 15 nm.

Para la realización del proceso de síntesis de AuNPs de 15 nm, previamente se lava un matraz Erlenmeyer de 250 mL con agua regia, para la eliminación de AuNPs de síntesis previas. Este lavado se realiza con tres partes de ácido clorhídrico y una parte de ácido nítrico.

Una vez se tiene el matraz Erlenmeyer limpio, se añaden 100 mL agua ultrapura + 1 mL de  $\text{HAuCl}_4$  y, se calienta hasta ebullición. Cuando comienza a hervir, se inicia la agitación y, se añade 1 mL de la disolución previamente preparada de citrato de sodio (concentración 33 mM).

La mezcla se calienta hasta viraje completo del color, pasando primero por una etapa transparente, a una intermedia de color azul intenso y, finalmente obteniéndose un color rojo intenso.

Este cambio de color se debe al cambio en el estado de oxidación del oro, de su forma  $\text{Au}^{3+}$  a la forma metálica  $\text{Au}^0$ .

Una vez sintetizadas las AuNPs, se lleva una muestra representativa al DLS, para medir así el tamaño y el índice de polidispersividad (PDI). El objetivo es obtener un PDI menor de 0.1, ya que de este modo se asegura que la población de AuNPs presenta una distribución de tamaños homogénea.

A continuación, se mide el espectro de absorbancia por espectroscopia UV-Vis en un rango de 400 a 800 nm ( $\lambda_{\text{max}}=520\text{-}525$  nm) y, con los datos obtenidos de absorbancia y diámetro de las AuNPs, se estima la concentración de la dispersión y, con Tween 20 al 0,01% v/v en agua ultrapura se ajusta a una concentración final de 100 nM <sup>[19]</sup>.

### 4.2. Adsorción de diferentes relaciones molares de ADN-SH, para su optimización, en semillas de AuNPs de 15 nm: método ácido.

El objetivo es optimizar la relación molar ideal para la realización posterior del ensayo. Se varía la relación ADN-SH – AuNPs desde 300:1 hasta 25:1, para lo que se preparan concentraciones desde 30 hasta 2,5  $\mu\text{M}$  en diferentes tubos tipo *ependorfs*.

En primer lugar, se realiza la preparación de ocho viales *ependorff*, con una mezcla de AuNPs de 15 nm de concentración 100 nM (se añade un cuarto del volumen total del *ependorff* para tener una concentración final de 25 nM de AuNPs). Se añade además Tween 20 al 0,1% v/v y agua ultrapura. Posteriormente, se añade a cada *ependorff* una concentración diferente de los preparados de ADN-SH, obteniendo así diferentes relaciones molares de ADN y AuNPs.

Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente, para la posterior adición de TCHB, dejando incubar las mezclas durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Mientras tanto, se realiza un gel para la electroforesis al 1% en agarosa (0,5 gramos de agarosa en 50 mL de TBE 1X) y se añade a la cubeta para que solidifique.

Para la adición de la muestra a los pocillos se añaden 7  $\mu$ L de cada muestra de los *ependorff* y 7  $\mu$ L de la disolución de sacarosa al 40%, que se añade para aumentar la densidad y que las AuNPs - ADN no salgan del pocillo correspondiente. Se aplica un voltaje de 100 V durante un tiempo de 35 minutos.

Este procedimiento se lleva a cabo para ambos sets, tanto para Agg1 como para Agg2.

Se representa en la Tabla 1 las relaciones molares optimizadas mediante la técnica de electroforesis en gel, para la determinación del valor óptimo.

*Tabla 1 Relaciones molares del estudio de bioconjugación entre ADN : AuNPs*

Relaciones molares ADN- SH : AuNPs								
<b>ADN- SH</b>	<b>300</b>	<b>250</b>	<b>200</b>	<b>150</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>0</b>
<b>AuNPs</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

#### 4.3. Bioconjugación con la relación molar ADN : AuNPs 200:1.

Para llevar a cabo el proceso de bioconjugación se separan en dos sets diferentes (para Agg1 y Agg2) de concentración 20  $\mu$ M.

Se mezclan en tubos *ependorfs* las AuNPs de 15 nm 100 nM, Tween 20 al 0,1% v/v, agua ultrapura y Agg1 en un set y Agg2 en el otro set. Se incuba durante 5 minutos a

temperatura ambiente y, posteriormente se añade TCHB y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras finalizar la incubación durante 30 minutos, se le añade 250  $\mu$ L de una disolución 2 mM de mPEG-SH<sub>1000</sub>, cuyo objetivo es bloquear cualquier área libre de ADN-SH en la AuNPs, para evitar así cualquier unión inespecífica a las AuNPs y, mejorar así la estabilidad de estas durante el ensayo con MNAzymes al añadir sales.

Se realiza una incubación durante 30 minutos a 60°C antes de la purificación.

El proceso de purificación consiste en tres ciclos de centrifugación a 12000 g de fuerza centrífuga relativa y, cada ciclo durante 30 minutos.

En cada ciclo de centrifugación, se elimina el sobrenadante y se añade Tween 20 al 0,01% v/v para resuspender los bioconjugados. Después del último ciclo, se miden con el espectrofotómetro para estimar la concentración y, llevarlas a 11 nM finalmente. Se almacenan en una nevera a 4°C.

#### 4.4. Optimizaciones para la realización de ensayo de estudio.

##### 4.4.1. Optimización de la concentración de ADN “*linker*” en presencia de ADN “*target*”.

Se realiza un ensayo colorimétrico para la optimización de la concentración a utilizar de ADN “*linker*” en presencia de ADN “*target*” (secuencia diana o analito). Para ello, se preparan ocho viales con diferentes concentraciones de “*target*”, en un intervalo de 0 a 5 nM. Este paso de preparación de los viales variando la concentración de “*target*” será común en todas las optimizaciones, partiendo de un stock de “*target*” de 100 nM.

Se preparan cinco ensayos independientes con 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM y 70 nM de “*linker*”.

El modo de trabajo para la preparación del ensayo es la preparación de ocho tubos *ependorf* (uno para cada concentración de “*target*”) para cada uno de los estudios a realizar.

Se añade en cada tubo *ependorf* la cantidad correspondiente de disolución reguladora MNAzyme 10X, MgCl<sub>2</sub>, MNAzyme (partzyme A y partzyme B), “*linker*” y “*target*”,

obteniendo un volumen total de 10  $\mu\text{L}$  por cada tubo. Una vez añadido todo en el tubo *ependorf*, se incuba a 50°C durante 1 hora, haciendo uso de un termoagitador.

Una vez finalizada dicha etapa de incubación, se añade a cada tubo *ependorf* 5  $\mu\text{L}$  de AuNPs bioconjugadas con Agg1 y 5  $\mu\text{L}$  de AuNPs bioconjugadas con Agg2 y, se incuba durante 20 minutos a 50°C.

Una vez finalizado el ensayo, sobre una placa de cromatografía fina (TLC) se depositan 3  $\mu\text{L}$  de cada ensayo y, se observa el grado de agregación.

Además, se miden espectrofotométricamente las mezclas resultantes empleando un lector de placas, con objeto de poder observar la posición del pico SPR para corroborar los resultados obtenidos visualmente.

#### 4.4.2. Optimización de la concentración de $\text{MgCl}_2$ en presencia de ADN “*target*”.

Se realiza un ensayo colorimétrico para la optimización de la concentración a utilizar de  $\text{MgCl}_2$  en presencia de ADN “*target*” (secuencia diana o analito).

Se optimiza utilizando únicamente la presencia de “*target*” y la ausencia, utilizando 2,5 nM y 0, respectivamente.

Las concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  estudiadas son 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM y 400 mM.

El ensayo se realiza de manera similar al descrito en el apartado anterior, pero modificando las concentraciones de sal.

#### 4.4.3. Optimización de la concentración de MNAzyme en presencia de ADN “*target*”.

Se realiza un ensayo colorimétrico para la optimización de la concentración a utilizar de MNAzyme en presencia de ADN “*target*” (secuencia diana o analito).

Para la optimización del MNAzyme se realiza el ensayo con concentraciones crecientes de “*target*”. Las concentraciones estudiadas de MNAzyme (partzyme A y partzyme B) serían de 8  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 0,5 $\mu\text{M}$ .

El ensayo se realiza de forma similar a la descrita en el apartado 4.4.1.

#### 4.4.4. Optimización del tiempo y temperatura en presencia de ADN “*target*”.

Se lleva a cabo un estudio del efecto del tiempo y de la temperatura para la detección de ADN “*target*” (secuencia diana o analito).

Se optimiza el tiempo de la primera etapa únicamente, es decir, el tiempo en el que se incuban todos los reactivos sin las AuNPs de los dos sets de Agg, por lo que la segunda etapa tras añadir las AuNPs con Agg1 y Agg2 bioconjugadas, será de 20 minutos. Los tiempos a optimizar de la primera etapa son de 20, 40, 60 y 80 minutos.

Asimismo, la temperatura se optimiza para las dos etapas en el termoagitador, utilizándose 40°C, 45°C, 50°C, 55°C y 60°C.

En el apartado de Resultados se presentan todos los resultados obtenidos de los estudios llevados a cabo, así como las condiciones óptimas para la realización del estudio.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro de 15 nm (AuNPs).

La síntesis de AuNPs se realiza siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.1 del *Procedimiento Experimental*, donde se detallan los pasos a realizar. Dicha síntesis de AuNPs esféricas se caracteriza posteriormente por diferentes técnicas, como DLS, TEM y espectroscopía UV-Vis para la obtención de información acerca de su estructura, morfología y tamaño.

Inicialmente, se estudia el índice de polidispersividad (PDI) y el radio hidrodinámico mediante el uso de la técnica DLS (dispersión de luz dinámica), la cual aporta una primera información acerca de la distribución del tamaño de las AuNPs.

El PDI describe la uniformidad de tamaños de una dispersión de partículas, indicando el grado de variación de tamaño/peso de las poblaciones, representando la homogeneidad de la muestra.

Una distribución de tamaños más grandes, corresponde a valores de PDI más grandes. El valor de PDI oscila entre 0 y 1, siendo el ideal en el caso de estudio un PDI < 0.1, significando que las partículas se encuentran monodispersas, mientras que para un valor de PDI > 0.1 representa una distribución granulada y, por lo tanto, polidispersa.

Los valores obtenidos en las medidas de DLS fueron de **16 ± 3 nm** de diámetro hidrodinámico de AuNPs y un PDI de **0,143**. Se recogen los resultados en la Tabla 2.

Para una caracterización más exacta del tamaño de las AuNPs, se recurre al estudio por TEM. Para la estimación del diámetro medio, se recurre al cálculo del diámetro de cada fotografía realizada con el TEM. Mientras, el PDI se calcula con la fórmula de la **Ecuación 6**, donde el cuadrado de la desviación estándar ( $\sigma$ ) se divide por el cuadrado del diámetro medio de partícula ( $d$ )<sup>[20]</sup>.

$$PDI = \left(\frac{\sigma}{d}\right)^2$$

*Ecuación 6 Fórmula para el cálculo del Índice de Polidispersividad (PDI) mediante la técnica de TEM.*

Mediante la utilización de la Ecuación 6, se calcula el PDI obteniéndose 0.045 y un diámetro promedio de **14 ± 3 nm** de tamaño.

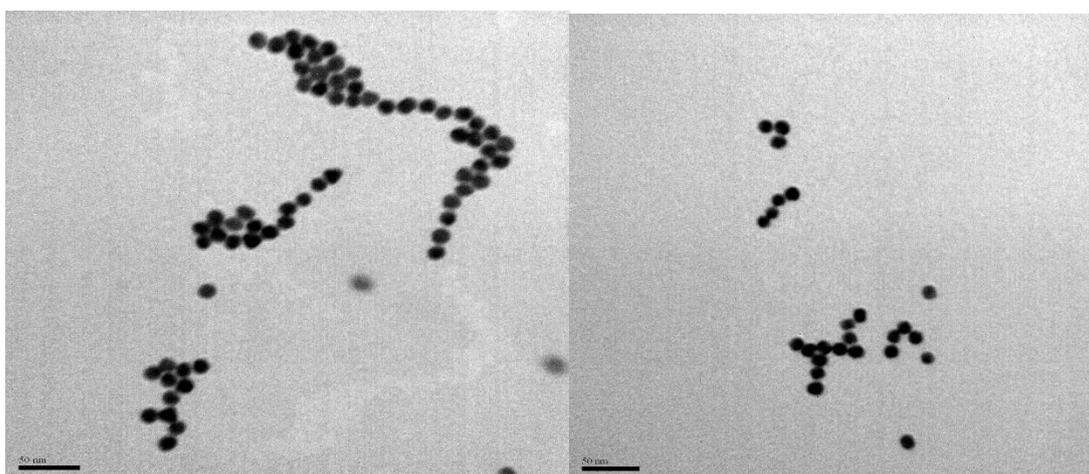
Se representa en la Tabla 2 los datos obtenidos mediante la medida por DLS y por TEM, para su posterior comparación.

*Tabla 2 Comparación propiedades (PDI y tamaño) obtenidas mediante las técnicas de caracterización DLS y TEM.*

	<b>Tamaño (nm)</b>	<b>PDI</b>
<b>DLS</b>	16 ± 3	0,143
<b>TEM</b>	14 ± 3	0,045

En la Tabla 4 se observa que el valor obtenido para el tamaño de partícula en la técnica de DLS es mayor que el obtenido mediante el TEM, esto es debido a que en el DLS se mide el radio hidrodinámico, lo que incluye a moléculas adheridas a las AuNPs como, por ejemplo, el citrato. Por lo tanto, con el DLS el tamaño de partícula siempre será superior al real.

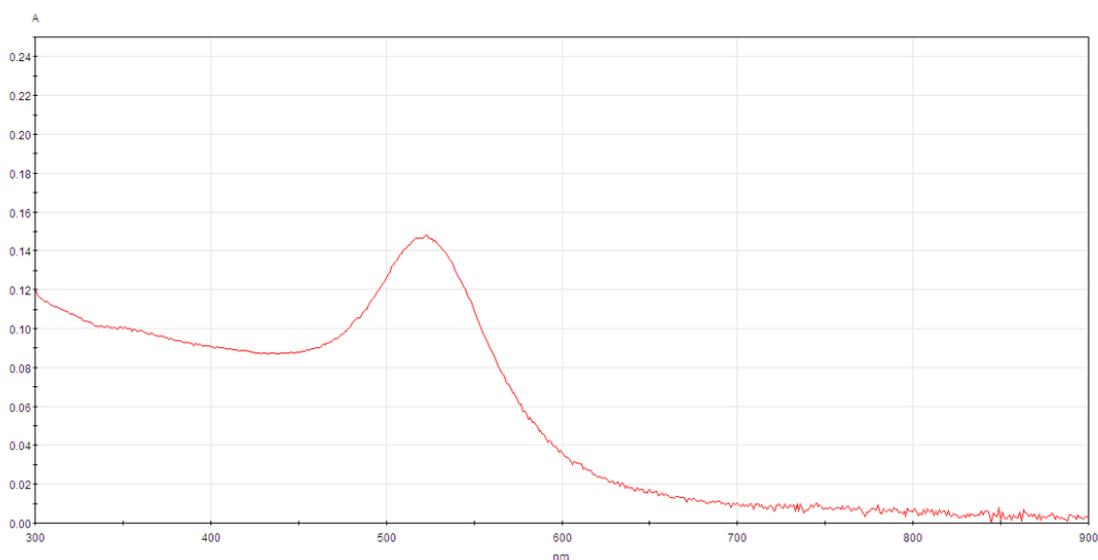
El valor calculado para el tamaño mediante la técnica del TEM es más preciso, puesto que se realiza su medida con técnicas como ImageJ, midiendo el diámetro real de las AuNPs y, representando la media de una población dado (y su desviación estándar). Se representa en la Figura 6 la población de AuNPs sobre la que se realiza el estudio.



*Figura 6 Poblaciones de AuNPs mediante imágenes obtenidas por Microscopía electrónica de Transmisión (TEM) a una escala de 50 nm. Figura obtenida mediante la caracterización en TEM en los SCTs de la Universidad de Oviedo.*

Otra de las formas de caracterizar las AuNPs es mediante el estudio espectrofotométrico UV-Vis de la longitud de onda ( $\lambda$ ) del SPR. Se representa en la Figura 7 una muestra de AuNPs medida en el espectrofotómetro, tras una dilución previa, donde se observa un máximo a 522 nm (0,148 A).

En esta Figura 7, el color de las AuNPs es rojo, mientras que en posteriores medidas se podrán observar medidas a  $\lambda$  más altas y con color morado, debido a la agregación de las AuNPs.



*Figura 7 Espectro obtenido de las AuNPs mediante la técnica espectroscopía UV-Vis. Figura tomada del espectrofotómetro al realizar el ensayo.*

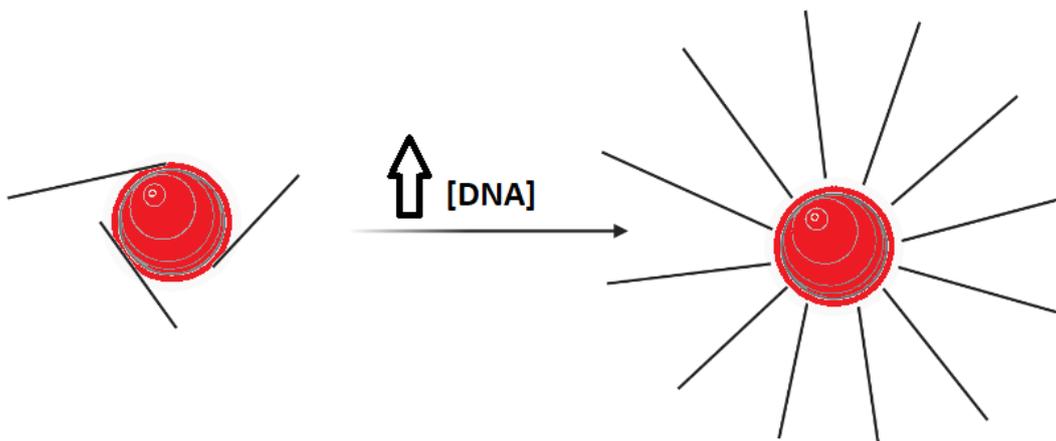
## 5.2. Bioconjugación de las AuNPs con las diferentes relaciones molares de ADN (Agg1 y Agg2).

Las cadenas de ADN monocatenarias se adhieren a la superficie de las AuNPs mediante quimisorción por los grupos tiol.

La concentración de las secuencias de ADN es fundamental para una correcta orientación de las hebras de ADN al adherirse a las AuNPs. Además de la presencia de diez bases de adenina antes del grupo tiol (las cuales poseen carácter repulsivo con respecto al oro), se necesita una concentración suficientemente alta como para tener suficientes repulsiones electrostáticas y orientarse como se representa en la Figura 8.

Si la concentración de ADN añadido es baja, a pesar de tener estas diez bases de adenina (R-A-A-A-A-A-A-A-A-A-SH), las cadenas se podrán pegar a la AuNPs y, esto provocará que la cadena monocatenaria de ADN bioconjugada no se una con su complementaria y un error en el ensayo, representándose como el esquema de la izquierda de la Figura 8.

Para la realización del estudio de saturación de la superficie de las AuNPs se realizan diferentes ensayos con diferentes relaciones molares de ADN : AuNPs y, se mira el resultado por electroforesis en gel de agarosa, siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 4.2. del *Procedimiento Experimental*, donde se describe el proceso de comprobación de la relación molar ADN : AuNPs más adecuada para la saturación de la superficie de oro. Se representa en la Figura 9 y 10 los resultados obtenidos en las dos electroforesis realizadas, una con el set de AuNPs con Agg1 y, otra con el set de AuNPs con Agg2 bioconjugada.



*Figura 8 Representación esquemática de la orientación de las cadenas monocatenarias de ADN en las AuNPs a baja concentración (a la izquierda) y en la concentración adecuada, donde se satura la superficie de la AuNPs (a la derecha). Figura realizada con BioRender.*

Como se representa en la Figura 8, al añadir una concentración suficiente de ADN monocatenario se consigue la saturación de la superficie de la AuNPs.

En las Figuras 9 y 10 se observan imágenes de los gels de agarosa tras aplicar un voltaje de 100 V durante 35 minutos.

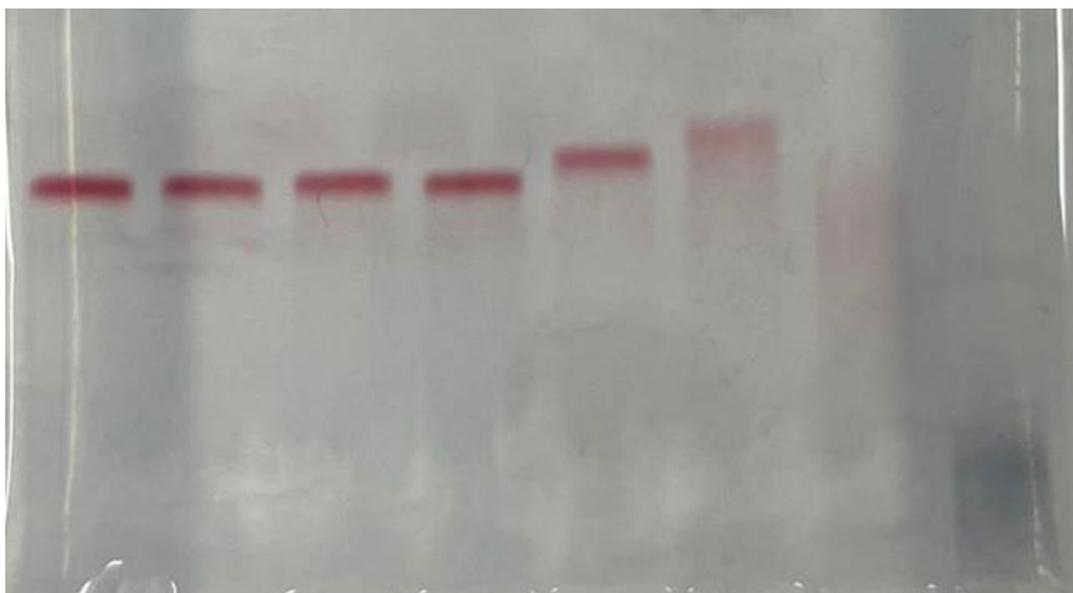


Figura 9 Imagen del gel de agarosa tras realizar la electroforesis de AuNPs-Agg1, modificando las relaciones molares de ADN de 300:1 a 0:1. Imagen obtenida mediante fotografía.

<b>300:1</b>	<b>250:1</b>	<b>200:1</b>	<b>150:1</b>	<b>100:1</b>	<b>50:1</b>	<b>25:1</b>	<b>0:1</b>
--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	-------------	-------------	------------

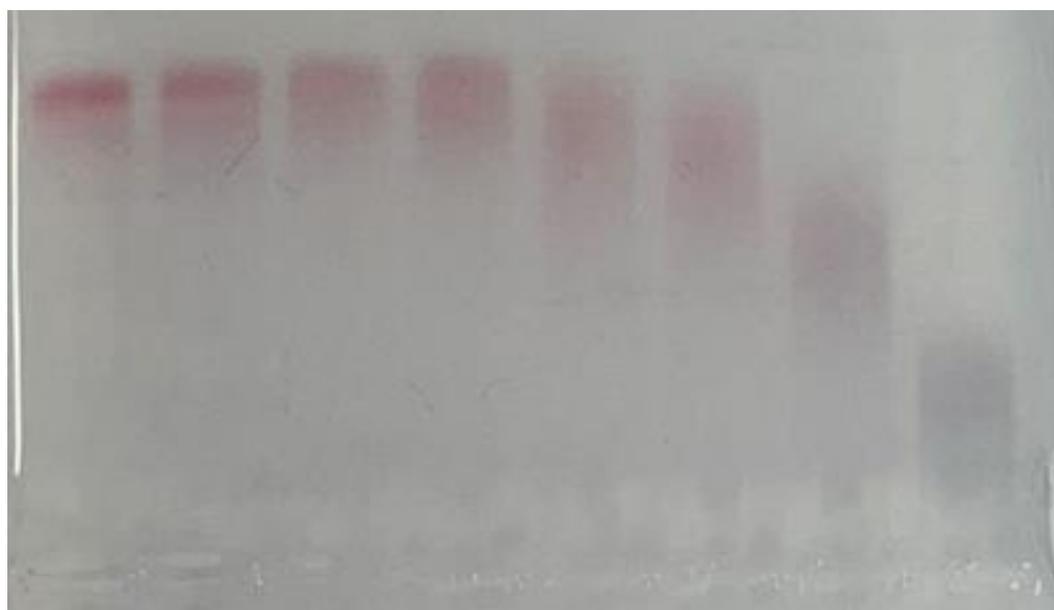


Figura 10 Imagen del gel de agarosa tras realizar la electroforesis de AuNPs-Agg2, modificando las relaciones molares de ADN de 300:1 a 0:1. Imagen obtenida mediante fotografía.

<b>300:1</b>	<b>250:1</b>	<b>200:1</b>	<b>150:1</b>	<b>100:1</b>	<b>50:1</b>	<b>25:1</b>	<b>0:1</b>
--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	-------------	-------------	------------

En estas dos Figuras (9 y 10), se pueden ver ocho bandas correspondientes a las relaciones molares representados AuNPs: ADN-SH. En función de la cantidad de ADN alrededor de las AuNPs, los bioconjugados migrarán de distinta manera. De este modo, es posible observar que a partir de una relación molar de ADN : AuNPs de 150:1, las bandas migran de manera similar. Por ello, para la realización del estudio se selecciona 200:1, con objeto de asegurar la máxima saturación de la superficie de las AuNPs con hebras de ADN.

Posteriormente, y tras la saturación de las AuNPs con las hebras de ADN, se añade un agente bloqueante, como el mPEG-SH<sub>1000</sub> para evitar adherencias inespecíficas a la superficie de las AuNPs.

Se realiza un posterior estudio por espectroscopia UV-Vis para estimar la concentración de los dos sets diferentes de AuNPs, observando la longitud de onda de absorción, siendo 522 nm. Esto significa que, tanto antes como después de la bioconjugación, las AuNPs se mantienen dispersas y, por lo tanto, de color rojo.

### 5.3. Diseño y optimización de las condiciones experimentales del ensayo de estudio.

Las condiciones experimentales del estudio se basan en la respuesta MNAzyme – AuNPs mediante la detección colorimétrica a simple vista para determinar si una muestra es positiva o negativa a la infección bacteriana.

El objeto de estudio, las bacterias, poseen una región constante de la cual se conoce la secuencia. Inicialmente, únicamente se desea conocer mediante este estudio la presencia o ausencia de agente bacteriano (no es necesario conocer qué bacteria está causando la infección en este punto). Se representa en la Figura 11 una representación esquemática de la región constante del ARN 16S (en rojo) en varias bacterias (representadas con diferentes formas para representar heterogeneidad de géneros).



*Figure 11 Esquemas de diferentes bacterias, representando la región constante (en rojo) presente en todos los géneros bacterianos. Imagen realizada con Paint.*

En la Figura 11, se representa en rojo la región constante o conservada, que en el ensayo MNzyme – AuNPs actuará de sonda de detección.

Además, cada género bacteriano posee una región variable, la cual es específica y sirve para la identificación del género bacteriano que estaría causando la infección.

Debido a los falsos positivos y falsos negativos en el diagnóstico de sepsis de transmisión vertical, tras la sospecha de un caso positivo de un recién nacido, se le trata con antibióticos de amplio espectro mientras se obtiene el hemocultivo, el cual hasta la fecha es el único método fiable en detección de sepsis bacteriana.

Por ello, es necesario conocer qué microorganismo causa la infección, pero el problema actual radica en la necesidad de desarrollar una herramienta capaz de detectar de forma rápida y fiable la presencia o ausencia de infección bacteriana, por lo que no sería de gran utilidad la utilización de una secuencia conservada entre las bacterias.

Además, el ensayo se realiza en presencia del MNzyme para ganar sensibilidad, puesto que las AuNPs bioconjugadas con la hebra complementaria a la hebra de región constante bacteriana, no tendría suficiente sensibilidad. Se representa en la Figura 12 una simulación del ensayo de la manera descrita anteriormente.

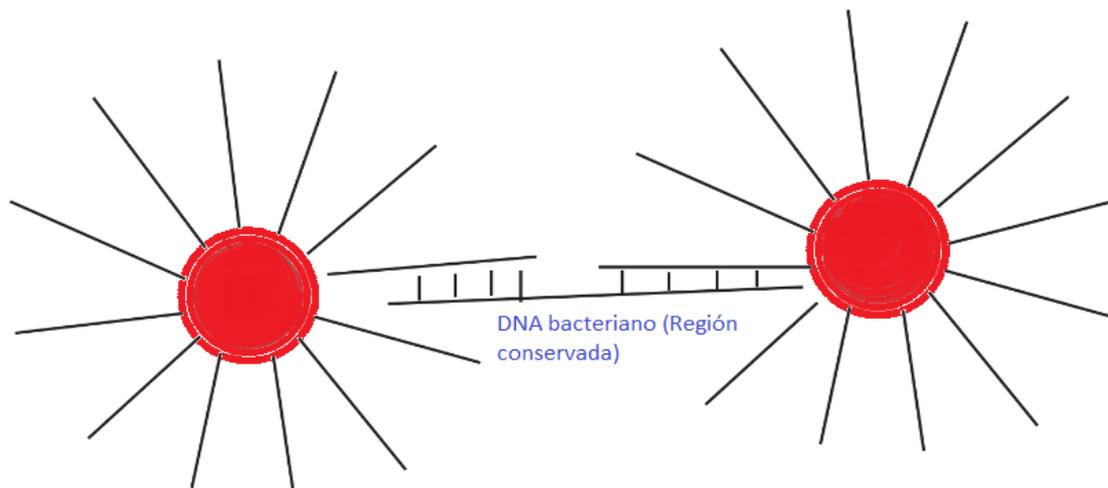


Figura 12 Esquema de un ensayo directo AuNPs – ADN de la región ribosomal 16S. Imagen realizada por BioRender.

Por ello, es necesaria la presencia de los MNAszymes, para amplificar la señal y, por lo tanto, la sensibilidad del método.

Se representa en la Figura 13 el esquema general de este Trabajo Fin de Máster, donde el ADN de estudio es una sonda de ADN de la región conservada de la subunidad ribosomal 16-S. Una bacteria posee unas 30000 copias de este tipo de RNA, por lo que la detección se puede llevar a cabo visualmente, pero como punto negativo, el RNA es bastante lábil <sup>[21]</sup>.

El sistema MNAszyme – AuNPs, consta de un conector de ADN entre ambos, denominado ADN “*linker*”, mediante el cual se permite la unión de las AuNPs bioconjugadas con Agg1 y con Agg2, como se representa en la Figura 13.

Las partzymes (parte A y parte B) del MNAszyme se ensamblan y, en presencia de la sonda de detección (región constante del ADN bacteriano), se activaría el núcleo catalítico y, la hebra de ADN “*linker*” se escindiría (por el centro, donde hay 2 bases de ARN, siendo estas más lábiles) y, se observarían las AuNPs dispersas. Mientras que si no hubiera presencia de sonda universal o “*target*”, las AuNPs se observarían agregadas, ya que no se activaría el núcleo catalítico del sistema MNAszyme – AuNPs.

El sistema se reconoce únicamente mediante un cambio de color, siendo un sistema complejo experimentalmente, pero cuyos resultados serían fácilmente entendibles, indicando si un paciente es positivo o negativo para la infección bacteriana.

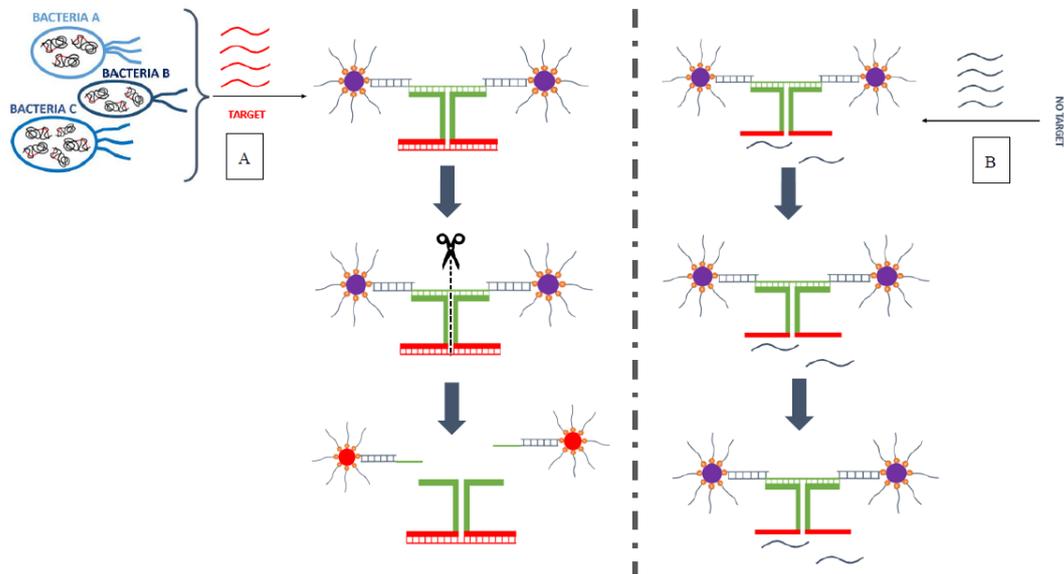


Figura 13 Representación esquemática del sistema AuNPs – MNzyme en presencia (A) y en ausencia (B) de "target". Imagen realizada por BioRender.

Una vez representado el sistema AuNPs – MNzyme en la Figura 13, se resumen las diferentes optimizaciones llevadas a cabo en el ensayo objeto de estudio.

### 5.3.1. Optimización de la concentración de ADN "linker".

Se realiza el estudio de concentración óptima de ADN "linker" en un rango entre 30 y 80 nM, donde el objetivo es visualizar el cambio de color más apreciable.

Se representa en la Figura 14 el efecto de la presencia de ADN "linker" al estar presentes las AuNPs-Agg1 y las AuNPs-Agg2. El resultado esperado en este ensayo es la observación del cambio de color, puesto que en ausencia de "linker" se esperan las AuNPs que se encuentren dispersas y que, en presencia se encuentren agregadas.

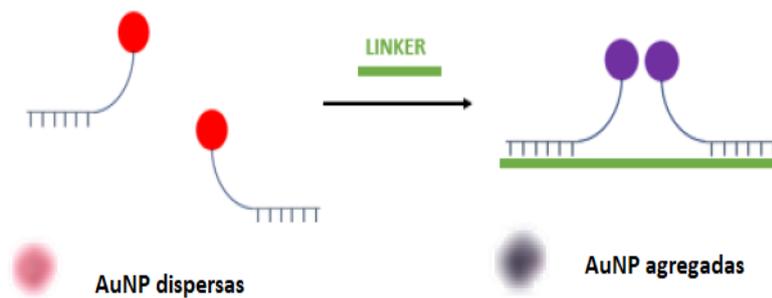


Figure 14 Esquema del cambio de color de las AuNPs en presencia de ADN "linker". Imagen realizada con BioRender con ayuda del Paint.

Para ello, se representa en la Tabla 3 los resultados obtenidos en la placa TLC para cada concentración de ADN "linker", manteniendo unas condiciones iniciales de partida en el resto de reactivos (los cuales se van optimizando a posteriori, fijando cada parámetro según se optimiza).

Tabla 3 Puntos de las diferentes concentraciones de ADN "target" y ADN "linker" mediante el uso de placas TLC, para observar el grado de agregación del ensayo.

		Concentración ADN "linker" (nM)					
		30	40	50	60	70	80
Concentración ADN "target" (pM)	5000						
	2500						
	1000						
	500						
	250						

	100						
	50						
	0						

A la vista de los resultados obtenidos en la Tabla 3, la concentración óptima de ADN “linker” es de 50 nM, puesto que con una menor concentración se observa poca agregación y, por lo tanto, el ADN “linker” es insuficiente. Mientras que, si se añade una alta concentración de ADN “linker”, éste se une a las AuNPs y provocaría una agregación mayor, de modo que sería necesaria una mayor concentración de “target” para la observación del cambio de color.

### 5.3.2. Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub>.

Una vez seleccionada la concentración de ADN “linker”, la cual es 50 nM, se llevan a cabo las siguientes optimizaciones.

El estudio de la concentración de la sal MgCl<sub>2</sub>, la cual favorece la hibridación, la actividad catalítica del MNAzyme y la agregación de las AuNPs, se realiza únicamente en presencia y en ausencia de la secuencia diana o ADN “target”. Se representa en la Tabla 4 los resultados obtenidos en el estudio de 200, 250, 300, 350 y 400 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Tabla 4 Puntos de las diferentes concentraciones de ADN “target” y MgCl<sub>2</sub> mediante el uso de placas TLC, para observar el grado de agregación del ensayo.

		Concentración MgCl <sub>2</sub> (mM)				
		200	250	300	350	400
Concentración ADN “target” (pM)	2500					
	0					

Observando los resultados obtenidos en la Tabla 4, se observa que la concentración óptima para la realización del ensayo de  $MgCl_2$  sería de 200 mM, puesto que es el ensayo donde mejor se apreciaría el cambio de color entre ausencia y presencia de *“linker”*, y, por lo tanto, de agregación de AuNPs-Agg.

### 5.3.3. Optimización de la concentración de MNAzyme.

Una vez realizadas las optimizaciones de ADN *“linker”* y de sal, con concentraciones óptimas seleccionadas de 50 nM y 200 mM respectivamente, se lleva a cabo un estudio del efecto de la concentración de MNAzyme, evaluando concentraciones de 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8  $\mu M$ . El ensayo se lleva a cabo para concentraciones crecientes de la secuencia diana, con la intención de seleccionar la concentración de MNAzyme que permita observar un cambio de color de las AuNPs en presencia de la concentración de analito más baja posible.

Se representan en la Tabla 5 los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de ADN *“target”*.

Cuando se emplean los resultados obtenidos en la Tabla 5, parecen indicar que no hay suficiente MNAzyme para cortar todas las secuencias de *“linker”*, por lo que se observa agregación de los bioconjugados hasta concentraciones en torno a 1000 pM. Por otro lado, en presencia de concentraciones de MNAzyme muy elevadas, tampoco es posible observar el cambio de color en presencia de bajas concentraciones de analito. Esto podría atribuirse a que los brazos sensores y los brazos que se unen al *“linker”*, podrían hacerlo de manera independiente, es decir, un MNAzyme podría estar hibridado con el *“linker”*, mientras que el otro MNAzyme estaría hibridado con el *“target”*. De este modo, el MNAzyme no sería activo y, por ello no se detectan bajas concentraciones de *“target”*. Por todo ello, a la vista de los resultados obtenidos, una concentración de MNAzyme de 4  $\mu M$  sería la que permite detectar concentraciones más bajas de *“target”*, observándose un cambio de color en presencia de concentraciones de *“target”* de 100 pM o superiores. Dicha concentración ha sido seleccionada para el resto de experimentos.

Tabla 5 Puntos de las diferentes concentraciones de ADN "target" y MNzyme mediante el uso de placas TLC, para observar el grado de agregación del ensayo.

		Concentración MNzyme ( $\mu\text{M}$ )					
		0,5	1	2	4	6	8
Concentración ADN "target" ( $\mu\text{M}$ )	5000						
	2500						
	1000						
	500						
	250						
	100						
	50						
	0						

5.3.4. Optimización del tiempo de reacción (1ª etapa) y temperatura de incubación. Finalmente, tras la realización de las diferentes optimizaciones de los reactivos empleados, se ha llevado a cabo el estudio del efecto del tiempo y temperatura de incubación. Este estudio se ha llevado a cabo modificando el tiempo de incubación de la primera etapa (en la que tiene lugar la amplificación) y de la temperatura de incubación

de ambas etapas del ensayo, ya que se desea que la metodología se lleve a cabo en condiciones isotérmicas.

En la Tabla 6 aparecen recogidos los resultados obtenidos para los diferentes tiempos (20, 40, 60 y 80 minutos) y temperaturas (40°C, 45°C, 50°C, 55°C y 60°C) en presencia de ADN “target” (1000 pM) y en ausencia de ADN “target”.

*Tabla 6 Puntos obtenidos de las diferentes Tª y tiempos mediante el uso de placas TLC, para observar el grado de agregación del ensayo.*

		Concentración “target” 0 pM.				Concentración “target” 1000 pM.			
		20	40	60	80	20	40	60	80
Temperatura (°C)	Tiempo (min)								
	40°C								
	45°C								
	50°C								
	55°C								
	60°C								

A la vista de los resultados obtenidos en la Tabla 6, así como después de analizar los resultados obtenidos de las medidas espectrofotométricas (datos no mostrados), donde se presta especial atención a la longitud de onda, se observa que la temperatura óptima es de 50°C y, el tiempo de incubación de la primera etapa es de 60 minutos, puesto que es donde se observan los mejores resultados y, por lo tanto, el cambio de color más claramente.

#### 5.4. Evaluación de los resultados mediante análisis de parámetros RGB.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede ver que en ocasiones el cambio de color se aprecia muy fácilmente, mientras que en otras ocasiones es más difícil observar dicho

cambio. Por lo tanto, con objeto de disponer de una metodología robusta, que no dependa de la percepción del color del usuario, se han analizado los datos obtenidos mediante el estudio de parámetros RGB. Se representa a continuación en la Tabla 7 los resultados obtenidos en el ensayo en presencia de concentraciones crecientes de “target”.

Tabla 7 Puntos de las diferentes concentraciones de ADN “target” mediante el uso de placas TLC, para observar el grado de agregación del ensayo.

		Ensayo de Estudio
Concentración ADN “target” (pM)	5000	
	2500	
	1000	
	500	
	250	
	100	
	50	
	0	

Además, se representa en la Tabla 8 la variación de la longitud de onda con dos concentraciones, en presencia de “target” (5000 pM) y ausencia.

Tabla 8 Valores de  $\lambda$  en presencia y ausencia de “target”.

["target"] (pM)	$\lambda$ (nm)
-----------------	----------------

<b>5000</b>	<b>522</b>
<b>0</b>	<b>530</b>

Mediante el estudio del SPR, se observa la agregación de AuNPs en ausencia de “target” por el desplazamiento de  $\lambda$ , como se observa en la Tabla 8, debido a que no se activa la acción catalítica del complejo MNAzyme – AuNPs.

Además, se ha llevado a cabo el análisis de muestras de ADN de *Enterococcus faecalis* y de *Streptococcus agalactiae*, donde, al estar presente la secuencia “target”, se esperaría un resultado del ensayo positivo.

Además, como control negativo se añade una secuencia de mRNA, donde al no poseer la secuencia “target”, no formará un duplex con los MNAzyme y, por lo tanto, las AuNPs se observarán agregadas (no activa el centro catalítico). Se representa en la Tabla 9 y 10 los estudios descritos anteriormente.

Tabla 9 Diferentes concentraciones de región universal de las bacterias de estudio, mediante el ensayo AuNPs – MNAzyme y su diferente agregación.

	Ufc /mL		
	<b>10<sup>4</sup></b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>			
<b><i>Streptococcus agalactiae</i></b>			

Tabla 10 Ensayos de mRNAs como controles negativos del ensayo (ensayo agregado).

<b>mRNA 15S</b>	<b>mRNA 21S</b>
	

Se observan en la Tabla 9 y 10 las concentraciones a las cuales el ensayo es capaz de detectar la región de ADN universal de las bacterias, donde se observa un cambio de color para concentraciones superiores a  $10^5$  Ufc/mL. Mientras que los mRNAs estudiados se ven agregados (se encuentran en concentración 2500 pM), siendo un control negativo y, demostrando la funcionalidad del método.

La metodología que se desarrolla, se lleva a cabo utilizando ARN 16S de la unidad ribosomal, el cual es un polirribonucleótido de, aproximadamente, 1500 nucleótidos codificado por el gen *rrs* (en bacterias, los genes que codifican los ARN ribosomales se encuentran organizados en operones) y, también es denominado ADN ribosomal 16S (por ello, durante el Trabajo Fin de Máster se denomina ADN a la secuencia utilizada en los ensayos realizados) [22] [23].

La identificación mediante la utilización de estas secuencias de ARN 16S representa una ventaja con respecto a otras técnicas convencionales (como se comenta en el punto 1. *Introducción*), fundamentalmente ya que, en los ribosomas, en la subunidad pequeña 30S, hay unas 30000 copias de este ARNr 16S, lo cual conlleva a esa ventaja comentada para la realización del ensayo, tanto en tiempo como en precisión [23] [24].

A pesar de que los resultados se pueden detectar a simple vista, siendo rosa para un resultado positivo y morado para un resultado negativo, la sensibilidad de los resultados se puede mejorar mediante la técnica de descomposición rojo, verde y azul (RGB).

Se realiza una descomposición en parámetros RGB de la Tabla 7, para la búsqueda de linealidad en el calibrado de diferentes concentraciones de ADN “*target*”. Dichos parámetros de color se obtienen mediante el uso de PowerPoint, empleando el “cuentagotas” para observar los valores de cada parámetro.

Cada punto se mide tres veces, puesto que no posee el mismo color en toda el área de la placa TLC. Posteriormente, se representan cada parámetro frente a la concentración de ADN “*target*” y, se realiza una representación gráfica y un ajuste lineal para observar los comportamientos de cada parámetro.

Se puede calcular el LOD del método a utilizar, mediante la **Ecuación 7**, siendo tres veces la desviación estándar ( $S_b$ ) entre la pendiente de la recta.

$$LOD = \left(3 * \frac{S_b}{m}\right)$$

Ecuación 7 Cálculo del LOD del método

Posteriormente, los datos se representan con las Ecuaciones 1, 2 y 3 de la sección 1.6. *Análisis cuantitativo mediante el estudio colorimétrico (RGB)*, donde el valor de cada número se divide entre la suma de todos, obteniendo un porcentaje para cada color.

En las Figuras 15, 16 y 17 se exponen las representaciones lineales de R, R\*G y R+G frente a la concentración de ADN "target" y, posteriormente se representan sus LOD.

Las representaciones de B y G frente a la concentración de "target" se rechazan puesto que no se consideran lineales, generando un valor de R<sup>2</sup> bastante pobre en comparación con las comentadas anteriormente.

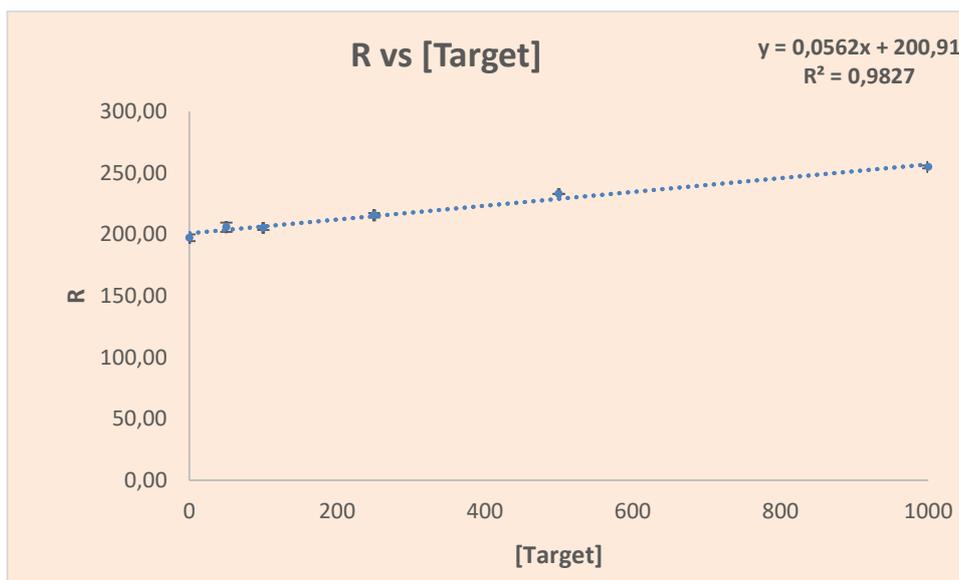


Figura 15 Representación gráfica del parámetro R frente a la concentración de ADN "target". Representación obtenida mediante Office Excel.

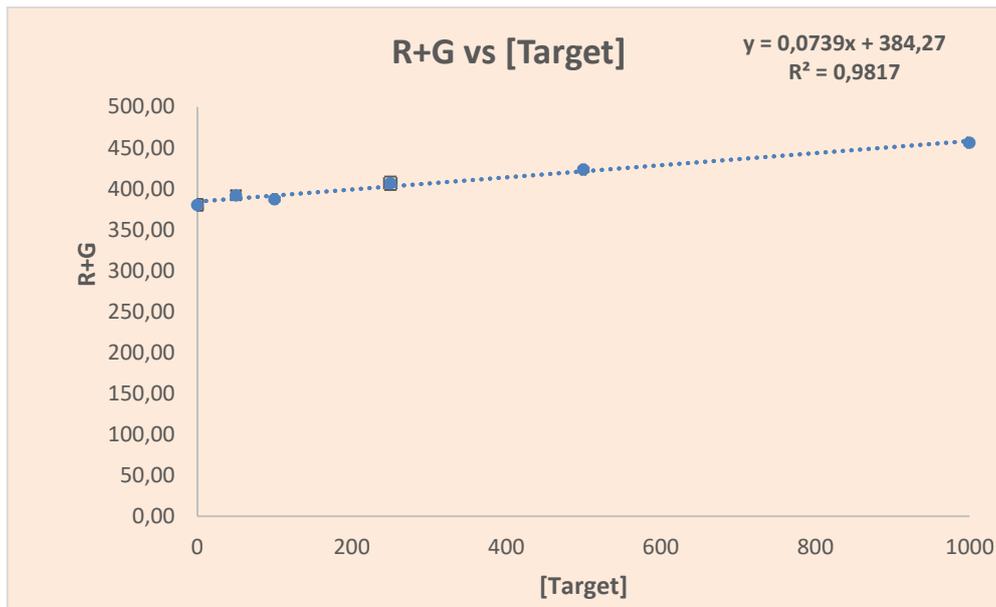


Figura 16 Representación gráfica de R+G frente a la concentración de ADN "target". Representación obtenida mediante Office Excel.

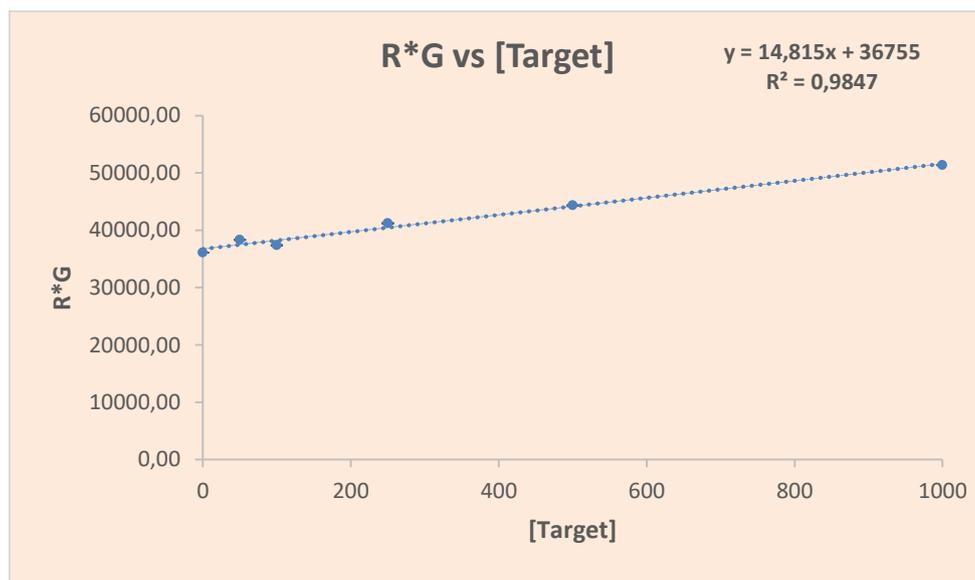


Figura 17 Representación gráfica de R\*G frente a la concentración de ADN "target". Representación obtenida mediante Office Excel.

Tras la representación de dichas gráficas (Figura 15, 16 y 17), se comprueba que representando de las tres formas estudiadas se obtienen una muy buena linealidad, con una  $R^2=0,98$  en los tres casos. El rango lineal de la gráfica R\*G frente a ["target"] es el más amplio de las tres representaciones (y por lo tanto cubriría más puntos), al igual que

la mínima concentración apreciable, calculada mediante el LOD del método, el cual posee un LOD=54 pM. Mientras que la representación del parámetro R frente a ["target"] posee un LOD=65 pM y finalmente, la representación de R+G frente a ["target"] un LOD=77 pM, no mejorando casi la mínima concentración apreciable con respecto a la técnica de apreciación a simple vista mediante placas TLCs.

Una vez representadas las diferentes correlaciones de los parámetros con carácter lineal con respecto a la concentración de ADN "target", se calculan con las **Ecuaciones 1,2 y 3** el porcentaje de cada color, siendo útil únicamente el porcentaje de color rojo, representándose en la Tabla 11.

*Tabla 11 Tabla de valores con el porcentaje de cada color descompuesto en Rojo, Verde y Azul.*

[Target] (pM)	PR (%)	PG (%)	PB (%)
2500	39,0	30,5	30,5
1000	38,7	30,6	30,7
500	37,5	30,6	31,8
250	35,5	31,4	0,331
100	35,2	31,2	33,6
50	35,4	32,0	32,6
0	34,8	32,3	32,9

Como se observa en la Tabla 11, el porcentaje de rojo es el mayor con respecto al resto de componentes.

Finalmente, estos valores únicamente se utilizan ilustrativamente y como información acerca del porcentaje de cada color, puesto que finalmente el ensayo se basa en las representaciones de R con otra variable, en este caso la suma y multiplicación con G.

A la vista de los resultados obtenidos, la gráfica con una mayor linealidad y con una mejor sensibilidad sería la que representa R\*G frente a la [target]. En el apartado 6. *Conclusiones* se explica más en profundidad dicha elección.

## 6. CONCLUSIONES

En primer lugar, se caracterizan las AuNPs sintetizadas mediante el método de Turkevich para la obtención de nanopartículas de un tamaño aproximado de 15 nm. Se caracterizan mediante el DLS y TEM y, posteriormente mediante UV-Vis. El tamaño obtenido mediante el TEM es de **14 ± 3 nm**.

Para seleccionar la proporción ADN-AuNPs se realiza una electroforesis en gel de agarosa. Los resultados obtenidos indican que, a partir de una relación molar de 150:1, la superficie de las AuNPs está saturada. Por este motivo, se selecciona una proporción de 200:1, asegurando que las hebras de ADN queden orientadas hacia fuera debido a repulsiones electrostáticas.

Una vez caracterizados los bioconjugados, se llevaron a cabo diversos estudios que influyen en la respuesta de la metodología ante la presencia de la secuencia de interés. Los parámetros experimentales seleccionados son: **50 nM de ADN “linker”, Tiempo de 60 minutos y Tª de 50°C, 4 µM de MNAAzyme y 200 mM de MgCl<sub>2</sub>**.

Se emplean placas de TLC para la interpretación de los resultados a simple vista y, en base a espectros de absorbancia para el tratamiento de los datos experimentales, observando cambios en la longitud de onda de las muestras en las que el complejo AuNPs - MNAAzyme no tendría acción catalítica y, por lo tanto, visualmente se vería agregado.

Con objeto de evaluar la aplicabilidad del ensayo a muestras reales, se miden muestras de ADN extraído (con distintas diluciones), de dos bacterias conocidas (*Enterococcus faecalis* y de *Streptococcus agalactiae*), dando lugar a resultados positivos, y de dos mRNAs como controles negativos, ya que no poseen dicha secuencia universal bacteriana.

Mediante los puntos observados en las placas de TLCs, se observa un cambio de color para concentraciones de “target” de 100 pM, para mejorar la mínima concentración que se puede detectar se hace uso de la técnica de RGB, a priori con una mayor sensibilidad. Mediante esta técnica, se descomponen los colores obtenidos en el rojo, verde y azul (RGB).

Tras la realización de diversas representaciones gráficas mediante combinación de parámetros, los resultados más interesantes se obtienen en la representación de R\*G frente a la concentración de ADN “*target*”. Se obtiene una  $R^2=0,9847$  y un LOD=54 pM, mejorando considerablemente la concentración mínima que se puede detectar con respecto a los puntos observados en las placas TLCs. Además de tratarse del mejor coeficiente de correlación, posee un límite de detección más bajo en comparación con los otros estudios realizados, por lo que se propone dicha representación para futuros ensayos y estudios posteriores.

Finalmente, como conclusión de este Trabajo Fin de Máster, el sistema MNAzyme – AuNPs permite la detección colorimétrica en apenas 80 minutos de ensayo, siendo una principal ventaja frente a otros ensayos como, por ejemplo, los hemocultivos. La concentración mínima capaz de detectarse mejora con el uso de la técnica de RGB, obteniendo resultados fiables y reproducibles.

Las características del método desarrollado, en principio parecen favorables para la aplicación del diagnóstico de sepsis de transmisión vertical en neonatal, pero habría que realizar una mayor cantidad de estudios para la optimización total y global del ensayo de estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Y. Aujard. Infecciones neonatales (II). *Editions scientifiques et Médicales Elsevier SAS*. 2001.
- [2]. C. Poggi, C. Dani. Sepsis and Oxidative Stress in the Newborn: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Targets. *Hindawi. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-14. 2018.
- [3]. B. Fernández Colomer, J. López Sastre, G.D. Coto Cotallo, A. Ramos Aparicio, A. Ibáñez Fernandez. Sepsis del recién nacido. *Servicio de Neonatología. Asociación Española de pediatría (AEP)*. 189-206. 2008.
- [4]. M. Cardetti, S. Rodriguez, A. Sola. Uso (y abuso) de antibióticos en la medicina perinatal. *An. Pediatr (Barc)*. 207.e1-e7. 2020.
- [5]. K. Zagorovsky, W.C.W. Chan. A plasmonic DNAzyme strategy for point-of-care genetic detection of infectious pathogens. *Angewandte Chemie - International Editions*. 3168-3171. 2013.
- [6]. E. Mokany, S.M. Bone, P.E. Young, T.B. Doan, A.V. Todd. MNAzymes, a versatile new class of nucleic acid enzymes that can function as biosensors and molecular switches. *Journal of the American Chemical Society*. 1051-1059. 2010.
- [7]. E.M. Linardy, S.M. Erskine, N.E. Lima, T. Lonergan, E. Mokany, A.V. Todd. EzyAmp signal amplification cascade enables isothermal detection of nucleic acid and protein target. *Journal of the American Chemical Society*. 1051-1059. 2010.
- [8]. Royal Society and Royal Academy of Engineering. Nanoscience and Nanotechnologies: opportunities and uncertainties. 2004. 16-52.
- [9]. K.A. Willets, R.P. Van Duyne. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 97-267.2007.
- [10]. M. Ren, S. Wang, C. Cai, C. Chen, X. Chen. A simple and sensitive resonance light scattering method based on aggregation of gold nanoparticles for selective detection in microRNA-21. *RSC Adv*. 83077-83083. 2016.

- [11]. X. Xie, W. Xu, X. Liu. Improving colorimetric assays through protein enzyme-assisted gold nanoparticle amplification. *Accounts of Chemical Research*. 1511-1520. 2020.
- [12]. W. Zhao, M.A. Brook, Y. Li. Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*. 2363-2371. 2008.
- [13]. L. Mereuta, A. Asandei, I.S. Dragomir, I.C. Bucataru, J. Park, C. Ho Seo, Y. Park. Sequence-specific detection of single-stranded DNA with a gold nanoparticle-protein nanopore approach. *Scientific Reports*. (10):11323. 2020.
- [14]. H. Kozłowski, M.A. Abdou Mohamed, J. Kim, K. Zagorovsky, S. Mubareka, C. Chan. A colorimetric test to differentiate patients infected with influenza from COVID-19. *Small Structures*. (2):210034. 2021.
- [15]. Y. Liu, J. Ling, C.Z. Huang. Individually color-coded plasmonic nanoparticles for RGB analysis. *Chemical Communications*. 8121-8123. 2011.
- [16]. B. Zheng, J. Li, C. Zhang, Z. Zhang, J. Hong, Y. Li, J. Wang. Rapid colorimetric detection of arsenic (III) by glutathione functionalized gold nanoparticles based on RGB extracting system. *Optics and Laser Technology*. 2021.
- [17]. J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier. The formation of colloidal gold. *The Journal of Physical Chemistry*. 670-673. 1953.
- [18]. Technical Note. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. *Malvern Instruments Limited*. 2017. Consultado 09/07/2023.
- [19]. X. Liu, M. Atwater, J. Wang, Q. Huo. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces. ScienceDirect*. 3-7. 2007.
- [20]. N. Raval, R. Maheshwari, D. Kalyane, S.R. Youngren-Ortiz, M.B. Chougule, R.K. Tekade. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. *Basic Fundamentals of drug delivery. Elsevier Inc*. 369-400. 2019.

- [21]. R. Amaru, R. Peñaloza, H. Miguez, G. Torres, H. Cuevas. UMSAgen, método para la extracción simultánea de RNA y DNA para diagnóstico molecular. *Cuaderno Hospital Clínico Vol.53*. 2008.
- [22]. K. Zagorovsky, M. T. F. Fernandez-Argüelles, D. Bona, A. M. Elshawadfy, A. M. Syed, P. Kadhiresan, T. Mazzulli, K. L. Maxwell, W. C. W. Chan. Gold Nanoparticles Smartphone platform for Diagnosing Urinary Tract Infections. *ACS publications NANOSCIENCE*. 324-332. 2022.
- [23]. M. R. Rodicio, M. C. Mendoza. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 238-245. 2004.
- [24]. R. Poretsky, L. M. Rodriguez, C. Luo, D. Tsementzi, K. T. Konstantinidis. Stregths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. *PLOS ONE volume 9*. 1-12. 2014. Revisado 12/07/2023.