



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Posgrado en Ciencias (Química)

***“Estudio de la interacción entre DNA y nanopartículas
metálicas de oro y plata: Hacia el diseño de
biosensores.”***

TESIS

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Química)

Presenta

Q. Esteban Álvarez Hernández
2211800530
este_141@hotmail.com

Directora de tesis:

Dra. Liliana Irais Vera Robles

Jurado:

Presidente:

Dr. Nikola Batina Skeledzija

Secretaria:

Dra. Liliana Irais Vera Robles

Vocal:

Dr. Alfonso Ramón García Márquez

Iztapalapa, Ciudad de México, 13 marzo 2025

ABREVIATURAS

Acetato de potasio	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)
Ácido acético glacial	CH_3COOH
Ácido ascórbico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$
Ácido cítrico	CH_3COOH
Ácido clorhídrico	HCl
Ácido cloro áurico trihidratado	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla	ssDNA
Ácido desoxirribonucleico de doble cadena	dsDNA
Agua ultrapura desionizada	H_2O (miliQ)
Borohidruro de sodio,	NaBH_4
Bromuro de cetil trimetilamonio	$\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ (CTAB)
Citrato trisódico	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$
Dispersión dinámica de luz	DLS
Dodecilsulfato sódico	SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)
Espectrofotometría Infrarrojo	IR
Espectrofotometría Ultravioleta-visible	UV-Vis
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$
Hidróxido de amonio	NH_4OH
Hidróxido de sodio	NaOH
Microscopía electrónica de transmisión.	TEM
Nanómetro (1×10^{-9} m)	nm
Nanopartícula	NP
Nanopartícula de Oro	AuNP
Nanopartícula de plata	AgNP
Nanopartícula Metálica	NPM
Nitrato de plata	AgNO_3
Pares de Bases	pb
Plasmón de resonancia superficial	PRS
Plasmón de resonancia superficial Localizado	RPS-L
Ribonucleasa	Rnasa
Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Tris base	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa por ser mi cimiento de enseñanza y aprendizaje.

Al departamento de Química y Posgrado en Ciencias Químicas por ser mi segundo hogar, por brindarme todo lo necesario para tener los conocimientos y valores necesarios para convertirme en un gran profesionista y una mejor persona.

Al área de Biofísicoquímica, por todo el apoyo y las facilidades otorgadas durante este proyecto.

A mi asesora, la Dra. Liliana Irais Vera Robles y demás doctores del área, por darme la oportunidad de pertenecer a este proyecto y creer en mí.

A los profesores del departamento de Química de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa por todo su apoyo, por siempre guiarme e impulsarme a crecer.

Al Laboratorio Central de Microscopia Electrónica UAM-I.

Por todo el apoyo brindado. ¡Muchas Gracias!

DEDICATORIA

“Nada es suficiente para quien lo suficiente es poco”.

Epicuro

A mis padres, por ser ese modelo a seguir, por enseñarme a luchar por mis sueños, por darme las herramientas necesarias para enfrentarme a la vida, por siempre estar a mi lado, hasta en sus últimos momentos de mi padre, brindándome su calor, cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanos, por acompañarme en las lágrimas más amargas y en las mejores sonrisas, por su cariño y apoyo, por protegerme y ser mis compañeros de vida.

A mi abuelita materna, por estar siempre ahí, por su amor incondicional, por ser mi ángel en la tierra y en el cielo, por tener la palabra y el abrazo en el momento exacto, por creer en mí y nunca dejarme caer, la mejor abuelita del mundo.

A mi abuelito paterno, por enseñarme a ser una persona correcta y derecha, y enseñarme que la vida no es sencilla y hay que luchar por alcanzar las cosas.

A mi novia Susana, por todo el tiempo que hemos estado juntos, estar siempre a mi lado, su apoyo incondicional, los momentos felices, momentos difíciles, por todo lo que es ella. Le agradezco y la amo como a nadie.

A mis amigos de toda la vida, Iván, Víctor, Oscar, Rodolfo, Christian, pero en especial a Alex, José Luis, Juan José, Brenda, al profesor Fernando III del CB7, por apostar por mí, por ser mi familia en la universidad, por estar ahí en los buenos y malos momentos, por sostenerme, por la pláticas, por todo su apoyo y comprensión. ¡Gracias!

A todos mis seres queridos, a los que están y los que ya no, su amistad, cariño y amor, que me ha impulsado a seguir adelante.

Esteban Álvarez Hernández

Resumen

En este proyecto, proponemos el uso de nanopartículas (NP) de oro y plata (AuNP y AgNP); para reconocer la presencia de secuencias específicas de DNA, mediante el viraje de color de las soluciones coloidales, debido al desplazamiento del fenómeno de resonancia del plasmón superficial localizado (RPS-L) de las NP.

La RPS-L es un tipo especial de plasmón asociado a la superficie de las NP de los metales nobles como el Au y la Ag, este fenómeno es provocado por las oscilaciones colectivas de electrones (e^-) en la superficie de las NP cuando interaccionan con un campo eléctrico, y dependen, entre otros factores, del tipo de morfología de las NP, composición química y tamaño. Para que este fenómeno suceda, la NP tiene que ser de un tamaño mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente, diámetro $\ll$ longitud de onda ($d_{NP} \ll \lambda$). En las NP de Au y Ag el fenómeno de la RPS-L se presenta desde aproximadamente 300 nm hasta 700 nm, cayendo en intervalo de la luz visible, haciendo de este una herramienta útil en ensayos colorimétricos.

Debido al tamaño nanométrico de las NP estas deben estabilizarse con agentes de *capping*, que pueden ser sustituidos por otros tipos de moléculas, proceso conocido como funcionalización. Recientemente, ha habido un interés por funcionalizarlas con biomoléculas como enzimas, péptidos, proteínas, anticuerpos u oligonucleótidos, de tal manera que altere o modifique la RPS-L, y así emplearlo como técnica de detección colorimétrica.

En este trabajo, el objetivo es buscar secuencias específicas de DNA, para lo cual se diseñaron oligos (complementario y con mutaciones) para el Gen VIII del DNA plásmidico M13mp18. El oligo complementario se hibridaría al DNA objetivo, desprotegiendo la superficie de las NP provocando la coalescencia de estas, lo que modificaría su RPS-L y el color de la solución coloidal, lo cual nos indicaría la existencia de un gen en particular. Este tipo de ensayo sería de utilidad en el futuro para el desarrollo de biosensores colorimétricos específicos.

En este trabajo se investigaron este tipo interacciones, utilizando NP de metales nobles (Au y Ag) con oligos para Gen VIII contenido en el DNA plasmídico M13mp18, los cuales provocaron un cambio de color y modificaron la RPS-L, desplazando hacía el rojo, lo cual pudo observarse incluso a simple vista. Este fenómeno se estudió por diferentes métodos de caracterización, para entender los cambios ocurridos y proponer en el futuro el diseño de un *Biosensor* de fácil uso, acceso y económico.

Tabla de contenido

Capítulo 1	1
Antecedentes	1
1. Introducción	1
1.1. Técnicas convencionales de detección de ácidos nucleicos.....	2
1.2. Biosensores.....	7
1.2.1. Biosensores basados en elemento de reconocimiento biológico.	7
1.2.2 Biosensores basados en sistema de transducción.....	8
1.2.3 Sensores colorimétricos basados en agregación de nanopartículas.....	9
1.3. Nanopartículas metálicas de Au y Ag.....	11
1.3.1. Estabilidad de las nanopartículas	14
1.3.2 Las nanopartículas de Au y Ag y el DNA	16
1.3.3. Síntesis de nanopartículas	19
1.3.4 Aplicaciones de las nanopartículas metálicas.	19
1.4. DNA (Ácido desoxirribonucleico)	21
1.4.1. Complementariedad del DNA.....	23
1.4.2. Mutaciones	25
1.5. DNA plasmídico y el fago M13mp18	26
Capítulo 2	29
Justificación y Objetivos.....	29
2. Justificación	29
2.1. Objetivos específicos	30
Capítulo 3	31
3. Materiales y Metodología.....	31
3.1. Reactivos.....	31
3.2. Metodología	31
3.2.1. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP)	31
3.2.2. Metodología de síntesis de AuNP.....	31
3.2.3 Preparación de la solución <i>stock</i> de Au (Solución de crecimiento).....	32
3.2.4 Síntesis de AuNP de diferente tamaño (5.5, 8.0, 17.0 y 35.0 nm).....	32
3.3. Síntesis de AgNP de 3.5 nm	34

3.3.1 Metodología de síntesis de AgNP de 30 a 60 nm.	34
3.4. Síntesis y purificación de DNA.....	35
3.4.1 Purificación de DNA	36
3.5 Diseño de los Oligonucleótidos	37
3.6. Interacción NP-Oligo-DNA	39
3.7. Técnicas de caracterización	40
3.7.1. Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis).	40
3.7.2. Espectroscopia de dispersión dinámica de luz (<i>Dynamic Light Scattering</i> “DLS”)	40
Determinación de la distribución de tamaño de partículas.	40
3.7.3. Electroforesis	41
3.7.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	41
Capítulo 4	42
4. Resultados y discusión	42
4.1. Caracterización de las nanopartículas de Au y Ag.	42
4.2 Espectrofotometría UV-Vis.....	43
4.3 Espectroscopia dinámica de luz.....	45
4.4 Microscopia Electrónica de Transmisión.....	45
4.5 Electroforesis horizontal en un gel de agarosa.	48
4.6 Estabilidad de las nanopartículas.....	50
4.7. Caracterización del DNA.	52
4.8. Funcionalización de las NP con el oligo de DNA.....	53
4.9. Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AuNP17-oligoA con dsDNA.	54
4.10. Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AuNP17-oligoA con ssDNA.....	58
4.11. Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AuNP17-oligoCN con dsDNA.	64
Capítulo 5	66
5. Interacción AgNP-DNA.....	66
5.1 Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AgNP30-oligoA con dsDNA....	66
5.2 Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AgNP30-oligoA con ssDNA.	71
5.3. Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AgNP30nm-Oligo B y CP - dsDNA.....	74

5.4. Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AgNP30nm-Oligo-ssDNA	76
Capítulo 6	79
6. Conclusiones y perspectivas	79
6.1 Conclusiones	79
6.2. Perspectivas	80
Capítulo 7	81
7. Referencias	81

Capítulo 1

Antecedentes

1. Introducción

La ciencia y tecnología de novedosos materiales presentan como uno de sus principales objetivos el desarrollo, diseño y preparación de nuevos componentes, una vez procesados, éstos presentan propiedades que los hacen aptos u óptimos para la aplicación de interés. Entre las tecnologías de nuevos materiales, la nanotecnología es una de las disciplinas con mayor desarrollo e influencia científica en los últimos años.

La nanotecnología es la ciencia que estudia, desarrolla e investiga “objetos” a escala nanométrica en el orden de 1 a 100 nanómetros (nm); La manipulación de las condiciones de síntesis permite un control racional del tamaño y la forma de las partículas y proporciona los medios para personalizar las propiedades del material para una aplicación específica. Las propiedades y características de las nanopartículas (NP) y las nanopartículas metálicas (NPM), difieren notablemente de las partículas macro y microscópicas, lo cual las hace novedosas debido a sus características físicas y químicas únicas, como superficie química, tamaño, morfología y compatibilidad con la funcionalización de la superficie, uso simple y propiedades ópticas. Siendo utilizadas en diferentes campos de investigación [1-3].

La NPM con propiedades únicas y amplias aplicaciones en biomedicina son las NP de oro (AuNP), estas tienen una importancia relevante en la nanotecnología ya que tienen diversas aplicaciones en *biodetección*; sus aplicaciones más comunes incluyen biosensores electroquímicos, desarrollo de vacunas, administración de fármacos, biosensores, inmunoensayos y detección. La base de esta amplia gama de usos de estas partículas son las propiedades físicas y químicas únicas de ellas [1].

Dadas las propiedades físicas y químicas específicas de las NP, incluidas las de oro y plata, se pueden utilizar como sensores biológicos y químicos en métodos de detección de materiales y analitos [1]. El uso de las NP, ha ido en aumento desde que *Michael Faraday* sintetizó por primera vez coloides de oro, alrededor de 1857 [4]. Posteriormente, el método sintético se simplificó gracias a *Turkevich y Frens* [4], Por ello, son muy estudiadas, ya que

son, relativa y fácilmente reproducibles en el laboratorio, esto ha hecho que las NP sean cada vez más utilizadas en la industria [5].

En el mundo de la nanotecnología, elementos nobles como las NP de oro, plata y paladio (Au/Ag/Pd) son la tendencia emergente más prometedora para diseñar materiales de bioingeniería que podrían utilizarse como dispositivos y herramientas de diagnóstico moderno para enfrentar enfermedades graves. Las NP se consideran una herramienta química poderosa y avanzada para diagnosticar y curar enfermedades críticas como el VIH, el cáncer y otros tipos de enfermedades infecciosas [6]. De igual forma son utilizadas en electrónica, la informática, la catálisis, la cosmética, la medicina y el cuidado de la salud [6]. Una de las aplicaciones más relevantes de las NP, es su uso como agentes bactericidas y como parte de biomarcadores en métodos de detección. Las NP funcionalizadas con biomoléculas se utilizan en gran medida como vehículos de distribución en farmacología y cosmetología [7].

Las soluciones coloidales de NPM muestran colores intensos y muy brillantes debido a su interacción con la luz visible. Esta característica óptica surge gracias a los electrones libres en la superficie de las NPM que permanecen en una oscilación colectiva produciendo un estado de plasma superficial. Los plasmones de superficie de NPM resuenan a una frecuencia particular y a este fenómeno se le denomina resonancia del plasmón de superficial localizada (RPS-L). La oscilación de la RPS-L decae al irradiar su energía y convertirla en luz dispersa. La composición, la forma de las NP, la geometría, el grado de interacción con partículas adyacentes, la función dieléctrica de las NPM y la presencia de objetos dieléctricos cercanos determinan la dispersión de la luz [8].

1.1. Técnicas convencionales de detección de ácidos nucleicos

El descubrimiento del ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés), por Friedrich Miescher, acaeció en el año 1869; Friedrich descubrió una sustancia con propiedades inesperadas que no coincidían con las de las proteínas; había obtenido la primera purificación bruta del DNA. Debido a su presencia en los núcleos de las células, denominó a la nueva sustancia “nucleína”; término que aún se conserva en el nombre actual de ácido

desoxirribonucleico. Este biopolímero está formado por carbono (C), hidrogeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N) y fosforo (P), a través de unidades monoméricas conocidas como bases nitrogenadas y se encuentra presente en todos los seres vivos [9].

Fue hasta la década de 1940, cuando Oswald T. Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty hicieron la demostración de que la molécula hereditaria era el DNA, y no las proteínas como se pensaba anteriormente; se comprendió también que la síntesis de proteínas está codificada en los genes [9]. Diez años después, en 1953, luego de numerosos experimentos, James Watson y Francis Crick descifraron la estructura del DNA, y con esto, otra década más tarde el código genético. Una vez conocida la estructura del DNA como una molécula conformada por una doble cadena ondulada en forma de espiral, en la que cada una de las cadenas está unida por puentes de hidrógeno que enlazan moléculas de Adenina/Timina (A-T) y Guanina/Citosina (G-C), fue posible explicar el proceso de replicación de DNA [9].

Así como el desarrollo en la identificación de **genes** que componen el genoma de un organismo ha tenido un incremento exponencial; las diferencias en la secuencia de las proteínas, son consecuencia de la secuencia del gen y debido a la complementariedad del DNA, podemos emplear estas características para identificar secuencias específicas, mediante el diseño y uso de “**sondas**” o “**primers**” específicos conocidos comúnmente como oligos (oligonucleótidos con secuencia corta de DNA o RNA,) Por ello, si los oligos, son complementarios y antiparalelos entre sí, estos nos permitirán distinguir genes particulares de especies diferentes, incluso genes existentes sólo en organismos específicos.

La importancia de la detección de patógenos en varios sectores ha llevado a una mejora continua en las tecnologías de detección. Hoy en día, los métodos más comunes de detección de organismos patógenos se pueden dividir en tres categorías: cultivo y recuento de colonias, ensayos inmunológicos y métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [10]. La llegada de la PCR transformó radicalmente la ciencia biológica desde el momento en que fue descubierto por primera vez por Mullis en 1983 (ganador del premio Nobel en 1993) [11].

La técnica de PCR tiene como objetivo la amplificación de fragmentos de DNA acotados por *primers* específicamente diseñados de acuerdo a su secuencia de nucleótidos. Es la técnica más utilizada en laboratorios clínicos para diagnosticar enfermedades, clonar y secuenciar genes, y es considerado como el método de referencia por su sensibilidad, sencillez y accesibilidad. Las pruebas detectan el DNA o el RNA de un patógeno (organismo o virus que causa una enfermedad), o células anormales en una muestra. A diferencia de muchas otras pruebas, la técnica de PCR puede encontrar signos tempranos del desarrollo de una enfermedad a través de la detección de cantidades anormales de mRNA en una muestra en la fase más temprana de una infección **[10-11]**.

Estos métodos brindan alta sensibilidad y especificidad, facilitando información tanto cuantitativa como cualitativa. Sin embargo, algunos inconvenientes son el tiempo de procesamiento requerido y la necesidad de equipos sofisticados. El recuento de colonias se considera como el estándar para la detección de patógenos en entornos que van desde el diagnóstico clínico hasta la medición de patógenos alimentarios. Este proceso implica el aislamiento y crecimiento de un patógeno sospechoso, seguido de una inspección visual. Debido a la amplificación inherente durante el crecimiento de la colonia, este método es bueno para identificar niveles muy bajos de organismos (es decir, células individuales). **[10, 8]**. Desafortunadamente, los tiempos para la obtención de resultados son muy lentos, al utilizar el recuento de colonias, debido a las largas etapas de incubación y la necesidad de mano de obra preparada. Dependiendo del patógeno, los resultados iniciales a menudo requieren por lo menos 2 días, con confirmación después de 6 a 10 días. Además, los métodos de recuento de colonias requieren que un patógeno sea cultivable, lo que puede no ser siempre el caso debido a los estrictos requisitos ambientales o nutricionales **[8, 10]**. Los ensayos inmunológicos son muy comunes para la detección de patógenos debido a su adaptabilidad a una amplia variedad de patógenos, incluidas bacterias y virus.

Las AuNP funcionalizadas con anticuerpos han podido superar estos desafíos mediante el uso de un formato de tira inmunocromatográfica a pesar de que hay productos disponibles que facilitan el análisis de alimentos y muestras clínicas. Las pruebas de productos alimenticios se ven facilitadas por los productos *Singlepath* y *Duopath* de Merck Millipore,

pero estos productos requieren un enriquecimiento selectivo de bacterias antes de analizar la muestra, debido a su baja sensibilidad y a los bajos umbrales de detección requeridos. Por lo tanto, el ensayo requiere varias horas para completarse, no obstante, el formato de tira inmunocromatográfica con AuNP puede responder en sólo 20 minutos [8, 10].

Los desafíos actuales de análisis que enfrentan los ensayos basados en un formato de tira inmunocromatográfica de NP son la variabilidad de resultados, causada por la preparación de muestras del usuario y la reactividad cruzada de los analitos, pero aun así este tipo de análisis ha tenido mayor éxito comercialmente hablando, ya que las AuNP coloidales son de fácil acceso y no requieren de equipos sofisticados debido a su capacidad para analizar muestras con mínima purificación [8, 10].

Las propiedades ópticas únicas de las NP metálicas las hacen muy populares para la detección de patógenos. La mayoría de estos ensayos se basan en el principio básico de la resonancia de plasmón superficial localizado (RPS-L) para detectar cambios en los estados de agregación de NP. Se han implementado los efectos ópticos de la RPS-L para la detección de patógenos mediante la inducción de la agregación de partículas o la estabilización. Estos efectos se rigen por ligandos *diana*, funcionalización de nanopartículas, sitios de unión competitivos. Las combinaciones específicas de estos factores conforman la amplia variedad de aplicaciones investigadas [8].

Las NP de unos cuantos nanómetros (entre 1-100 nm en al menos una de sus dimensiones) se encuentran en el mismo intervalo de tamaño que algunas biomoléculas como las enzimas, anticuerpos e incluso del DNA (**Figura 1**), por ello, estas NP son adecuadas y óptimas para interactuar con subunidades celulares o biomoléculas, permitiendo la elaboración de nuevos híbridos biomolécula-NP.

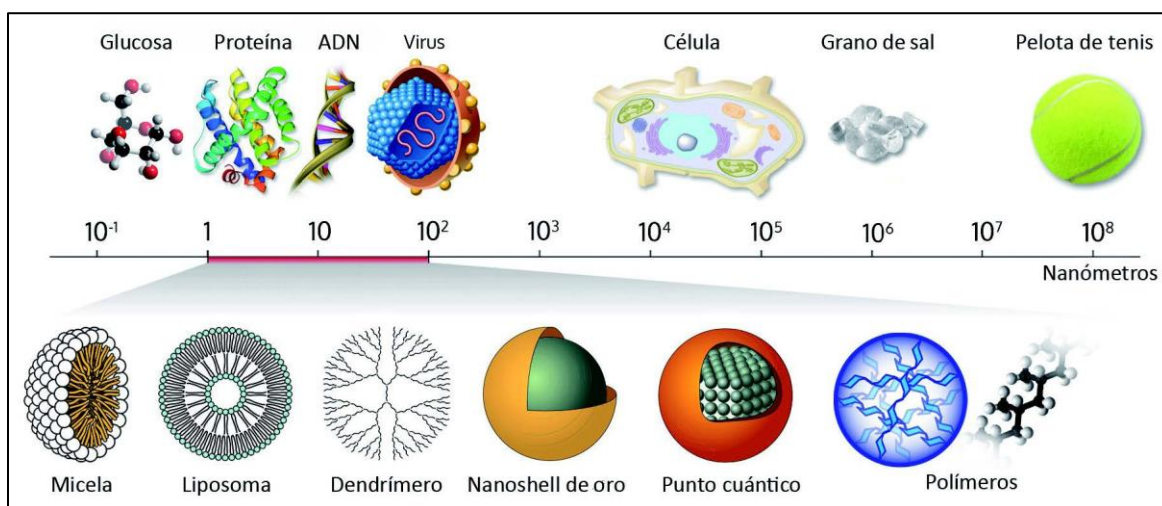


Figura 1. Escala de tamaño de nanomateriales respecto a tamaños de macromoléculas y otras entidades más grandes con una escala que indica el intervalo de tamaño de 0.1 a 10^8 nm. Modificada de la referencia [12].

La unión de las NP de oro y plata (AuNP y AgNP) a biomoléculas ha recibido una atención e interés creciente debido a las aplicaciones potenciales de estos nuevos materiales en disciplinas como la biología, la medicina y la nanotecnología [13]. Las AuNP han sido investigadas en la fabricación de biosensores, aplicaciones para diagnóstico, y en otros campos de la medicina, como la distribución de fármacos ya que además de sus propiedades ópticas asociadas (RPS-L), se pueden conjugar a un gran número de biomoléculas que van desde anticuerpos hasta DNA, pasando por tensoactivos, colorantes, entre otros. Las AgNP, no han sido tan estudiadas como las AuNP, y una gran ventaja que ofrecen es que son alrededor de 80 veces más baratas en comparación con las de Au, lo cual podría ayudar a que poblaciones con menos recursos, tuviesen acceso a este tipo de nuevas tecnologías de biodiagnóstico, conocidos como *biosensores*.

1.2. Biosensores

Un *biosensor*, es un dispositivo capaz de detectar y cuantificar un elemento biológico específico en una solución, al que llamaremos *analito*, con la peculiaridad de que lo hace a través de biomoléculas, es decir, utiliza moléculas biológicas para reconocer otras biomoléculas. Según la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), se define un biosensor como “un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con un elemento transductor”. En concreto, los biosensores son dispositivos que se combinan con un elemento de reconocimiento biológico (ERB), ya sea una enzima, un anticuerpo, o una biomolécula, e interactúa de forma selectiva con la molécula objetivo (el analito), generando una señal bioquímica en la que el elemento *transductor* convierte la señal eléctrica u óptica producida en una que pueda ser medible por el elemento *procesador de la señal*, el cual procesa o amplifica la señal producida por el transductor hasta reflejar el resultado final. La señal biológica que se procesa es proporcional a la concentración del analito [14-16]. Los biosensores se pueden clasificar en eléctricos, mecánicos u ópticos, según su naturaleza en la transducción de señal [17].

1.2.1. Biosensores basados en elemento de reconocimiento biológico.

Biosensores catalíticos: Se basan en reacciones catalizadas por macromoléculas que pueden estar presentes en su entorno biológico o que pueden haber sido aisladas y modificadas. Los más utilizados son:

Enzimáticos: Estos son los sistemas más estudiados debido a las propiedades de estas moléculas, como su alta selectividad y capacidad de respuesta rápida a sustratos específicos. La naturaleza catalítica de la enzima implica que una vez que ocurre la reacción, la enzima se regenera a su estado inicial y no requiere ningún tratamiento para restaurar el biosensor. Algunos biosensores trabajan con reacciones enzimáticas en cascada para aumentar su sensibilidad [18]. En algunos casos, puede ocurrir que uno de los productos de la reacción enzimática principal actúe como un inhibidor o que algunos inhibidores se

encuentren en solución. En estos casos, se utiliza una segunda enzima que reaccione con estas sustancias inhibidoras para que la reacción no se vea afectada [18].

Biosensores de afinidad: Se basan en la interacción de un analito con una molécula aislada de su medio biológico. Estos incluyen inmunosensores basados en la interacción antígeno-anticuerpo y macromoléculas proteicas o ácidos nucleicos [18].

1.2.2 Biosensores basados en sistema de transducción.

Biosensores ópticos: Según las propiedades ópticas del sistema transductor, pueden ser absorción, reflexión, fluorescencia, bioluminiscencia, RPS-L o espectroscopia UV-Vis. Las bandas de plasmones de superficie son la forma de detección óptica más utilizada [18].

La unión de biomoléculas específicas en la superficie de la NP da como resultado un cambio en la constante dieléctrica, y el espectro de AuNP o AgNP es muy sensible a esta interferencia. Este efecto provoca un cambio en la interacción entre la onda electromagnética y los electrones en la superficie de la NP. En los 90's, Englebienne observó que había un corrimiento de longitudes de onda más grandes en el espectro UV-Vis de las AuNP funcionalizadas con anticuerpos. Y se demostró que este cambio no se debió a la agregación de las AuNP sino al cambio del índice de refracción causado por la unión de ligandos específicos presentes en el anticuerpo [18-19].

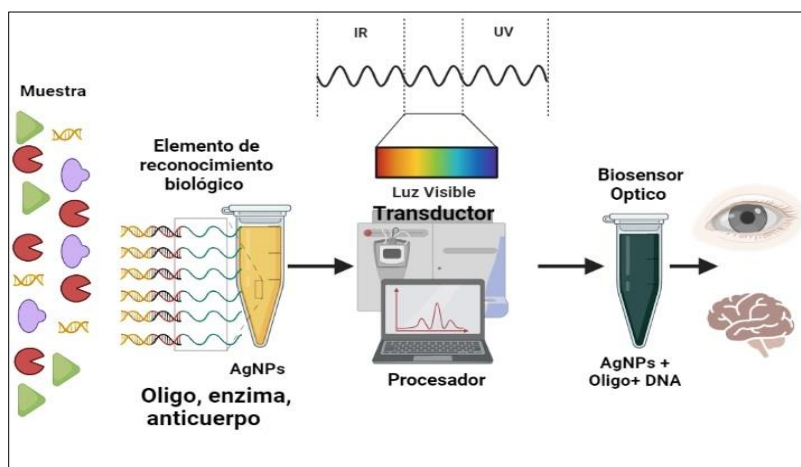


Figura 2. Esquema de un biosensor óptico de AgNP.

Imagen diseñada en *BioRender.com* [20].

Los biosensores ópticos se han clasificado en general en dos categorías generales: *label-free* y *label-based*. En donde, en una detección *label-free*, la señal detectada se genera directamente con la interacción en el sitio del analito y el transductor respectivo, o sea, el analito no se marca, ni se altera, para que se detecte en su estado natural o “nativo” donde la señal detectada es un resultado directo de la interacción del analito con el transductor. Mientras que una detección *label-based* incluye la participación de una etiqueta donde la señal óptica se produce en lo sucesivo con un medio colorimétrico (ver **Figura 2**), fluorescente o luminiscente. Destacan especialmente los biosensores plasmónicos, entre los que se encuentran los que se utilizan a través del fenómeno de RPS-L y la espectroscopia Raman de superficie [15, 21].

1.2.3 Sensores colorimétricos basados en agregación de nanopartículas

Los sensores colorimétricos pueden detectar la presencia de un compuesto específico mediante un cambio de color de la solución coloidal, esto se observan fácilmente a simple vista o con un detector óptico. Se pueden usar en ensayos colorimétricos debido a que son de fácil utilización, ya que no requiere capacitación del personal ni el uso de equipos complejos o de alto costo (como espectrofotómetros UV-Vis o infrarrojo, termocicladores de PCR, etc.), y tienen un bajo costo de producción. Las AuNP son uno de los materiales más utilizados y mayormente estudiados en este tipo de biosensores debido a sus propiedades fisicoquímicas, ya que su color puede modificarse por la agregación [22]. La agregación de AuNP induce interacciones y acoplamiento eléctrico dipolo-dipolo esto entre plasmones de partículas adyacentes o cercanas, lo que resulta en un cambio de color de rojo a morado, es decir, un desplazamiento hacia el rojo.

Los biosensores han tenido un incremento exponencial en las últimas décadas tanto en su investigación como en su desarrollo. Los biosensores, a lo largo de la historia, han demostrado en la industria que son un ejemplo de cómo una idea “simple” y con elegancia puede impulsar y ayudar a tener avances revolucionarios en ciencia y tecnología, con una enorme influencia en diversas áreas científicas como la medicina, la farmacología, la agricultura, entre otros. Este fenómeno se da debido a que tienen la solución a un gran número de problemas que pueden aplicarse en estas áreas [23, 24].

Por ejemplo, el trabajo de *Clark y Lyons* en 1962, quienes usaron una combinación de un sensor de oxígeno electroquímico (Electrodo de oxígeno de Clark), y la enzima glucosa oxidasa incorporada en una membrana de diálisis para demostrar la capacidad de medir cuantitativamente la glucosa en medios acuosos [25]. Luego, *Updike y Hicks* cubrieron el electrodo de oxígeno de Clark con una capa de gel de poliacrilamida que contenía glucosa oxidasa y así presentaron el primer "electrodo enzimático" para la determinación rápida y cuantitativa de glucosa, por otro lado, *Guilbault y Montalvo* usaron un electrodo de pH de vidrio con ureasa inmovilizada para medir concentración de urea [24].

Estos primeros estudios estimularon la integración de elementos de biorreconocimiento en transductores fisicoquímicos, y crearon dispositivos de detección. Al principio, el campo se centraba en gran medida en la inmovilización de enzimas en electrodos. Sucesivamente, el campo se amplió para incluir otros elementos de bioconocimiento como anticuerpos, células y ácidos nucleicos, y el término "electrodo enzimático" se transformó en "*biosensor*" [24].

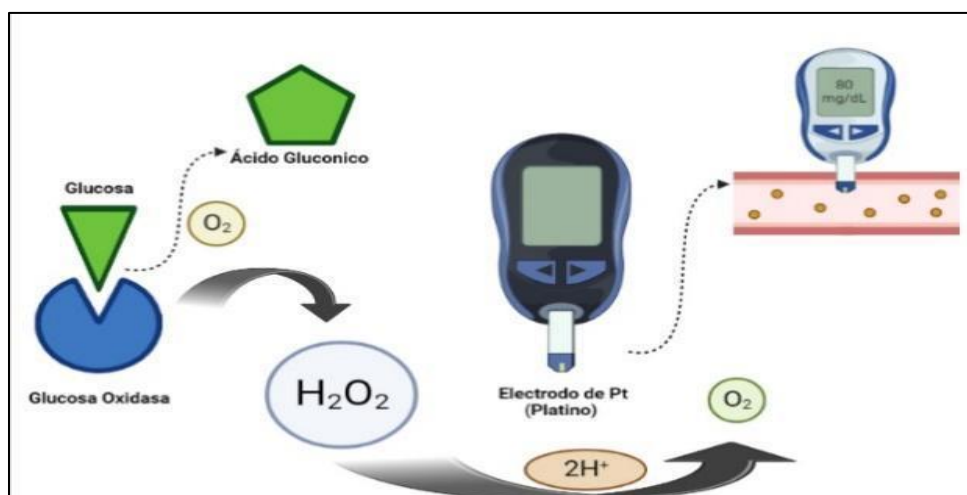


Figura 3. Esquema de un biosensor de glucosa. Imagen diseñada en BioRender.com [20].

Unos de los ejemplos más conocidos por el público en general que podemos mencionar como *biosensor* es el medidor de *glucosa* en sangre o *glucómetro* (ver **Figura 3**), y la *prueba de embarazo* casera. El primero de estos se basa en que la molécula de glucosa en sangre en la tira reactiva con la glucosa oxidasa y en presencia de oxígeno (O_2), producen ácido glucónico y peróxido de hidrogeno, el cual se une a un electrodo de platino (Pt), que es el

bio-transductor, ya que reacciona con el peróxido de hidrogeno, oxidándolo y produciendo oxígeno (O_2) y generando 2 protones ($2H^+$) en el proceso. Esto genera una señal de corriente eléctrica medible y produce la lectura de glucosa que podemos visualizar en la pantalla del dispositivo [26-28].

1.3. Nanopartículas metálicas de Au y Ag

La nanotecnología, se refiere a la rama de la ciencia y la ingeniería dedicada al estudio y elaboración de materiales con dimensiones del orden de 100 nm o menos, en al menos una de sus dimensiones. Ha sido ampliamente utilizada para el desarrollo de tecnología más eficiente. En los últimos años, la nanotecnología ha sido adoptada por los sectores industriales debido a sus aplicaciones en el campo de los sistemas electrónicos, la biotecnología, la separación magnética y la preconcentración de analitos objetivo, la administración dirigida de fármacos y los vehículos para la administración de genes y fármacos [29].

En general, las NP utilizadas en el campo de la biotecnología varían en tamaño de partícula entre 10 y 500 nm, rara vez superando los 700 nm. El tamaño de estas partículas permite diversas interacciones con biomoléculas en las superficies celulares y su posible aplicación en sistemas de administración de fármacos e imágenes no invasivas ofrece varias ventajas sobre los agentes farmacéuticos convencionales [29].

El oro coloidal, también conocido como AuNP, es una suspensión de partículas de oro de tamaño nanométrico. La historia de estas soluciones coloidales se remonta a la época romana, por ejemplo, la famosa “*copa de Licurgo*” [30], cuando se utilizaban para teñir vidrio con fines decorativos. Sin embargo, la evaluación científica moderna del oro coloidal no comenzó hasta que *Michael Faraday* en la década de 1850, observó que las soluciones de oro coloidal tienen propiedades que difieren del oro en bulto.

Las soluciones coloidales de algunas NPM como el Au y Ag, tienen características peculiares, porque muestran colores intensos que no presentan los mismos materiales a gran escala. Estas interesantes propiedades ópticas son debido a su interacción con la luz de una longitud de onda determinada, provocando una oscilación colectiva de la nube de

electrones, en la banda de absorción llamada resonancia de plasmón superficial localizada (RPS-L) [29].

Cuando las oscilaciones del campo electromagnético incidente están en resonancia con las del campo electromagnético local de las NP, se produce el fenómeno RPS-L. Así, RPS-L es la consecuencia del confinamiento del campo eléctrico dentro de un volumen pequeño cuyo radio es mucho menor que la longitud de onda y la densidad electrónica es entonces reorganizada, formando un dipolo que oscila con la frecuencia de la luz (ver **Figura 4**) [31] [32].

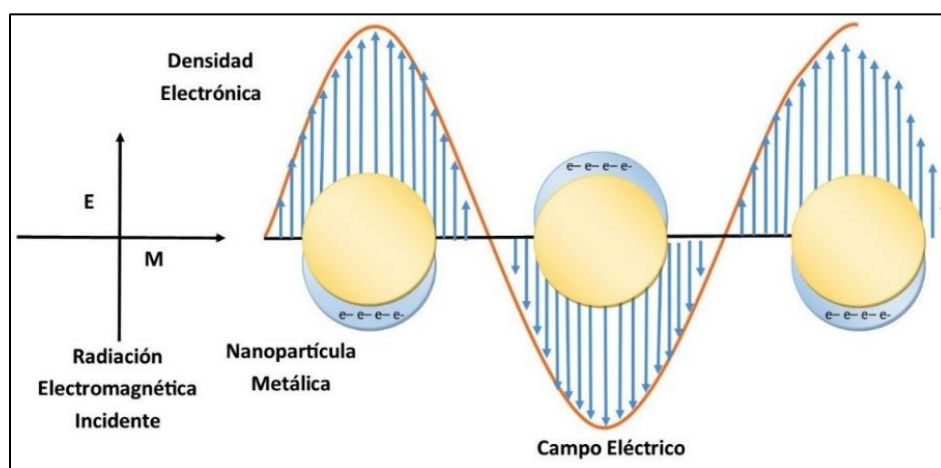


Figura 4. Ilustración esquemática de la resonancia de plasmones de superficie. Imagen diseñada con Publisher, basada en [33].

Este fenómeno es observable a simple vista ya que produce soluciones con colores intensos, rojo para las AuNP y amarillo para AgNP.

Espectroscópicamente hablando esto se ve reflejado por la aparición de una banda de absorción en la región del UV-Vis (200 nm a 900 nm), alrededor de 500 nm para AuNP (**Figura 5**), y 400 nm para AgNP [33] [34].

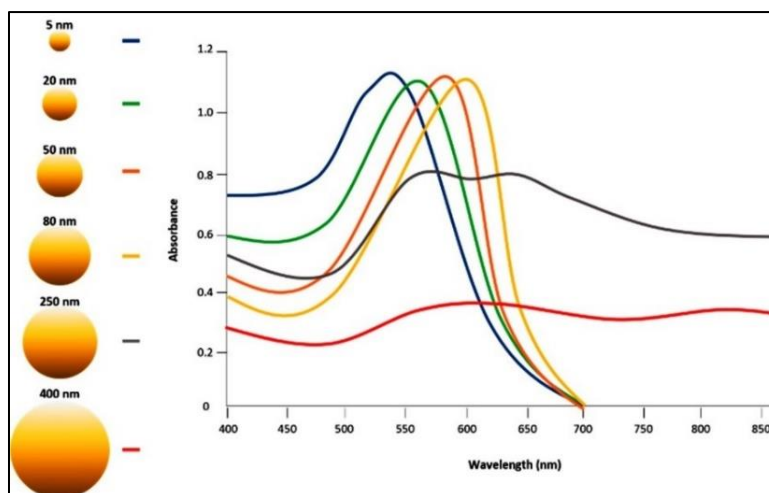


Figura 5. RPS-L de AuNP de distintos tamaños. Imagen obtenida de [33].

La forma de la banda y máximo de la banda de absorción nos permite tener una teoría cercana de qué tipo de morfología, tamaño, monodispersidad y estado de agregación tienen las NPM, como se muestra en la **Figura 5**, donde las AuNP de 5 nm tienen un máximo de absorción alrededor de los 540nm y las AuNP de 80 nm tienen una banda más ancha y un máximo alrededor de los 610 nm como muestra el gráfico de [33].

En las soluciones coloidales de AuNP las partículas se encuentran como partículas individuales estabilizadas presentando un color rojo, pero si las partículas individuales son de mayor tamaño o presentan agregación, ostentan un cambio de color a morado (ver **Figura 6**), con esto, espectroscópicamente hablando, el máximo de la banda se desplaza hacia mayor λ ; pasando de 500 nm cuando son de color rosa claro a 580 nm son de color morado [34].

Lo mismo ocurre para AgNP cuya solución pasa de amarillo con un máximo en 390 nm a café con un máximo 450 nm [30].



Figura 6. Nanopartículas metálicas en solución. Imagen obtenida de [30].

La síntesis de NPM se logra por métodos químicos o físicos, aunque más comúnmente se realizan por medios químicos ya que son relativamente más sencillos [30].

1.3.1. Estabilidad de las nanopartículas

Los nanocoloides elaborados a partir de metales nobles como Au y Ag han gozado de una larga historia de estudio. En las condiciones de síntesis adecuadas, estos sistemas pueden sintetizarse para obtener partículas esféricas con distribuciones de tamaño bien controladas que exhiban propiedades eléctricas, químicas, biológicas y ópticas únicas. Se ha informado de una variedad de morfologías posibles como las nanoesferas, nanovarillas, nanoalambres, nanoestrellas, nanoflores y nanoprismas triangulares. Estas morfologías anisotrópicas son interesantes no sólo para comprender el desarrollo de sus formas, sino también porque ofrecen nuevas oportunidades para explotar la tecnología de los nanocoloides [35].

Para ser comercialmente prácticos, los coloides deben ser estables con el tiempo. Esto siempre ha sido un problema, pero es una dificultad aún mayor cuando las dimensiones coloidales se reducen al intervalo nanométrico. Las NP se vuelven cada vez más inestables con la disminución del tamaño de las partículas debido al aumento relativo en la energía del área superficial. Esta inestabilidad dependiente del tamaño conduce a un proceso conocido como *maduración de Ostwald*, que es la transferencia de átomos a lo largo del tiempo desde partículas más pequeñas y menos estables a otras partículas más grandes

[36]. Por ejemplo, en las NP esféricas de las AuNP este fenómeno de maduración de Ostwald es un evento visible, en donde pequeños cristales o partículas coloidales se disuelven y se vuelven a depositar en cristales o partículas coloidales más grandes. Este proceso es espontáneo, impulsado termodinámicamente, porque las NP más grandes se ven favorecidas energéticamente sobre las más pequeñas, ya que las moléculas en la superficie de las NP son menos estables energéticamente que las del interior de las NP [36] [37].

En los últimos años esta atribución del tamaño sobre la inestabilidad de la energía libre se vuelve aún más aguda cuando las NPM se reducen por debajo de un tamaño crítico ~5 nm [35]. Una de las dificultades inherentes al estudio de partículas con dimensiones menores que el umbral crítico es que es difícil separar la maduración de Ostwald de otros procesos de crecimiento y/o desestabilización que ocurren simultáneamente [35].

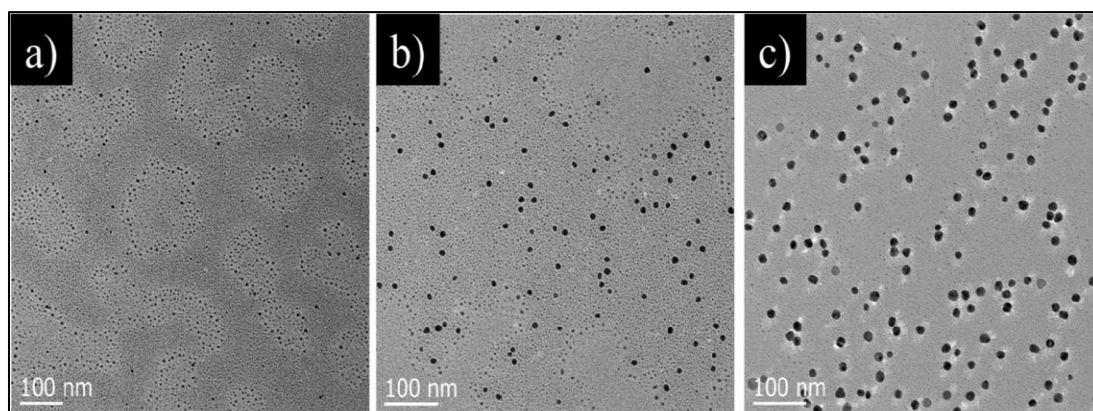


Figura 7. Imágenes TEM de AgNP tomadas a (a) 4 min, (b) 30 min y (c) 4 hrs del tiempo de reacción que muestran la maduración de Ostwald de una muestra [38].

En la **Figura 7** se observa el fenómeno de maduración de Ostwald. La formación de NP se monitoreó observando la evolución del tamaño y la forma de las AgNP a través del tiempo, dicho experimento se llevó a cabo adicionando AgNO_3 como precursor y PVP como estabilizador, además, se utilizó etanol como solvente de AgNO_3 y PVP, y como agente reductor.

Para comprender la formación de partículas, se monitoreó la evolución del tamaño y la forma de las partículas al agregar NH_4OH durante la reacción. Después de 4 min de reacción, se formaron partículas diminutas que parecían juntarse entre sí (**Figura 7a**) Después de 30

minutos, aparecieron partículas de tamaño bimodal y se pudo demostrar fácilmente que existían partículas diminutas alrededor de partículas más grandes (**Figura 7b**). A medida que avanzaba la reacción, las partículas crecían y las partículas diminutas residuales desaparecían (**Figura 7c**), lo que significa que las partículas más grandes crecían a expensas de las partículas más pequeñas. Esto podría atribuirse a la maduración de Ostwald, que es el mecanismo de crecimiento mediante la disolución y el depósito de partículas más pequeñas en la superficie más estable de las nanopartículas más grandes [38].

Por ello es importante conocer cuánto tiempo las NP mantienen sus propiedades, para que posteriormente su utilización en el diseño de biosensores sea eficaz. En este trabajo estudiaremos la estabilidad de las NP que en un futuro pudieran dar lugar al diseño de este tipo de aplicaciones.

1.3.2 Las nanopartículas de Au y Ag y el DNA

La incorporación de DNA y otros ácidos nucleicos funcionales en NP, en sus diferentes morfologías ha producido una gran variedad de nanomateriales compuestos que, en muchos casos, exhiben propiedades únicas y aumentadas debido a la actividad sinérgica de ambos componentes. Estas capacidades, a su vez, están obteniendo una mayor atención en busca de nuevas herramientas a nanoescala para diversas aplicaciones que incluyen biodetección, etiquetado, imágenes dirigidas, administración celular, diagnóstico, terapéutica, teranóstica, bioelectrónica y biocomputación, por nombrar solo algunos [39].

Los nanocristales inorgánicos, como los fabricados de oro u otros metales nobles, junto con óxidos metálicos y variedades alotrópicas de carbono como: grafito, diamante, grafeno, nanotubos de carbono, fullereno, son codiciados como componentes en estos materiales híbridos, ya que pueden proporcionar propiedades ópticas, físicas, magnéticas y electroquímicas distintivas. Más allá de esto, los materiales a base de polímeros sintéticos y nanopartículas proteicas o virales también son útiles en la misma función, ya que pueden proporcionar una capacidad de orientación y transporte de carga predefinida y biocompatible. El DNA generalmente proporciona direccionalidad basada en secuencias para sondas junto con propiedades arquitectónicas únicas que se originan directamente en

el floreciente campo estructural del DNA. Además, estas moléculas de DNA de cadena sencilla o de RNA, seleccionadas a partir de poblaciones combinatoriales mediante un proceso conocido como SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), que son capaces de unirse específicamente a un ligando determinado conocidas como aptámeros de DNA, también pueden proporcionar capacidades de reconocimiento muy específicas hacia muchos objetivos distintos a los ácidos nucleicos en una variedad de escalas de tamaño, desde iones hasta proteínas completas y células. Además de añadir DNA a NP inorgánicas o poliméricas, las NP puramente basadas en DNA han surgido recientemente como una excelente plataforma de ensamblaje y han comenzado a encontrar aplicaciones en áreas como la detección, la obtención de imágenes y la inmunoterapia [39].

Las posibilidades de diseñar secuencias individuales acordes con un objetivo específico, hace que estas secuencias de DNA puedan programarse para interactuar entre sí y permiten una versatilidad muy rica de nanoestructuras de DNA. En general, la nanotecnología del DNA se puede dividir en dos categorías: Nanotecnología estructural y Dinámica del DNA.

La primera de ellas, la Nanotecnología estructural, se usa a menudo para construir nano objetos estáticos bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D), de diferentes geometrías y tamaños, mientras que la Dinámica del DNA ofrece una capacidad notable para lograr nano dispositivos dinámicos con la reconfigurabilidad deseada [40-41].

Debido a la RPS-L que presentan las NP de Au y Ag, éstas pueden ser utilizadas para la elaboración de biomarcadores o biosensores, como consecuencia de las propiedades ópticas inherentes, las soluciones coloidales de las NP de Au y Ag, tienen altos coeficientes de extinción y diferente color en la región visible del espectro [42].

Las AuNP y AgNP funcionalizadas con DNA se han estudiado ampliamente en términos de fabricación de materiales y aplicaciones. La adsorción de DNA sobre NP está fuertemente influenciada por las propiedades de los nucleótidos. El grupo tiol terminal es el ancla más común para unir DNA a la superficie de las NP de Au debido a la formación de fuertes enlaces $Au-S$ [4]. Las cuatro bases nitrogenadas de DNA pueden adsorberse en la superficie

de las NP de Au y Ag a través de interacciones de coordinación, el DNA puede estar unido covalentemente a la superficie de las NP a través de grupos enlazantes (-SH, -OH, -NH₂, o -COOH) (Ver **Figura 8** y **Figura 9**) [5]. Se sabe, por ejemplo, que el ADN de cadena sencilla (ssDNA) puede unirse a las AuNP recubiertas de iones citrato y estabilizar las partículas introduciendo fuerzas electrostáticas, mientras que el ADN de doble cadena (dsDNA) ofrece una protección limitada a las AuNP debido a su geometría de doble hélice que evita que el núcleo bases se adhieran a la superficie de la partícula [39].

Las AuNP o AgNP son, por lo general, funcionalizadas con oligonucleótidos tiolados, generando la unión NP-DNA, aunque también se ha probado que el DNA no tiolado puede unirse a AuNP y AgNP [43]

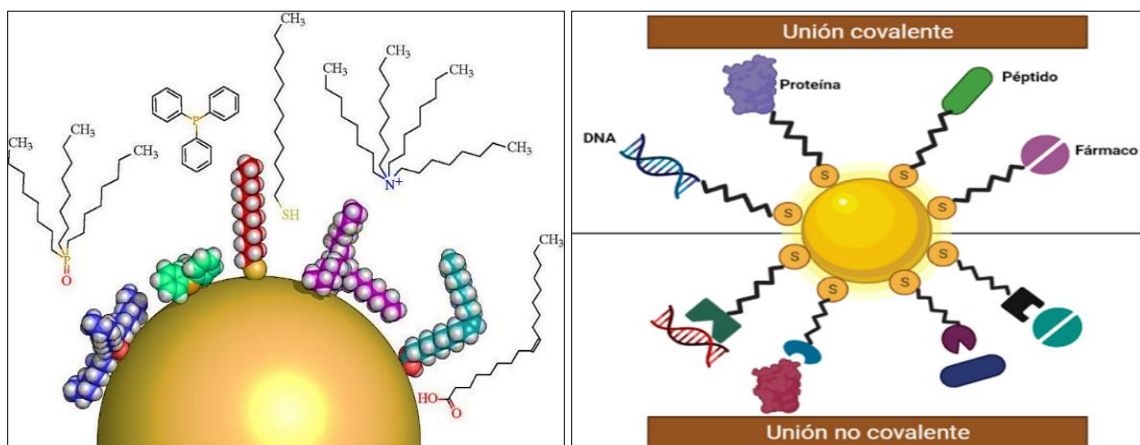


Figura 8. Representación de moléculas funcionales con AuNP por sus grupos enlazantes. De izquierda a derecha: óxido de trioctilfosfina (TOPO), trifenilfosfina (TPP), dodecanotiol (DDT), bromuro de tetraoctilamonio (TOAB), y ácido oleico (OA). Imagen tomada de la referencia [43]. **Figura 9** Representación gráfica de la unión S-Au de las NP con diferentes moléculas unidas al grupo S⁻. Imagen diseñada en BioRender.com [20].

En el caso del DNA, se ha reportado el uso de las AuNP en ensayos colorimétricos para la detección de secuencias específicas, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), foto dímeros [44]; así como su afinidad de unión con proteínas [45], y otras moléculas. De igual forma, las AgNP han sido empleadas para la detección de secuencias específicas de DNA, y

son de interés actual por la fuerte señal que emite su RPS-L y por el bajo costo que presentan con respecto a las AuNP.

1.3.3. Síntesis de nanopartículas

Los métodos de síntesis de AuNP y de AgNP se dividen en dos grandes bloques, denominados con la nomenclatura anglosajona como **top-down** (de arriba-abajo), y **bottom-up** (de abajo-arriba).

El método **top-down** (método físico), se realiza mediante la subdivisión de los metales sólidos para formar las nanopartículas, cuyo mayor inconveniente es la obtención de nano materiales con tamaños homogéneos.

El método **bottom-up** (método químico) consiste en la reducción de iones metálicos desde su estado de oxidación en disolución hasta su estado elemental, seguido de un proceso de nucleación y crecimiento controlado por el uso de tensoactivos o agentes estabilizantes. Tiene una mayor efectividad ya que se obtienen NP más pequeñas y con tamaños más homogéneos, esto controlando el proceso de agregación durante la síntesis [2].

Este último método es el más empleado para la obtención de AuNP y AgNP, ya que tiene mayor control en el tamaño, forma y monodispersidad de las NP obtenidas [2]. Este método presenta las siguientes ventajas:

- Es un método relativamente sencillo y es reproducible.
- Permite sintetizar NP a gran escala.
- Permite controlar el tamaño de las NP, cambiando las condiciones de reacción: agente reductor, temperatura, agitación y contenido de agentes metálicos.
- Las NP así obtenidas son estables en el tiempo y no se agregan fácilmente.

1.3.4 Aplicaciones de las nanopartículas metálicas.

Las NP tienen muchas aplicaciones debido a sus propiedades únicas, como la dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia. Esto permite aplicaciones en diversas industrias como la electrónica, la catálisis, la medicina y la cosmética. Asimismo, las NP se han utilizado en otros campos menos complejos, y forman parte de productos, dispositivos y sistemas de uso habitual en la vida cotidiana, a pesar de pasar desapercibidos a primera vista.

En la industria farmacéutica, medicina o uso veterinario, las AuNP resaltan por sus propiedades fototerapéuticas, ya que éstas se activan y estas desprenden calor en presencia de luz láser, por lo que son útiles en la detección temprana, diagnóstico y el tratamiento del cáncer [46]. El tamaño de la NP, no debe exceder los 5 a 50 nm, para seguir conservando sus ventajas en lo referente a la evasión del sistema inmunológico y factibilidad de penetración en las células cancerosas.

De igual forma las NP se utilizan en la detección de niveles de glucosa [47] y en conjunto con NP magnéticas para la detección del VIH y Alzheimer al comienzo de la enfermedad. Además, también han atraído considerable interés para su uso en la formación de biosensores y también como vehículos para el transporte y vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas terapéuticas (ver **Figura 10**), así como en terapia génica ya que permiten controlar, en el espacio y en el tiempo, la liberación de estos compuestos terapéuticos [48].

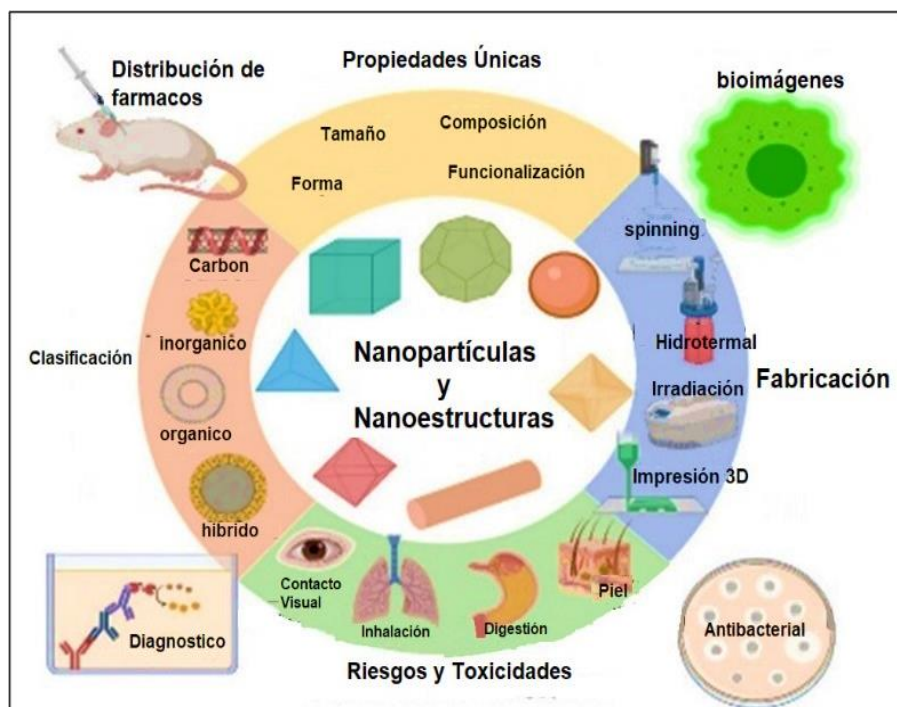


Figura 10. Imagen que ilustra las diferentes formas, clasificación, riesgos, aplicaciones y fabricación de las NP. Imagen modificada de la referencia [49].

En la industria alimenticia, las NP se usan como parte integrante de nanocompuestos polimérico, se utilizan en la fabricación de envases con propiedades antimicrobianas o para incrementar la resistencia a la abrasión de los envases, así como en la elaboración de indicadores de tiempo y temperatura para establecer si los alimentos procesados y congelados han sido mantenidos a la temperatura idónea, a lo largo de la cadena de producción y distribución [50].

En la catálisis, las AuNP han destacado sobre todo en procesos de hidrogenación, de oxidación selectiva y de adición nucleofílica a alquinos. Las NP metálicas han sido investigadas en la elaboración de biosensores, en aplicaciones para biodiagnóstico, y la distribución de fármacos ya que se pueden funcionalizar a biomoléculas que van desde proteínas hasta DNA.

1.4. DNA (Ácido desoxirribonucleico)

El ácido desoxirribonucleico (DNA) es la molécula que acopia la información genética de todos los seres vivos, su contenido determina las características generales de un ser vivo, y si por diferentes circunstancias, como mutaciones, esta información genética se ve alterada y las características y funciones de tales organismos también se verán afectadas. El DNA es un biopolímero que está formado por carbono (C), hidrogeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N) y fosforo (P), a través de unidades conocidas como bases nitrogenadas que son compuestos químicos nitrogenados que forman parte fundamental de los nucleótidos o ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos son compuestos de alto peso molecular que están presentes en el núcleo de las células, mitocondrias y cloroplastos. Existen dos tipos, el DNA (ácido desoxirribonucleico en español) y RNA (ácido ribonucleico en español), presentes en toda clase de células animales, vegetales o bacterianas.

La unión de una base nitrogenada a una pentosa (ribosa en el RNA y desoxirribosa en el DNA) en el carbono 1', y esta a su vez a una molécula de ácido fosfórico (H_3PO_4 se encuentran en forma de ion fosfato (ver **Figura 11**) en el carbono 5' se denomina nucleótido. Estos nucleótidos se unen mediante la formación de un enlace covalente entre el grupo OH

en la posición 3' y el fosfato en el carbono 5', llamado enlace fosfodiéster para formar una cadena del DNA [9].

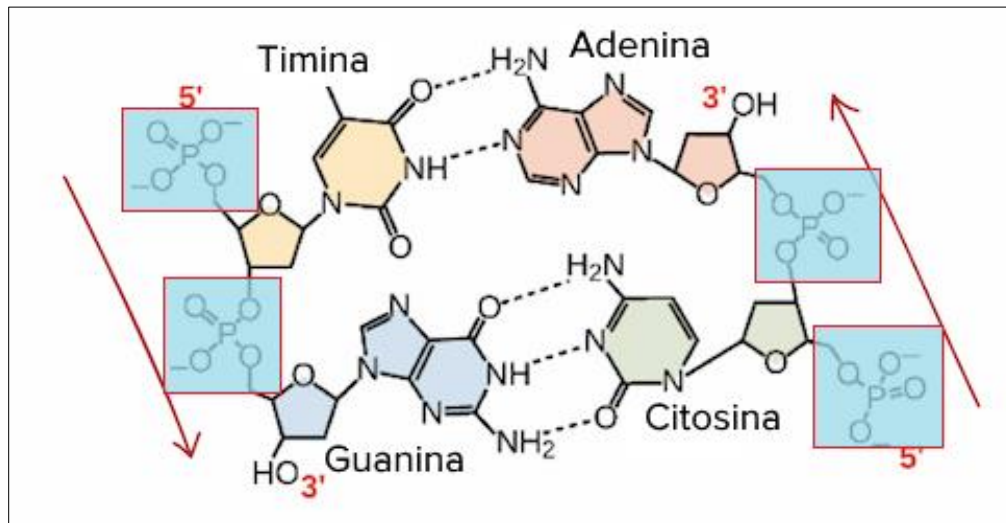


Figura 11. Imagen ilustrativa del enlace fosfodiéster. Imagen modificada de [51].

Existen dos tipos de estas bases nitrogenadas:

- i) Bases pirimidínicas, derivadas de la pirimidina. Las cuales son la citosina (C), que se encuentra tanto en el DNA como en el RNA; la timina (T), que se presenta sólo en el DNA; y el uracilo (U), presente en el RNA en lugar de la timina.
- ii) Bases púricas, derivadas de la purina. La adenina (A), y la guanina (G) Las dos en ambos tipos de ácidos nucleicos.

Se dice que esta molécula tiene polaridad y esta se indica etiquetando cada extremo como "extremo 5'" y "extremo 3'", donde la prima se refiere a la posición que ocupa ese grupo en el carbono prima del azúcar [52].

La molécula de dsDNA (doble cadena de DNA) consiste en dos moléculas que se enrollan entre sí para formar una estructura de doble hélice (ver **Figura 12**). El esqueleto externo está formado por una cadena de azúcares (desoxirribosa) y grupos fosfato. Esta doble hélice se mantiene unida por los enlaces de hidrógeno entre A-T y C-G, el primer par forma dos enlaces y el último par forma 3 enlaces [53, 54]. La secuencia de estas bases a lo largo de la

cadena es lo que codifica las instrucciones para sintetizar moléculas de RNA y posteriormente formar proteínas [55].

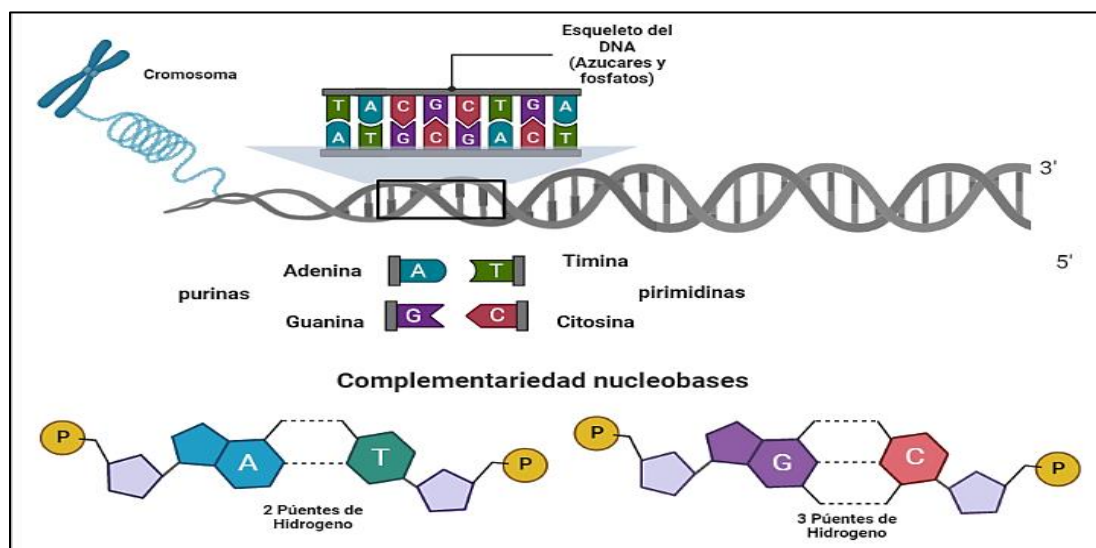


Figura 12. Estructura del DNA. Imagen diseñada en BioRender.com [20].

De igual forma existen cadenas cortas de ácido nucleico llamadas oligonucleótidos, estos son fragmentos de RNA o DNA de cadena sencilla, formados por algunas decenas de nucleótidos unidos mediante puentes fosfodiéster (enlace covalente que se origina entre un grupo hidroxilo (OH^-) en el carbono $3'$ y un grupo fosfato (PO_4^{3-}) en el carbono $5'$).

1.4.1. Complementariedad del DNA

Los *primers* se pueden utilizar gracias a la complementariedad del DNA. La complementariedad de las bases nitrogenadas es clave para la estructura del dsDNA y es muy importante ya que permite procesos como la replicación del DNA y la transcripción a RNA para sintetizar proteínas. El uso habitual de los oligos es como sondas o *primers*, para identificar objetivos de secuencias complementarias de DNA o RNA hibridándose a éstas con el fin de confirmar la presencia de una secuencia genética [56]. Entre las aplicaciones que emplean los *primers* de oligonucleótidos, se incluyen los procedimientos como Northern blot (para RNA) [57] y Southern blot (para DNA) [58] como *primers* unidos a fluoróforos en micromatrices que detectan cambios en la expresión genética o se usan en la detección de trastornos genéticos o para identificar patógenos concretos. Otra aplicación es en los microarreglos, esta técnica ha proporcionado una oportunidad de monitorear

simultáneamente los niveles de expresión de una gran cantidad de genes en respuesta a perturbaciones intencionales de experimentos, como disrupciones genéticas y tratamientos farmacológicos. Los patrones obtenidos a partir de experimentos de microarreglos han ayudado a los investigadores a comprender los mecanismos genéticos y el progreso de las enfermedades, a predecir las funciones moleculares de los genes, a construir vías funcionales e identificar genes nuevos o variantes de empalme [59-60].

La replicación de la molécula original para formar dos moléculas hijas idénticas se explica mediante la complementariedad, si las dos cadenas se separan, cada cadena sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria (ver **Figura 14**). De esa manera, la información genética en la secuencia de bases puede transmitirse, es decir, forman pares de la misma forma que lo hacen, por ejemplo, las llaves y una cerradura, si estas llaves no son complementarias a la cerradura no podrá abrirse. Con esto la adenina y timina se complementan (A-T), ya que pueden formar dos puentes de hidrógeno, igual que la guanina y la citosina (G-C) al formar tres puentes de hidrógeno). En ambos casos se aparean una purina y una pirimidina manteniendo las distancias constantes (diámetro interno y externo) en la estructura de DNA. El RNA también se puede aparear a una cadena de DNA, sólo que, al no existir timina, la base que se aparee a la A es el uracilo (A-U), ya que estructuralmente es muy similar a la timina y puede formar también 2 puentes de hidrógeno. Este apareamiento entre A-T y C-G es lo que se conoce como complementariedad [52].

Por lo tanto, para que pueda ocurrir la replicación del DNA, la cadena molde debe ser complementaria y antiparalela; es decir una cadena “corre” de 3' a 5' y la otra de 5' a 3', si no cumple con estas características no puede ocurrir el proceso de replicación. Si hay error en el proceso de replicación del DNA durante la división celular, puede ocasionar cambios genéticos en las células hijas, aunque, usualmente el mismo proceso de replicación corrige estos errores, la replicación incorrecta del DNA es una característica propia del cáncer e impulsora de inestabilidad genómica o mutaciones [61].

1.4.2. Mutaciones

La mutación (cambio en la información genética), se entiende como un cambio en la secuencia de las bases nitrogenadas; esto puede dar lugar a la sustitución de un aminoácido por otro en una proteína que, a su vez, puede significar un cambio en la función de ésta. Las mutaciones pueden originarse por “errores” en el proceso de la replicación como ya habíamos mencionado. Si bien este fenómeno se produce con cierta frecuencia, la mayoría de las mutaciones son inviables, es decir, el resultado es discordante para la vida.

Por ello, las células poseen mecanismo de *reparación o corrección* de errores reemplazando el fragmento dañado y colocando las bases complementarias correctas en la cadena inicial. Sin embargo, no todos los errores son corregidos como en el caso de la anemia falciforme, es una hemoglobinopatía provocada por una mutación de un nucleótido en la sexta posición de la secuencia de la β -globina, (una A por una T), lo que produce una mutación en el codón de valina sustituyéndolo por un glutamato. Como consecuencia en lugar de proteínas (tetrámeros) que trasladan de forma eficiente el O_2 se forman estructuras deformes e ineficientes. El eritrocito (glóbulo rojo), se atrofia y adquiere forma de hoz (glóbulo rojo falciforme ver **Figura 13**) [61].

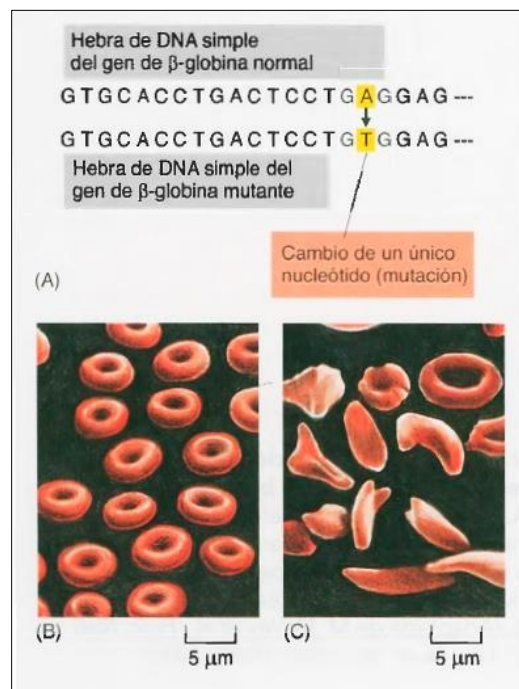


Figura 13. Ilustración de la mutación de la B-globina. Imagen tomada de [61]

Este tipo de alteraciones en la función de las proteínas, provocadas por mutaciones en la secuencia de nucleótidos (bases) puede ser utilizada en el diseño de sondas (*primers*) con características que nos permitan tener una interacción con genes objetivo de gran interés, e incluso si tienen mutaciones genéticas. Así, se han desarrollado técnicas que permiten detectar genes y mutaciones en estos como es la PCR (polimerase chain reaction, en inglés), sin embargo, esta técnica tiene algunas características que pueden hacerla difícil de aplicar bajo ciertas condiciones y de ahí el interés en desarrollar nuevas técnicas sencillas, cuantitativas y fáciles de aplicar sobre todo en condiciones con poca infraestructura.

1.5. DNA plasmídico y el fago M13mp18

Las células procariotas están caracterizadas por la ausencia de membrana nuclear y su material genético está formado por DNA, contenido en un único cromosoma circular que contiene alrededor de tres millones de pares de bases. Todas las bacterias pertenecen al reino Monera. Además del DNA cromosomal, las bacterias también tienen material genético que consisten en moléculas de DNA circulares de doble cadena que pueden contener de dos mil a trescientos mil pares de bases, llamado plásmidos. En la década de 1980, se creía que los plásmidos no participaban en la actividad bacteriana. Sin embargo, más tarde se descubrió que contenían información genética adicional que permitía a las células procariotas desarrollar nuevas características. Por ejemplo, pueden hacerlas resistentes a los antibióticos, participar en la producción de toxinas y pueden contener genes que permitan a las bacterias utilizar fuentes específicas de carbono o nitrógeno. Los plásmidos pueden replicarse de forma independiente a medida que la célula crece.

El lugar donde comienzan a replicarse es único y se llama origen de replicación. Las nuevas copias se propagan a medida que la célula se divide en células hijas. Los plásmidos contienen mecanismos que les permiten replicarse y controlar el número de copias. Por tanto, el número de copias de cada plásmido puede variar desde una, cuando son muy grandes, hasta 50 cuando son pequeñas. Mediante ingeniería genética, los humanos hemos desarrollado plásmidos que permiten insertar el DNA de un organismo en otro.

La familia de plásmidos “**M13**” llamados así por el bacteriófago *M13*, son una herramienta valiosa ampliamente usada en biología molecular. El bacteriófago M13 es un virus

filamentoso, que infecta particularmente a la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), y es inocuo para los seres humanos. El *M13* tiene una estructura en forma de rodillo con un diámetro de 6.5 nm y una longitud de aproximadamente 800 nm. Contiene una cadena circular de DNA viral de cadena sencilla (ssDNA), formada por 6407 nucleótidos encapsulados por una cubierta proteica formada por 5 tipos diferentes de proteínas. El genoma del fago comprende nueve marcos de lectura que codifica para 11 proteínas. Las proteínas codificadas están organizadas en tres grupos funcionales: *GP2*, *GP10* y *GP5* implicados en la replicación del DNA, *GP1*, *GP4* y *GP11* involucradas en el ensamble del fago y el último grupo que corresponde *GP3*, *GP6*, *GP7*, *GP8* y *GP9* que forman la cubierta estructural (cápside).

Los vectores de fago *M13mp*, derivados de *M13*, contienen el gen *lacZα* y difieren entre sí por las dianas de enzimas de restricción que poseen dentro de ella. La ubicación de los sitios de clonación dentro de este gen permite el cribado de inserciones utilizando α -complementación (ver **Figura 14**).

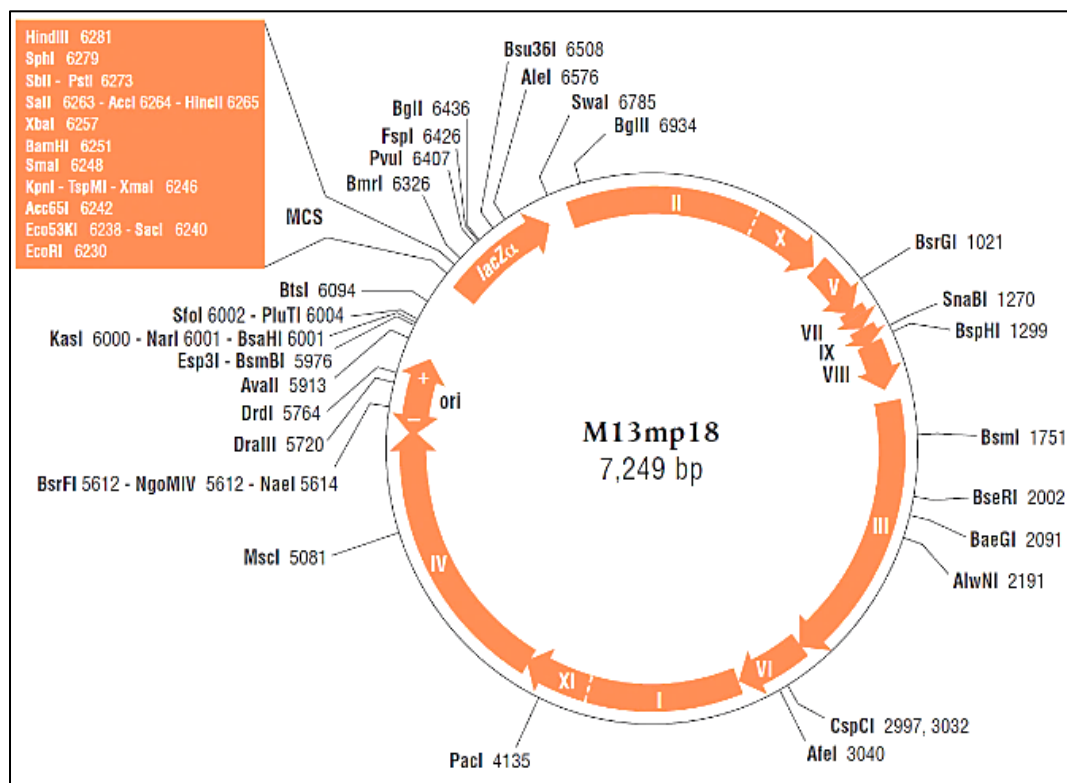


Figura 14. El mapa *M13mp18*. Las secuencias de nucleótidos completas de *M13mp18* y *M13mp19* han sido determinados recientemente por [62].

En este trabajo nos concentraremos en identificar secuencias contenidas en el *Gen VIII* (1301 -1522) de la secuencia del plásmido *M13mp18*. A continuación se muestra la secuencia del *Gen VIII*:

*5'atgaaaaagt ctttagtcct caaagcctct gtagccgttg ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgctg
ctgaggggtga cgatcccgca aaagcggcct ttaactccct gcaagcctca gcgaccgaat atatcggtta
tgcgtggggcg atggttgttg tcattgtcgg cgcaactatc ggtatcaagc tgtttaagaa attcacctcg
aaagcaagct ga 3'*

Sólo se muestra la cadena que corre de 5' a 3' ya que la otra es complementaria y antiparalela. La secuencia completa del plásmido *M13mp18* se puede consultar en el apéndice A.

Capítulo 2

Justificación y Objetivos

2. Justificación

Hasta el momento, los ensayos colorimétricos reportados con NPM son realizados principalmente con AuNP, por ello, en este trabajo proponemos una novedosa forma de desarrollar métodos similares utilizando AgNP, debido a las ventajas que presentan: colores más brillantes, que van desde el amarillo hasta un verde-azul muy intenso, resultado de su RPS-L, el cual es muy sensible a su estado de agregación, menor costo de producción, y un mayor coeficiente de extinción en comparación con las AuNP.

Debido a que existe un reconocimiento de cadenas de DNA de secuencias complementarias, sería posible identificar regiones específicas de DNA mediante el diseño de sondas o *primers* complementarias que pertenezcan a genes particulares. Cuando estos *primers* se funcionalizan con las AuNP y AgNP, se podrían aprovechar las propiedades ópticas de las NP para la identificación de genes o secuencias de DNA específicas, ya que los *primers* se hibridarían a las dianas (*target*) de DNA, por ejemplo, de agentes patógenos, dada la complementariedad. Teniendo el control de la agregación de las NP, con el uso de agentes estabilizantes como el citrato de trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), presentan un color característico y al ser funcionalizadas con los *primers*, estos estabilizan a la NP y al entrar en contacto con el gen objetivo, esta perderá la estabilidad y provocará la agregación de las NP, lo que modificará el máximo de absorción de la RPS-L y modificará el color de la solución coloidal, permitiendo el desarrollo de una técnica colorimétrica que detecte genes de interés.

Por ello, en este proyecto proponemos estudiar cambios ópticos de las NPM debido a la agregación de éstas como resultado de su interacción con secuencias de DNA. Este tipo de experimentos nos permitiría diseñar sensores colorimétricos específicos para determinadas secuencias o genes en el futuro. Aunque el uso de las AuNP en solución ha sido mayormente estudiado, en este trabajo se propone utilizar las AgNP; que han sido menos estudiadas a pesar de sus ventajas, ayudando a poblaciones con menos recurso a tener acceso a este tipo de tecnologías de biónico.

2.1. Objetivos específicos

El objetivo principal de este proyecto es identificar secuencias específicas de DNA utilizando su complementariedad y los cambios que ocasionan en el RPS-L de las NPM de Au (AuNP), y Ag (AgNP), funcionalizadas con DNA.

La comprensión y la caracterización espectroscópica de estas interacciones serán herramientas muy útiles que nos ayudarán desarrollar sensores en el futuro, por lo que nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar las AuNP y AgNP con tamaño y forma controlada.
- Biosintetizar y purificar el DNA que contiene el gen de interés (Gen VIII 1301 -1522).
- Diseñar Oligos específicos para que interaccionen con el Gen VIII 1301 -1522.
- Estudiar espectroscópicamente (UV-Vis, DLS), la interacción DNA-NP.
- Observar los cambios colorimétricos que presenten las NPM al estar funcionalizadas con *primers* específicos y al entrar en contacto con el DNA objetivo.

Capítulo 3

3. Materiales y Metodología

3.1. Reactivos

Acetato de potasio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) J.T. Baker, ácido acético glacial (CH_3COOH) Meyer 100%, ácido ascórbico, ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) Meyer 99.0%, ácido cítrico (CH_3COOH) J.T. Baker 99.0 - 102.0%, ácido clorhídrico (HCl) J.T. Baker 1.0N, ácido cloro áurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) Sigma-Aldrich 99.9%, ácido etilendiaminotetraacético EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) J.T. Baker 99.0-101.0%, agua ultrapura desionizada (miliQ), borohidruro de sodio (NaBH_4) Meyer 98%, bromuro de cetil trimetilamonio ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$) (CTAB) Sigma-Aldrich 95%, citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) J.T Baker 99.5%, dodecilsulfato sódico ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) (SDS) Sigma-Aldrich 99%, etanol absoluto ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) J.T. Baker, hidróxido de amonio (NH_4OH) J.T Baker 28.0 - 30.0 %, hidróxido de sodio (NaOH) J.T Baker 0.1 N, LB Agar Invitrogen, nitrato de plata (AgNO_3) Sigma-Aldrich 99.9999%, Oligos (EUROFINS mwg/operon), ribonucleasa (Rnasa) , Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), tris base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) Invitrogen.

3.2. Metodología

3.2.1. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP)

En este proyecto, utilizamos el método de crecimiento, el cual requiere NP de Au de ~3.5 nm, las cuales se emplearon como “**semillas**” para preparar NP más grandes, en un intervalo de tamaño entre ~5 a 40 nm. Las AuNP de 3.5 nm se prepararon mediante el método de *capping* empleando $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ como agente estabilizante y borohidruro de sodio como agente reductor. Para la nucleación secundaria; es decir la etapa de crecimiento de las NP, se empleó una solución llamada de crecimiento. Esta controló el tamaño mediante la adición de un agente reductor débil, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, y un agente estabilizante como el cetil-trimetil amonio (CTAB) [63].

3.2.2. Metodología de síntesis de AuNP

Para la síntesis de solución semilla (3.5 nm). Se preparó una solución acuosa agregando 5 mL de HAuCl_4 (5×10^{-4} M), y 5 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (5×10^{-4} M), en un tubo de 15 mL. A

continuación, se vertió 300 μL de NaBH_4 (0.1 M); preparado justo antes de utilizarlo y enfriado en hielo, y se agitó a una velocidad constante con un vortex en un nivel medio de potencia. La solución se volvió rosa inmediatamente después de agregar NaBH_4 , lo que indica la formación de partículas. Después de envejecer la muestra de 2 a 5 hrs, esta solución se empleó como semilla [63].

3.2.3 Preparación de la solución *stock* de Au (Solución de crecimiento)

A una solución acuosa de 50 mL que contenía 25 mL de HAuCl_4 (5×10^{-4} M) y 25 mL de agua se le añadieron 1.5 g de CTAB (0.08 M de concentración final). La mezcla se calentó a 60°C hasta que la solución se volvió de color naranja claro. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se utilizó como solución stock de crecimiento [63].

3.2.4 Síntesis de AuNP de diferente tamaño (5.5, 8.0, 17.0 y 35.0 nm)

Las AuNP de diferentes tamaños se sintetizaron a partir de la solución semilla y la solución de crecimiento. Para la síntesis de AuNP de ~ 5.5 nm, se mezclaron 7.5 mL de la solución stock de Au con 50 μL de una solución de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (0.1M); recién preparada. A continuación, se añadieron 2.5 mL de solución AuNP de ~ 3.5 nm mientras se agitaba en un vortex en un nivel medio de potencia. Se continuó agitando durante 10 min, después de que la solución se volviera de color rojo vino. Las partículas preparadas de esta manera eran esféricas con un diámetro de ~ 5.5 nm [63].

Para la síntesis de AuNP de ~ 8.0 nm, se mezclaron 9 mL de la solución stock de crecimiento Au con 50 μL de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (0.1M). A continuación, se añadió 1 mL de solución AuNP de ~ 3.5 nm con agitación constante por 10 min hasta que la solución se pigmentó de rojo intenso. Las partículas preparadas de esta manera eran esféricas con un diámetro de ~ 8.0 nm [63].

Para la síntesis de AuNP de ~ 17 nm, se mezclaron 7.5 mL de la solución stock de Au con 50 μL de una solución de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (0.1 M). Enseguida, se agregó 1 mL de solución de AuNP de ~ 8.0 nm, con agitación constante durante 10 min hasta el vire a rojo-vino.

La síntesis de AuNP de ~**37 nm**, se procedió como se describió anteriormente, pero se empleó 1 mL de solución de AuNP de ~**17 nm**. La solución obtenida tenía un color morado y las partículas eran esféricas y tipo rodillo, cómo se discutirá en los resultados. Cabe mencionar que el $C_6H_8O_6$ y el $NaBH_4$ siempre se emplearon recién preparados en cualquier tipo de NP (Au y Ag). El tamaño de NP esta reportado en la literatura y así fue como se nombraron 3.5, 5.5, 8, 17 y 35 nm. Sin embargo, en todos los casos se hicieron las mediciones apropiadas para verificar su diámetro.

Para estudiar la estabilidad de las AuNP se caracterizaron periódicamente por espectroscopía UV-Vis y DLS durante ~ 2 meses. Todas las muestras se envolvieron en papel aluminio para protegerlas de la luz, y se mantuvieron a temperatura ambiente.

En la **Tabla 1 y 2**, se resumen las condiciones de síntesis de las AuNP para cada tamaño [63].

Tabla 1. Cantidades de cada una de los reactivos para la preparación de los precursores de las AuNP.

Tamaño NP (nm)	HAuCl₄ 5x10⁻⁴ M	Na₃C₆H₅O₇ 5x10⁻⁴ M	H₂O	NaBH₄ 0.1M	CTAB 0.08M
3.5 (semilla)	5 mL	5 mL	-	300 µL	-
Au (stock de crecimiento)	25 mL	-	25 mL	-	1.5 g

Tabla 2. Cantidades de cada una de las soluciones para la preparación de las AuNP.

Tamaño NP (nm)	Stock de crecimiento	C ₆ H ₈ O ₆ 0.1 M	Solución Semilla
5.5	7.5 mL	50 µL	2.5 mL de la solución semilla de NP de 3.5 nm
8	9 mL	50 µL	1 mL de la solución 3.5nm
17	9 mL	50 µL	1 mL de la solución de NP de 8 nm
37	9 mL	50 µL	1 mL de la solución de NP de 17 nm

3.3. Síntesis de AgNP de 3.5 nm

A un tubo Eppendorf de 15 mL, se adicionó 5 mL de AgNO₃ 5x10⁻⁴ M y 5 mL de Na₃C₆H₅O₇ (5x10⁻⁴ M), y 300 µL de NaBH₄ (0.1 M) con agitación constante.

La solución se volvió amarilla inmediatamente después de agregar NaBH₄, lo que indica la formación de partículas de plata. Las partículas en esta solución fueron aproximadamente de 3.5 nm el tubo eppendorf fue cubierto con papel aluminio. Aquí, el citrato sirve solo como agente de protección, ya que no puede reducir la sal de plata a temperatura ambiente (25 °C).

3.3.1 Metodología de síntesis de AgNP de 30 a 60 nm.

La síntesis de AgNP de ~30 a 60 nm se realizó utilizando C₆H₈O₆ como reductor y Na₃C₆H₅O₇ como estabilizador. Típicamente, a una solución de 8 mL que contenía C₆H₈O₆ (6.0×10⁻⁴ M), y Na₃C₆H₅O₇ (3.0×10⁻³ M), se ajustó a pH 7. Este proceso se repitió, pero obteniendo soluciones a pH 9.0, 10.0 y 10.5. Para ajustar el pH de las soluciones se usó NaOH (0.1 M) y/o ácido cítrico (0.2 M), y finalmente, se agregó una solución acuosa de AgNO₃ (0.1 M) y se incubó en baño maría a 30° C. Se observó que las soluciones de reacción cambiaban de

incoloras a amarillas-marrón (Para la reacción realizada a pH 9.0, 10.0 y 10.5), y verdosas (Para las reacciones realizadas a pH 7.0) después de 15 min, no se observaron más cambios de color, lo que indica que las reacciones se habían completado [64].

Tabla 3. Cantidades de cada una de las soluciones para la preparación de las AgNP de 3.5 nm.

Tamaño NP (nm)	AgNO ₃ 5x10 ⁻⁴ M	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 5x10 ⁻⁴ M	NaBH ₄ 0.1 M
3.5 nm	5 mL	5 mL	300 µL

Tabla 4. Cantidades de cada una de las soluciones para la preparación de las AgNP [64].

Tamaño NP (nm)	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 6.0x10 ⁻³ M	C ₆ H ₈ O ₆ 12.0x10 ⁻⁴ M	pH	AgNO ₃ 0.1 M
30 nm	4 mL	4 mL	10.5	80 µL
40 nm	4 mL	4 mL	10	80 µL
50 nm	4 mL	4 mL	9	80 µL
60 nm	4 mL	4 mL	7	80 µL

3.4. Síntesis y purificación de DNA

El DNA de doble cadena (dsDNA), y cadena sencilla (ssDNA), se purificó a partir del bacteriófago *M13* el cual se cultivó en bacteria como se describe a continuación. A un matraz Erlenmeyer de 2 L, que contenía 250 mL de medio LB se inoculó con 2.5 mL de *E. coli* (en fase estacionaria), se agregó 0.5 mL bacteriófago *M13* (1x10¹¹ pfu). El matraz se mantuvo con agitación constante a una temperatura de 37° C durante 16 hrs (ver **Esquema 1**).

Posteriormente, se separaron las células del sobrenadante, centrifugando el medio a 10000 rpm por 5 minutos. A partir de las células se obtuvo el dsDNA del bacteriófago M13 mediante una midiprep. Y del sobrenadante se purificó la molécula de ssDNA.

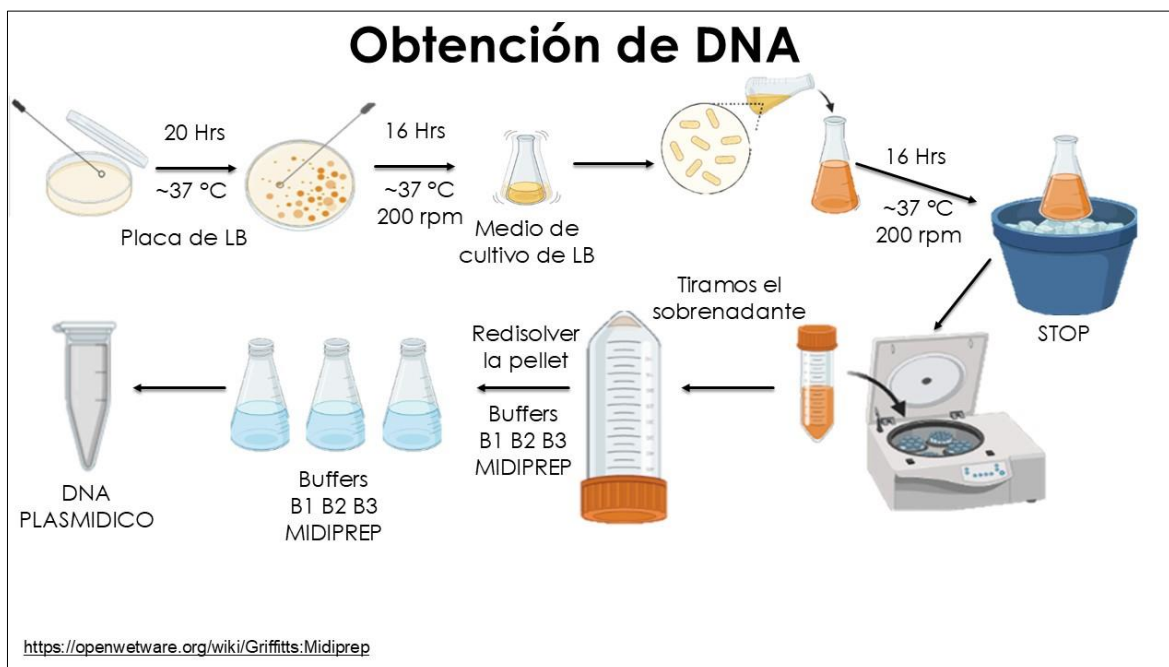
3.4.1 Purificación de DNA

Las 3 soluciones empleadas en la midiprep se prepararon como se describe a continuación:

- **Solución P1**, se disolvieron 6.06 g de tris base, 3.72 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 800 mL de agua destilada. El pH se ajustó a 8.0 con HCl y se agregó agua hasta 1L. Finalmente, se añadió 100 mg de RNasa.
- **Solución P2**, se disolvieron 8.0 g de NaOH en 950 mL de agua destilada, seguido de 50 mL de solución de SDS al 20% (p/v).
- **Solución P3**: Se pesó 294.5 g de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ en 500 mL de agua destilada. El pH se ajustó a 5.5 con CH_3COOH y se aforó a 1L.

A las células obtenidas se agregaron 10 mL de la solución P1 y se mezcló en un vortex, hasta redissolver la *pellet* por completo. En este momento se agregaron 10 mL de la solución P2 y el tubo se invirtió varias veces (4-6), para mezclar perfectamente y se permitió que la reacción avanzará por 5 minutos. Este paso estuvo acompañado de la formación de agregados. Posteriormente, a la mezcla anterior, se le adicionó 10 mL de la solución P3, previamente incubada en hielo, y enseguida se formaron agregados. La mezcla anterior se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Se recuperó el sobrenadante que contiene el DNA del plásmido desechando la *pellet* y se reprecipitó con etanol de acuerdo al protocolo convencional (ver **Esquema 1**)

Esquema 1. Esquema que muestra el procedimiento de obtención del DNA del M13
Imagen diseñada en BioRender.com [20]. Basado en el protocolo clásico de MIDIPREP



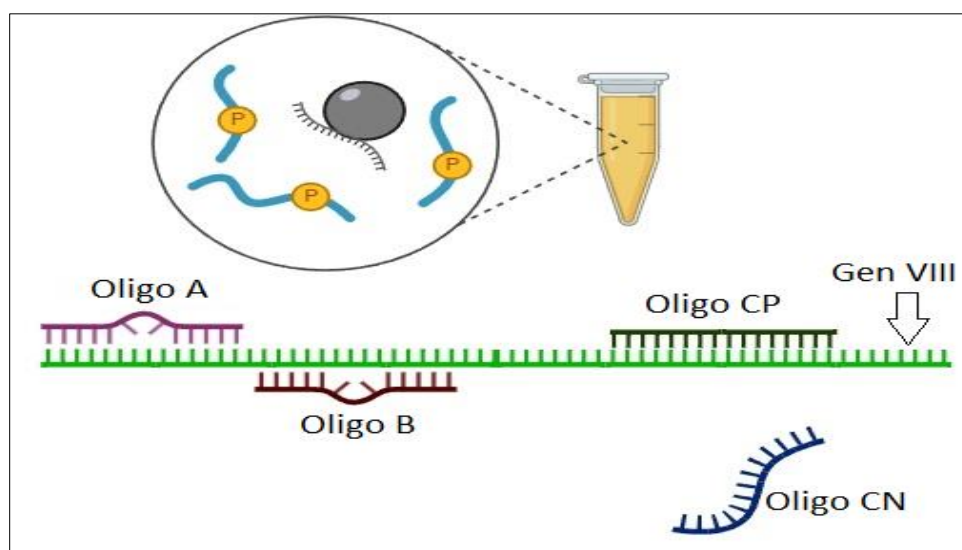
3.5 Diseño de los Oligonucleótidos

La elaboración de los *primers* se llevó a cabo con ayuda de la herramienta *Oligo Analysis Tool* disponible en <https://eurofinngenomics.eu/en/ecom/tools/oligo-analysis/> [65]. En base a la secuencia del DNA plasmídico del *M13mp18* **página 28**. Se diseñaron 4 oligos, uno con cero mutaciones, es decir se hibrida perfectamente y se nombró control positivo (CP), ya que es totalmente complementario. Se diseñaron otros 2 *primers*, los cuales tienen un *mismatch* (6 bases que no son complementarias), llamados oligo A y oligo B, finalmente se eligió un primer con cero complementariedades (control negativo), es decir que no se hibrida en ninguna región del *M13mp18* (ver **Tabla 5**). La forma en que si hibridan al genoma se representa en el **Esquema 2**.

Tabla 5. Secuencia de los oligos diseñados en este trabajo, en mayúsculas se indican las bases complementarias a la plantilla y en minúsculas las mutaciones, es decir no complementarias.

Oligo	Secuencia	Número de mutaciones (mismatch)
Oligo (A)	5' ACC gat ggc TTC GGT CGC TGA GGC TTG 3'	6
Oligo (B)	5' GCG gca ccg ATA TAT TCG GTC GC 3'	6
Control positivo (CP, 100% complementario)	5' ATA TAT TCG GTC GCT GAG 3'	0
Control negativo (CN, 0% complementario)	5' act act ttc ctc tct ggt gtt caa tgc 3'	27

Esquema 2. Esquema que muestra los oligos utilizados en este trabajo y su hibridación con el ssDNA del M13. Imagen diseñada en BioRender.com [20].



3.6. Interacción NP-Oligo-DNA

Para realizar los estudios de la interacción entre las NP metálicas, el oligo, y el DNA, se ensambló una reacción típica como se describe a continuación.

A una solución de 1200 μL AuNP, se le agregó 80 μL del oligo (19 μM), dejando reposar por 1 hr, a 32°C y 200 rpm en un *termo*, se dejó enfriar, se observó que las NP no presentaran algún cambio de color y finalmente se le agregó 80 μL de dsDNA (724.6ng/ μL), manteniendo la relación molar oligo:DNA (1:1). La solución cambio de color al instante y se tomó el espectro de UV-Vis y se analizó por DLS. Posteriormente la solución se calentó a 95° C en baño maria por 10 minutos para desnaturalizar el DNA, se dejó enfriar a temperatura ambiente por 2 horas y se tomó nuevamente el espectro de UV-Vis y DLS. La **Tabla 6** resume las diferentes reacciones que se hicieron con las AuNP y AgNP.

Tabla 6. Ejemplificación del ensamble de AuNP con el Oligo A y su funcionalización, seguido de la hibridación (desnaturalización) con la platilla de dsDNA.

Tubo eppendorf de 1.5mL							
Tubo	AuNP 3.5 nm	AuNP 5.5 nm	AuNP 8 nm	AuNP 17 nm	AuNP 37 nm	Oligo (A) (19 μM)	dsDNA (724.6ng/ μL)
1	1200 μL	—	—	—	—	80 μL	80 μL
2	—	1200 μL	—	—	—	80 μL	80 μL
3	—	—	1200 μL	—	—	80 μL	80 μL
4	—	—	—	1200 μL	—	80 μL	80 μL
5	—	—	—	—	1200 μL	80 μL	80 μL

3.7. Técnicas de caracterización

Las técnicas de caracterización utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

3.7.1. Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis).

La lectura de los espectros UV-Vis se llevó a cabo en espectrofotómetro Shimadzu 1800. Se empleó una celda de cuarzo de 1 cm de paso, el espectro se corrió en el intervalo de 200 a 900 nm a temperatura ambiente. Los experimentos se hicieron en celdas de plástico transparentes en la región donde absorbe los ácidos nucleicos.

3.7.2. Espectroscopia de dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering "DLS"*)

Determinación de la distribución de tamaño de partículas.

La carga y tamaño de las NP de cada muestra se determinó antes y después de la desnaturalización. El tamaño se midió en el equipo *MALVERN ZETASIZER NANO* modelo ZSP, con un láser de 10 mW de He-Ne a una longitud de onda de 632.8 nm. Se tomaron 1.2 mL de la muestra coloidal, usando una celda de 1 cm de paso óptico (modelo DTS0012) Los parámetros para el análisis del tamaño de partícula se ajustaron como se muestra a continuación:

- Tipo de método: *Size*
- Material: AuNP o AgNP, índice de refracción = 1.450, absorción = 0.001.
- Dispersante: agua, temperatura = 25° C, viscosidad = 0.8872 cP, índice de refracción = 1.330.
- Temperatura: 25° C, tiempo de equilibrio = 120 s.

Medición: ángulo de medida = 173° *backscatter (NIBS default)*, duración de la medición = manual, número de corridas = 10, duración de corridas = 10 s, número de medidas = 10, retraso entre mediciones = 0 s.

El potencial ZETA se determinó ajustando los siguientes parámetros:

- Material: AuNP o AgNP, índice de refracción = 1.450, absorción = 0.001.

- Dispersante: agua, temperatura = 25° C, viscosidad = 0.8872 cP, índice de refracción =1.330.
- Temperatura: 25° C, tiempo de equilibrio = 120 s.

En este caso se empleó el mismo equipo en el modo potencial zeta y la celda capilar (DTS1070).

Hay que revisar los espacios y la forma del párrafo para que quede igual en todo el documento

3.7.3. Electroforesis

Para nuestras muestras la electroforesis horizontal se realizó en un gel de agarosa al 0.5%, 1% y 2% en peso, empleando TBE 1X y SDS al 1% como buffer de corrida. El experimento se realizó a un voltaje a 100 V, manteniendo constante la corriente a 400 mA, durante 60 minutos.

3.7.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El tamaño y la visualización de la interacción de las NP con el DNA se estudió por microscopía electrónica de transmisión (TEM), usando un microscopio de transmisión electrónica marca JEOL 2010. Las muestras fueron preparadas en rejillas de cobre con recubrimiento de formvar de 300 mesh. Se tomaron 2-3 μ L de muestra y se depositaron en la rejilla, el exceso de líquido se retiró con papel filtro y las muestras se dejaron secar al aire.

Capítulo 4

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización de las nanopartículas de Au y Ag.

La **Figura 15A** muestra una fotografía de las soluciones de AuNP sintetizadas, las cuales muestran el color característico. Para las AuNP de ~ 3.5 nm observamos una solución rosa claro y la coloración va cambiando gradualmente a medida que aumenta el tamaño de AuNP, pasando de magenta hasta morado. El cambio progresivo en la coloración ha sido previamente observado en otros trabajos similares y reportado en la literatura [63].

Un comportamiento similar se observó en la fotografía de las soluciones de AgNP obtenidas. Las NP de $\sim 3,5$ nm muestran el color amarillo típico y vemos cambios en la coloración debido a los cambios en el tamaño de NP como se indica en la **Figura 15B** lo que está acorde con lo reportado por [64].

Para las NP sintetizadas, una vez transcurrido el tiempo de reacción, las AuNP y las AgNP fueron protegidas de la luz con papel aluminio para su almacenaje a temperatura ambiente ($\leq 25^\circ\text{C}$).

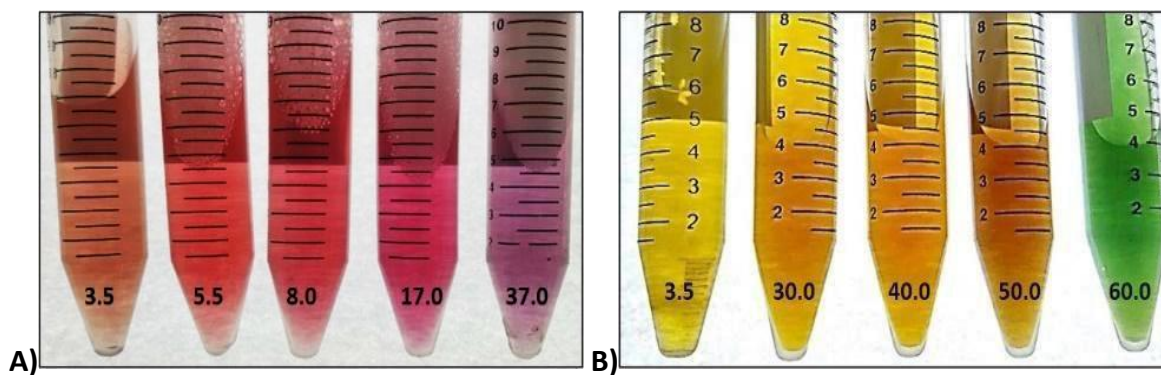


Figura 15. Fotografía de las soluciones de **A)** AuNP y **B)** AgNP ordenadas de acuerdo al tamaño.

4.2 Espectrofotometría UV-Vis

A pesar de que el cambio de color cualitativamente indica cambios en el tamaño se hizo un estudio por espectroscopía UV-Vis. Los espectros de las muestras frescas se observan en la **Figura 16**. De acuerdo lo esperado el plasmón de resonancia superficial (RPS-L) se desplazó de menor a mayor longitud de onda a medida que el diámetro de la NP aumentó.

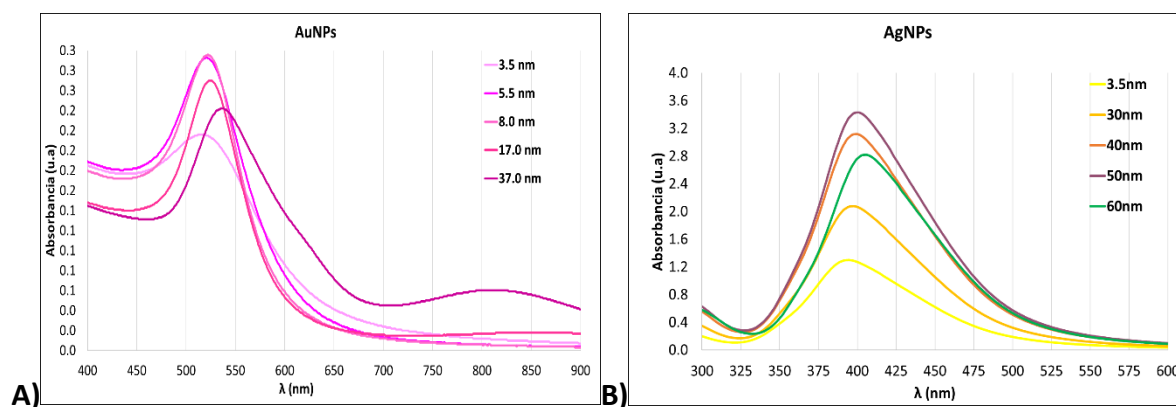


Figura 16. A) Espectro UV-Vis de AuNP, B) Espectro UV-Vis de AgNP.

En la **Figura 16 A** se observan los espectros UV-Vis de las AuNP, donde se observa que el máximo de absorbancia está en 0.22 u.a. a una longitud de onda de 512 nm para las AuNP de ~3.5 nm; conforme el tamaño de las NP va aumentando, el máximo de absorbancia se desplaza a mayores longitudes de onda (hacia el rojo), comportamiento ampliamente observado en la literatura [33]. Por ejemplo, las NP de ~37 nm presentan el máximo de absorción en ~525 nm (ver **Tabla 7**). También se observan diferentes intensidades de absorción, debido, posiblemente, a que el coeficiente de extinción es diferente en función del diámetro de las nanopartículas, así como la concentración. Cabe mencionar que a medida que el tamaño aumenta se observa la aparición de un nuevo máximo de absorción alrededor de 800 nm, posiblemente debido a la agregación de NP en línea, simulando nanovarillas de AuNP. Este experimento se reproduce con lo observado por otros autores [63].

Tabla 7. Características obtenidas de las AuNP. El tamaño de las NP y la carga superficial se reporta en nm y en mv, respectivamente. Los valores de la desviación estándar (*) en ambos casos son calculados por el software del equipo.

Resultados de la caracterización de las AuNP					
Diámetro de AuNP (nm)	λ_{max} (nm)	Color	DLS Diámetro teórico (nm)	DLS Diámetro (nm)	Potencial Z (mV)
3.5	512	Rosa claro	3.5	$3.8 \pm 1.1^*$	$-28.2 \pm 4.4^*$
5.5	520	rojo-vino	5.5	$5.9 \pm 1.8^*$	$23.7 \pm 3.6^*$
8	522	rojo-vino	8	$8.2 \pm 2.5^*$	$29.5 \pm 4.5^*$
17	524	rojo-morado	17	$16.8 \pm 5.1^*$	$35.9 \pm 5.5^*$
37	535/809	morado	37	$36.8 \pm 11.1^*$	$37.8 \pm 5.8^*$

En cuanto a la **Figura 16 B)** se muestran los espectros UV-Vis de las AgNP observando un comportamiento similar al de las AuNP, sin embargo, la RPS-L se encuentra alrededor de ~ 395 nm para las AgNP de ~ 3.5 nm de tamaño, característico del plasmón de la Ag. En la **Tabla 8** se muestran los valores correspondientes a la RPS-L en función del tamaño de las NP, que están en sintonía con lo reportado por Yaqiong *et al.* [64]. La absorbancia para las partículas más pequeñas presenta un valor de 1.30 u.a., indicando un valor mayor para el coeficiente de extinción ya que la concentración fue la misma que en el caso de las de AuNP. Esta es una razón de la importancia de emplear AgNP como biosensor ya que tiene mayor respuesta óptica muy fácil de captar, incluso a simple vista.

Tabla 8. Características obtenidas de las AgNP. Los valores de la desviación estándar (*) en ambos casos son calculados por el software del equipo.

Resultados de la caracterización de las AgNP					
Diámetro de AuNP (nm)	λ_{max} (nm)	Color	DLS Diámetro teórico (nm)	DLS Diámetro (nm)	Potencial Z (mV)
3.5	395	Amarillo	3.5	$3.7 \pm 1.1^*$	$-18.5 \pm 2.8^*$
30	397	Cobre	30	$31.3 \pm 9.4^*$	$-20.1 \pm 3.1^*$
40	399	Naranja	40	$41.9 \pm 12.6^*$	$-30.5 \pm 4.7^*$
50	401	Café	50	$49.6 \pm 14.9^*$	$-34.7 \pm 5.4^*$
60	405	Verde	60	$62.3 \pm 18.7^*$	$-38.2 \pm 5.9^*$

4.3 Espectroscopia dinámica de luz

4.4 Microscopia Electrónica de Transmisión.

Es posible estimar el tamaño de las NP de acuerdo al máximo de la RPS-L, ya que, como hemos mencionado el corrimiento de la RPS-L esta correlacionado con el tamaño de las NP, sin embargo, para tener una medida más cuantitativa se comprobó el tamaño de la partícula por DLS. Es importante observar que el equipo lo que mide en realidad es el radio hidrodinámico (el tamaño de una esfera rígida hipotética que se comporta del mismo modo que la partícula que se mide), y este está formado por el núcleo que corresponde a la NP en sí y una capa de la rodea que está formada por las moléculas que estabilizan la NP.

Los valores de tamaño obtenidos por DLS para las AuNP y AgNP se observan en las **tablas 7 y 8**, respectivamente. Es notable la correlación entre el tamaño esperado de acuerdo al máximo de la RPS-L y el valor obtenido por la técnica de DLS, ya que para las semillas de AuNP se esperaban tamaños de 3.5 y se obtuvieron de 3.8 nm con una desviación estar

estimada por el equipo de ± 1.1 lo cual teoriza que el tamaño de las AuNP sintetizado es el esperado, tal y como muestran las **tablas 7 y 8** para los otros tamaños de AuNP y AgNP sintetizados.

Si bien la tabla 7 muestra NP monodispersas, la distribución porcentual del tamaño se muestra los histogramas de la **Figura 17** de las AuNP, mostrando la distribución y puede observarse claramente que el máximo de la población se encuentra en el valor esperado con la desviación estándar ya mencionado. Cabe señalar que está en una medición muy acertada ya que se ha reportado que en NP entre 5 y 10 nm es complicado obtener porcentajes de poblaciones confiables por DLS de acuerdo a lo reportado en la literatura [66][67].

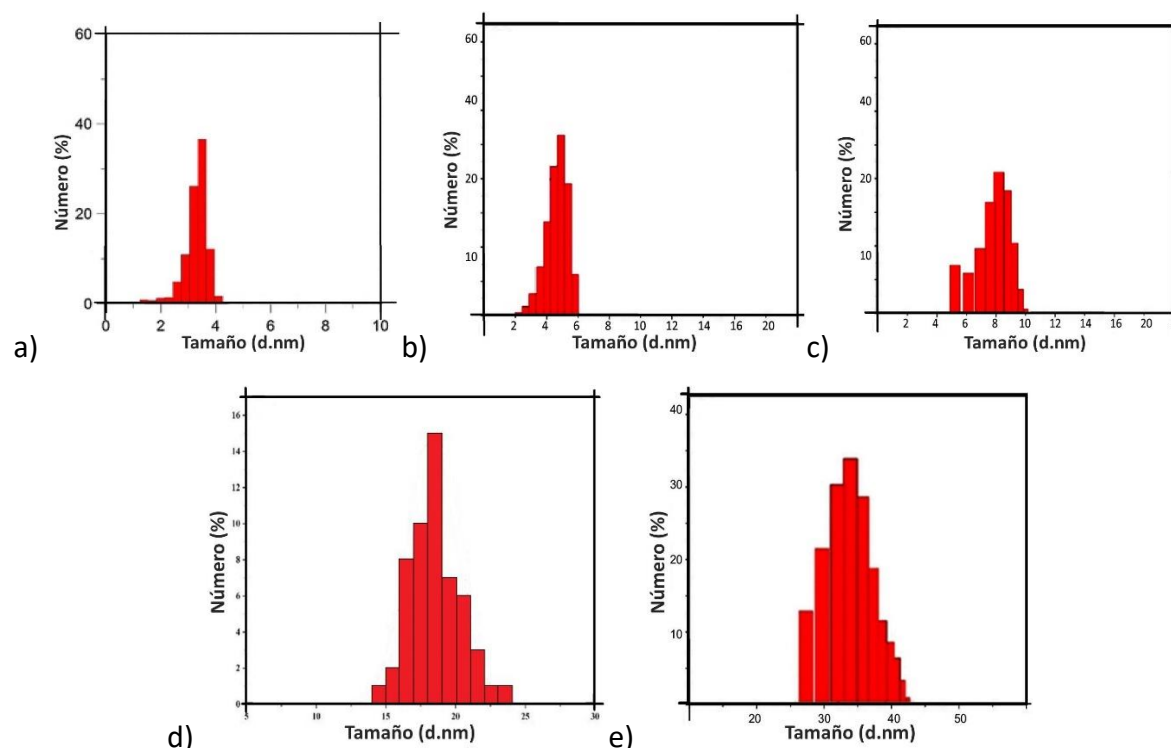


Figura 17. Imagen de los histogramas de las AuNP a) 3.5, b) 5.5, c) 8.0, d) 17.0, e) 37.0 nm, proporcionado por la técnica de DLS.

Estos histogramas nos ayudan a conocer el porcentaje de tamaño de NP en la solución coloidal, indicando el éxito de nuestra síntesis congruente a lo reportado en la literatura [7, 63].

En la **tabla 7 y 8** también se muestran los puntos máximos de absorbancia del RPS-L, el color de la solución AuNP, el tamaño medido por el DLS, de igual forma se muestra el potencial Z, que representa el trabajo necesario para llevar una unidad de carga desde el infinito a la superficie sin aceleración. Entonces el potencial Z mide la carga de las partículas en el plano deslizante. Esta información es relevante para conocer la estabilidad de la solución coloidal y evitar su agregación y coalescencia. Así en la tabla 7 observamos, que las AuNP de 3.5 nm muestra un potencial de -28.2 mV, mientras que las NP de mayor tamaño muestran un potencial positivo, en función del tipo de agente estabilizante. Las AuNP de 3.5 nm están estabilizadas por moléculas de citrato, mientras que las demás (5.5 a 37 nm) están estabilizadas por moléculas de CTAB [63].

De igual forma se muestran los histogramas e imágenes de TEM de las AgNP (ver **Figura 18**). La Figura 18 muestra claramente NP de un tamaño de alrededor de 3.5 nm acompañada del histograma obtenido por DLS, el cual corrobora el tamaño y la monodispersidad observada en la micrografía de TEM. Como puede observarse todas las NP, sin importar el tamaño tiene morfología esférica de acuerdo a lo esperado [64].

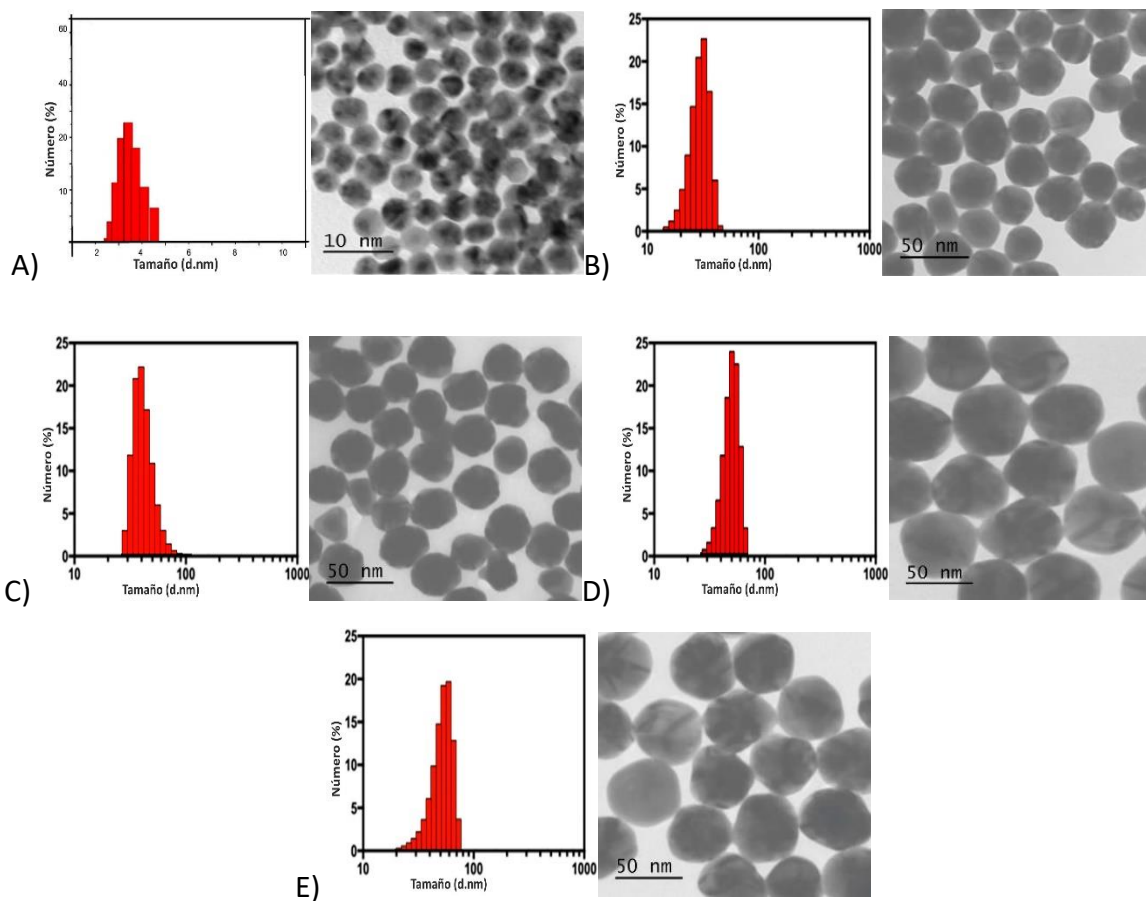


Figura 18. Imágenes de TEM e histogramas de AgNP **a)** 3.5, **b)** 30.0, **c)** 40.0, **d)** 50.0 y **e)** 60.0 nm.

En la **Tabla 8** se puede apreciar todas las propiedades de las NP, desde el color de la solución coloidal, pasando por el RPS-L hasta el potencial Z. Es notable que el potencial Z en este caso siempre es negativo debido a que las NP están estabilizadas por moléculas de citrato y a mayor tamaño, mayor volumen y mayor número de moléculas por lo que la carga disminuye a medida que aumenta el tamaño. Ambos resultados son consecuentes con lo reportado en la literatura [63-64].

4.5 Electroforesis horizontal en un gel de agarosa.

Para corroborar estos resultados también se realizó la electroforesis en gel de agarosa horizontal para las AgNP.

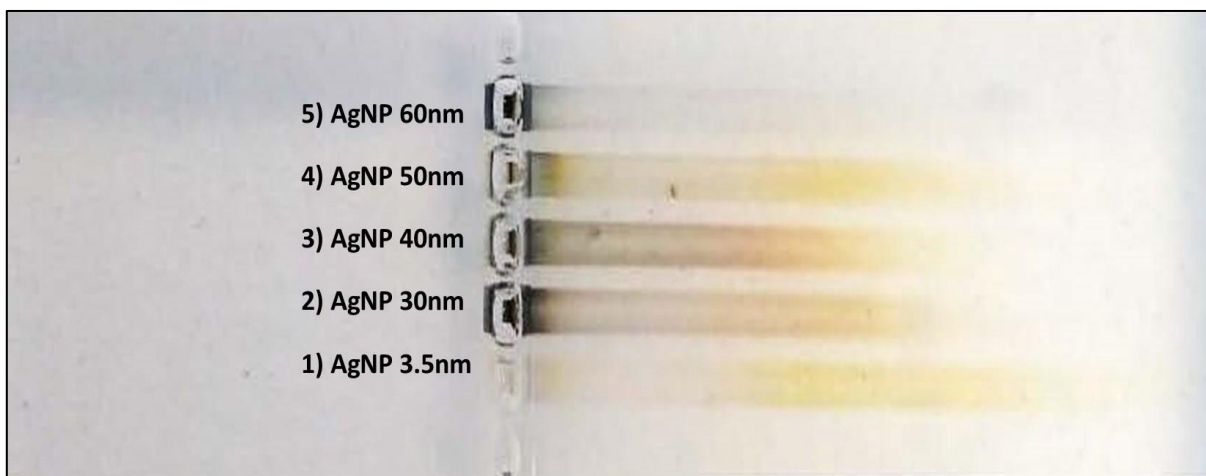


Figura 19. Electroforesis horizontal de AgNP.

La **Figura 19** corresponde a una fotografía de los resultados de electroforesis en un gel de agarosa al 1%, empleando TBE 1X como buffer de corrida. Las muestras fueron colocadas del polo negativo (-) hacia el polo positivo (+), ya que como se demostró en la **Tabla 8** el potencial zeta es negativo para estas NP. Las NP se colocaron desde el carril 1 hasta el 5 en función del tamaño, es decir las de 3.5 nm en el carril 1, las de 30 nm en el carril 2 y así sucesivamente. Como se espera migraron hacia el polo positivo, en función del tamaño, por lo que las de 3.5 nm son las que más migran, alrededor de 5 cm en promedio, mientras que en estas mismas condiciones la de mayor tamaño recorren algunos mm en el gel. Como se nota en la fotografía algunos carriles están bandeados, denotando así que tenemos tamaños diferentes de NP de acuerdo a los histogramas, sin embargo, el mayor porcentaje se centra en el tamaño esperado [68].

Muchas de las aplicaciones de las NP metálicas dependen de la estabilidad en un intervalo de tiempo, ya que en este trabajo esperamos que en un futuro estas puedan ser empleadas como biosensores, nos dimos a la tarea de estudiar su estabilidad en función del tiempo. La cual se determinó midiendo el tamaño por DLS durante un periodo de hasta 4 meses, tomando lecturas diaria, semanal y finalmente de manera mensual.

4.6 Estabilidad de las nanopartículas.

En la **Figura 20** se muestra la gráfica 1 **A)** y **B)** que corresponden a las lecturas por DLS de las AuNP a diferentes tiempos y temperaturas de 25°C y 32 °C, respectivamente. Los tamaños se determinaron en las NP recién hechas (lectura del día 1), donde las barras color rosa claro corresponden a AuNP de 3.5 nm y las barras color morado a AuNP de 37 nm. En el eje X tenemos su evolución en el tiempo y en el eje Y el tamaño en nm. Este estudio de maduración de Ostwald de NP implicó que las mediciones se hicieron manteniendo en reposo la solución y evitando cualquier tipo de agitación antes o después de la toma de las alícuotas a medir.

Es claro que el tamaño de las NP se mantuvo constante, es decir sin cambios apreciables los primeros 14 días a 25°C. Mientras que, después de 2 meses se observaron incrementos importantes, por ejemplo, para las NP de 3.5 nm de diámetro se observó un aumento de 500 % y para las de 37 nm un aumento de 400 %. Esto es notable ya que la literatura menciona que la temperatura de síntesis y la adición de sales juega un papel muy importante en la estabilidad de la NP donde a mayores temperaturas hay un mayor control de la nucleación y en este caso la reacción se realizó a temperatura ambiente [36] [69].

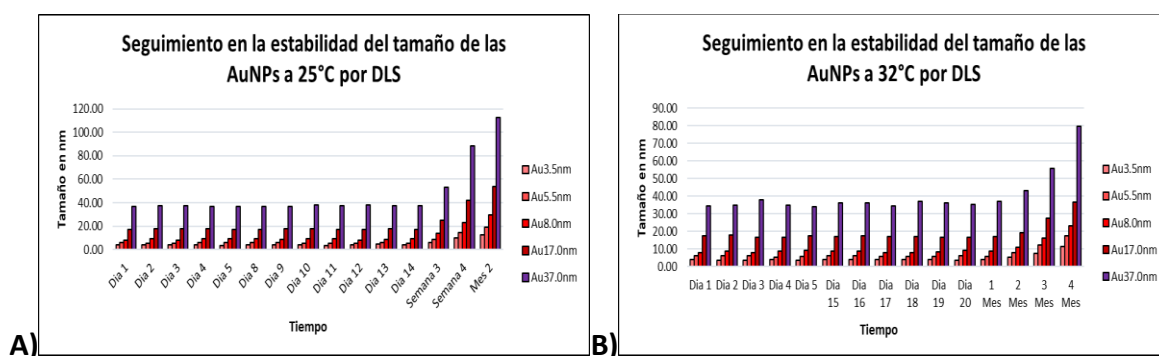


Figura 20. Grafica de la estabilidad del tamaño de las NP contra el tiempo **A)** a 25 y, **B)** a 32 °C.

Por otro lado, la **figura 23 B)** muestra el comportamiento de la estabilidad de las NP a 32 °C. Sorprendentemente un ligero aumento en la temperatura de almacenamiento extendió la vida de *stock*, desde 3 semanas hasta 2 meses. Estos resultados muestran que

la temperatura juega un papel importante en la estabilidad de las NP y debe tomarse en cuenta para el diseño de un prototipo de biosensor.

El mismo estudio se realizó para las AgNP. En la **Figura 21 A)** se aprecia la estabilidad del tamaño en función del tiempo, de manera similar las barras amarillas representan las AgNP de 3.5 nm y las de color verde a AgNP de 60 nm. Estas AgNP guardadas a temperatura ambiente presentan una mayor estabilidad respecto a las AuNP, ya que las de Ag tuvieron una mayor estabilidad a 25 °C manteniendo el tamaño alrededor de una semana más. En la literatura Piwonki et al. [70] mencionan que, en sus AgNP los resultados observados indican que la nucleación y el crecimiento posterior de las AgNP ocurren de acuerdo a la maduración de Ostwald para tiempos de iluminación más prolongados que con periodos más cortos, esto provocó una coalescencia de partículas contiguas.

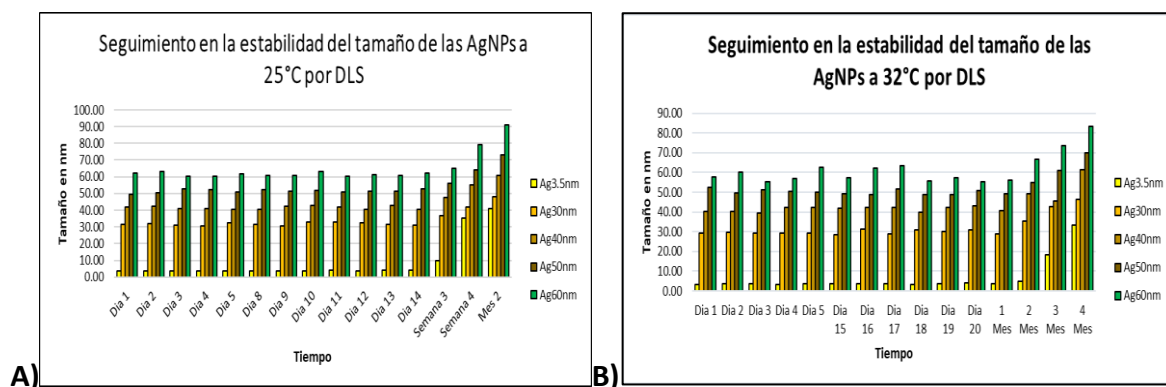


Figura 21. Gráfica que muestra el estudio en relación al aumento de tamaño (nm) con relación en el tiempo de las AgNP en incubación.

Del mismo modo se observa que el diámetro de las AgNP a una temperatura de 32 °C (**Figura 24 B**), muestran una mayor estabilidad respecto a las de 25 °C, ya que estas duraron alrededor de 2 meses y las de 25 °C la mitad de tiempo.

Una vez caracterizadas las NP y sobre todo estudiada su estabilidad se emplearon para el estudio de la interacción con las distintas moléculas de DNA (oligo y plantilla).

4.7. Caracterización del DNA.

El DNA se obtuvo mediante una *midiprep* como se indica en el **Esquema 1** (parte experimental). Así la solución que contenía el DNA se analizó por espectroscopía UV-Vis y electroforesis de agarosa. La **Figura 22** muestra los espectros de absorción para cada tipo de DNA obtenido; dsDNA, ssDNA, además de los oligos diseñados para este trabajo. En todos los casos se observa un máximo a 260 nm, característico de DNA así como valores estándar de la relación de absorbancia 260/280 para muestras puras. Y se observa que la absorbancia de la mezcla de moléculas de DNA es aditiva, es decir los valores de absorbancia corresponden a la suma algebraica del valor de cada solución.

La pureza y morfología se corroboró por electroforesis observada en la **Figura 22**. Los carriles muestran bandas típicas de DNA vistas con un transiluminador de UV. De izquierda a derecha se observa el marcador. En el carril de dsDNA se observan dos bandas típicas de moléculas circulares, a saber, la relajada y la super enrollada, siendo esta más compacta por lo que se observa mayor migración. En el último carril observamos una banda alrededor de 4500 atribuida a la cadena sencilla (ssDNA) de *M13mp18*.

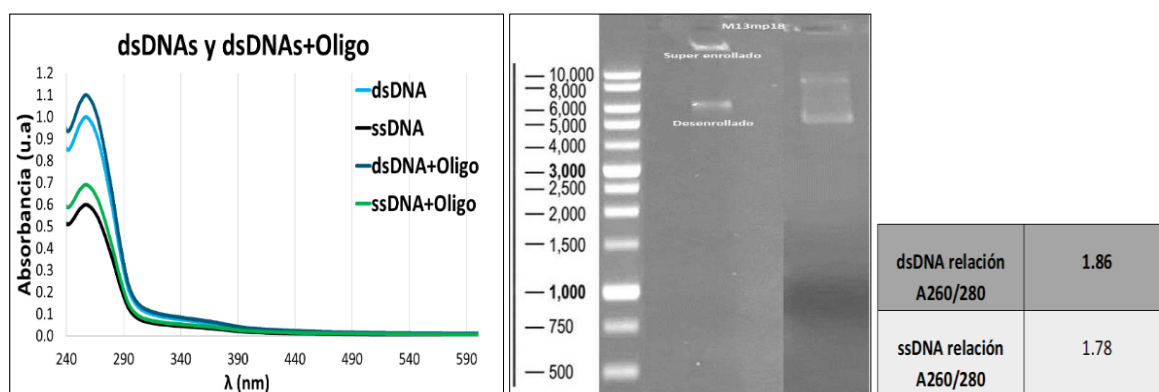


Figura 22. Espectro UV-Vis de los DNA realizado en un espectrofotómetro NanoDrop. Gel de electroforesis de DNA y relación de la pureza del DNA. Carril 1 marcador 1Kb plus, Carril 2 plásmido M13mp18 y carril 3 plásmido M13mp18 tratado con el DNA caracterizado y puro, al igual que las NP, se procedió a estudiar la interacción entre ambos componentes.

4.8. Funcionalización de las NP con el oligo de DNA.

Antes de realizar las reacciones de desnaturalización-hibridación (DNA-oligos) se verificó la correcta funcionalización de las NP con los oligos correspondientes. Se tomó el espectro UV-Vis de las NP-oligo y la **Figura 23** muestra que no hubo cambios significativos en los RPS-L y se observa la banda típica a 260 de DNA, corroborando así el desplazamiento de los agentes estabilizantes por los oligos.

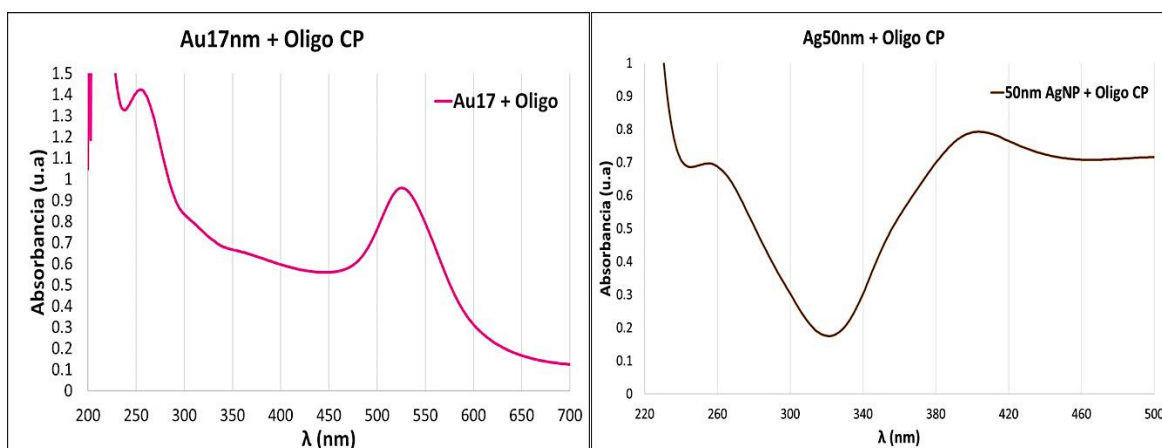


Figura 23. Espectro UV-Vis de la funcionalización de NP-DNA.

Como se observa los máximos de absorbancia para el RPS-L se mantienen constantes a 524 y 406 nm para las AuNP y AgNP, respectivamente. Por lo tanto, estos resultados denotan que las NP se funcionalizaron correctamente con el oligo sin alterar sus propiedades ópticas.

4.9. Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AuNP17-oligoA con dsDNA.

Se realizó la funcionalización de las AuNP con el oligo A (el cual tiene 6 mutaciones), este oligo recubre la superficie de las NP, probablemente mediante interacciones con el grupo amino (NH_2) de los nucleótidos del oligo, desplazando así a las moléculas estabilizantes. Ya que este oligo es complementario y antiparalelo al DNA objetivo; que es el Gen VIII del DNA del fago *M13mp18*, puede hibridarse con él.

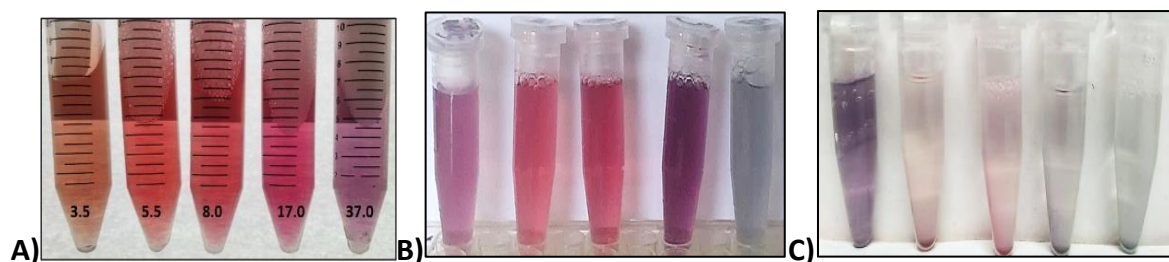


Figura 24. A) Soluciones de AuNP frescas, B) Soluciones de AuNP-OligoA-dsDNA C) Soluciones de AuNP-OligoA-dsDNA después de desnaturalizar a 100°C.

En primera instancia se observa que la interacción de las AuNP-OligoA-dsDNA antes de la desnaturalización produce cambios rápidamente en la coloración de las AuNP, como se observa de la **Figura 24 A)** a la **B)**, esto posiblemente ocasionado por interacciones no específicas entre las bases del oligo y el DNA, provocando la agregación de las NP, y por ese motivo, las soluciones cambian de color. Después de la desnaturalización a 100° C (**Figura 24 C)**, observamos que las NP volvieron a cambiar de color, volviéndose de un color más tenue, incluso transparente, ya que las AuNP precipitaron casi por completo, después de la desnaturalización, debido a la interacción específica entre el oligoA y el DNA objetivo, desprotegiendo la superficie de las NP y causando su coalescencia. Este comportamiento de las AuNP es el esperado para interacciones específicas ya que en otros trabajos [71] observan un comportamiento similar, pero empleando anticuerpos y antígeno de la proteína S (*spike*) del SARS-CoV-2, en el cual las AuNP se agregaron rápida e irreversiblemente debido a la interacción entre el anticuerpo y el antígeno y, en consecuencia, cambiaron de color del rojo al violeta, incluso determinaron el límite de detección siendo de 48 ng/mL.

Con estos cambios en la coloración, su relación RPS-L, y por espectroscopía UV-Vis, DLS, y TEM se pudo investigar los cambios efectuados en las NP provocados por las interacciones con el DNA. En este caso solo resaltaremos los resultados de las NP de 17nm, ya que son las que presentaron un cambio de color más evidente respecto a las demás. Aunque cabe mencionar que se estudiaran todas las reacciones con todos los tamaños de NP sintetizados.

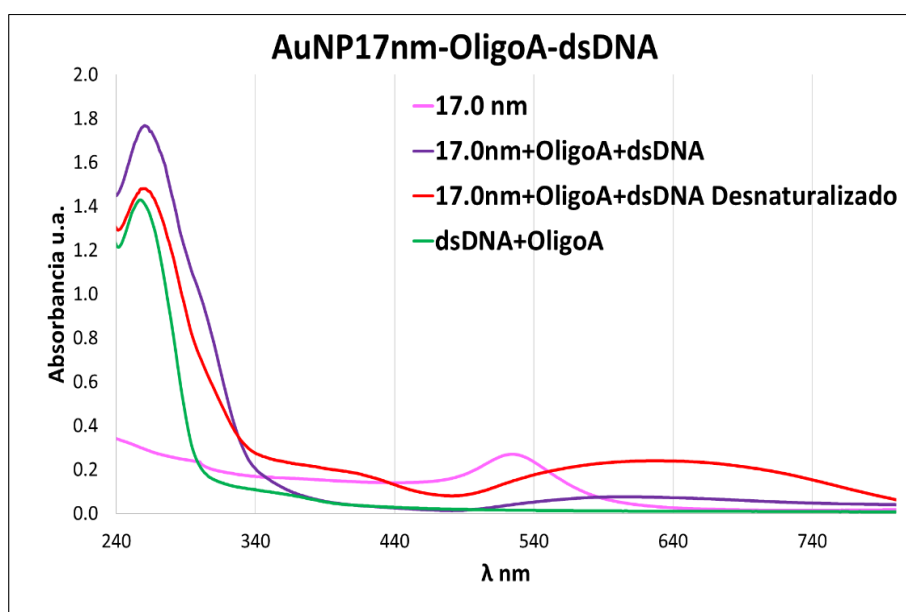


Figura 25. Espectro UV-Vis de la interacción AuNP-Oligo-DNA. En color verde el espectro UV-Vis de las AuNP puras, en rojo la interacción de AuNP-Oligo(A)-dsDNA, en negro la interacción de AuNP-Oligo(A)-dsDNA después de ser desnaturalizado y en azul el espectro UV-Vis del DNA con el oligo.

Para el caso de la espectrofotometría se observan corrimientos y ensanchamientos en el RPS-L-L como se describe a continuación. La **Figura 25** muestra los espectros de la interacción entre AuNP 17nm-OligoA-ds-DNA antes y después de la desnaturalización, en todos los espectros se muestra la banda típica del RPS-L-L de las AuNP, observando que hay un ensanchamiento de la banda cuando interaccionan con las NP, desde 524 nm hasta 607 nm, así como un aumento en la intensidad en la señal de DNA de 1.4 a 1.9, ya que la absorción para el DNA es aditiva. Este comportamiento es similar a lo observado por Karakus *et al.* [71]. Después de desnaturalizar este efecto se fortalece, haciéndose más ancha e intenso RPS-L.

Interesantemente, la banda del DNA sufre un desplazamiento de 260 a 275 nm, lo cual nos revelaría que hay una interacción entre las AuNP y el dsDNA, tal y como ocurrió en el trabajo de Sohn *et al.* [72] donde el máximo de absorción se movió hacia el rojo y se observa un efecto hipocrómico (disminuye la intensidad), respecto a la muestra sin desnaturalizar. Este efecto se debe, probablemente a interacciones entre el oligo y el dsDNA, sin embargo, más experimentos son necesarios para explicar este comportamiento.

El incremento de las AuNP debido a la interacción con dsDNA, fue verificada mediante DLS. En la **Tabla 9** se muestra que los diámetros hidrodinámicos de las NP aumentan después de agregar y desnaturalizar el dsDNA, como resultado de la agregación de las NP, ya que el dsDNA desplaza al oligo y su consecuente desprotección. Respecto de la carga (potencial zeta) se observa una disminución, que continúa incluso después de la desnaturalización, ya que el CTAB (q+) es desplazado por DNA (q-) (Ver **Tabla 9**).

Tabla 9. Características obtenidas de las AuNP-Oligo(A)-dsDNA. Los tamaños y potenciales de las AuNP con su respectiva la desviación estándar (*) fueron obtenidos por el mismo equipo de caracterización

Au 17.0 nm	AuNP	AuNP+OligoA+dsDNA	AuNP+OligoA+dsDNA denaturalizado
Longitud de onda	524 ± 0.5* nm	607 ± 0.5* nm	625 ± 0.5* nm
Diámetro hidrodinámico	16.8 ± 5.1* nm	265.4 ± 79.6* nm	1585 ± 475* nm
Potencial	35.9 ± 5.5* mV	30.2 ± 4.6* mV	12.8 ± 1.1* mV
Longitud de onda dsDNA	259 ± 0.5* nm	260 ± 0.5* nm	260 ± 0.5* nm

Finalmente, se visualizó por TEM la formación de agregados. Como se observa la **Figura 26** las AuNP forman una línea que infiere la estructura alargada del ds-DNA y que estabiliza a las NP. [72]

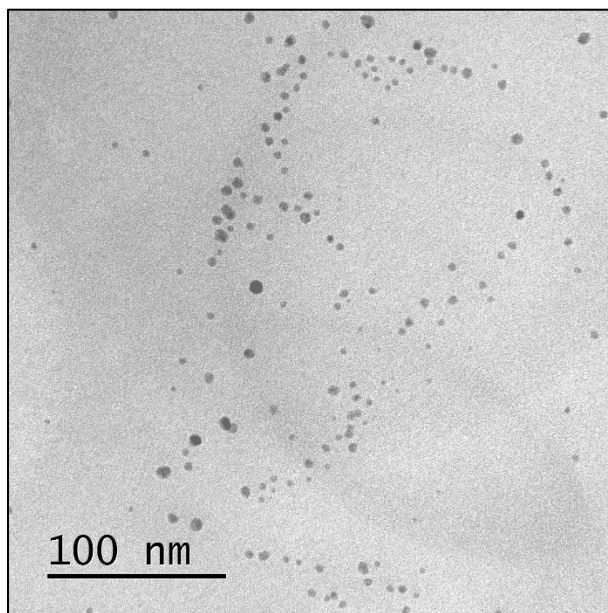


Figura 26. Imagen de TEM de la interacción de AuNP-Oligo(A)-dsDNA después de desnaturalizar.

Se propuso un posible mecanismo de interacción entre las NP, el oligo y el DNA objetivo, mostrándose en la **Figura 27**. En el Paso 1., las NP, originalmente estabilizadas por moléculas de CTAB son intercambiadas por moléculas del oligo. Posteriormente, (Paso 2) se agrega ds-DNA con el gen objetivo. Paso 3., la mezcla se desnaturaliza, durante este proceso se produce una horquilla entre el oligo y el DNA separándose por completo de la NP y provocando que estas se desestabilicen induciéndola aglomeración y consecuente precipitación de las NP, en concordancia a lo reportado por otros autores [73].

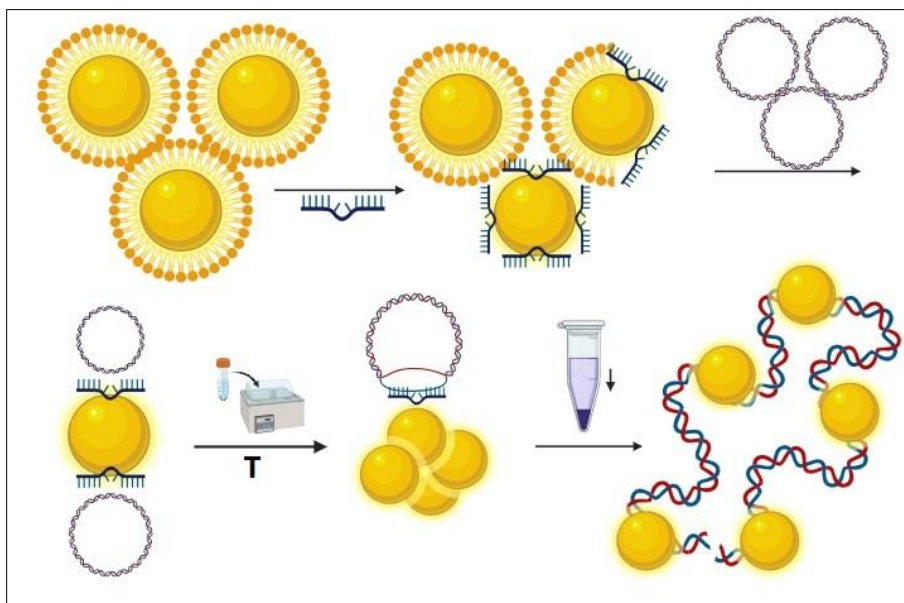


Figura 27. Imagen que ilustra el mecanismo posible de las interacciones de las AuNP con el dsDNA durante el proceso de desnaturalización. Imagen diseñada en BioRender.com [20].

4.10. Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AuNP17-oligoA con ssDNA.

De la misma forma que en el caso anterior, se realizó la interacción de las AuNP con el oligo-A. Se utilizó el oligo A con las 6 mutaciones y se estudió el cambio provocado por esta interacción de ssDNA con las AuNP. Note que en este caso se empleó una molécula de cadena sencilla con el mismo gen objetivo.



Figura 28. A) Soluciones de AuNP originales, B) Soluciones de AuNP-Oligo(A)-ssDNA, C) Soluciones de AuNP-Oligo(A)-ssDNA después de desnaturalizar.

Al primer contacto se observan cambios a simple vista (**Figura 28 B**), ya que las soluciones viraron de color inmediatamente, como se observa, las NP de 17 nm pasaron de color rojo vino a color morado. Después del proceso de desnaturalización se observan cambios nuevamente (**Figura 28 C**), y se nota que las AuNP precipitaron (no mostrado) con la

consiguiente disminución en la intensidad. Esta observación está de acuerdo con lo obtenido en la **Figura 29**, en el cual el RPS-L es casi imperceptible debido a la interacción AuNP-OligoA-ssDNA que provoca la precipitación de las NP. Estos resultados son similares a los resultados obtenidos por Tan *et al.* cabe mencionar que en nuestro caso no estamos ajustando la fuerza iónica para delimitar el estudio únicamente a las interacciones puente de hidrógeno entre el DNA [74].

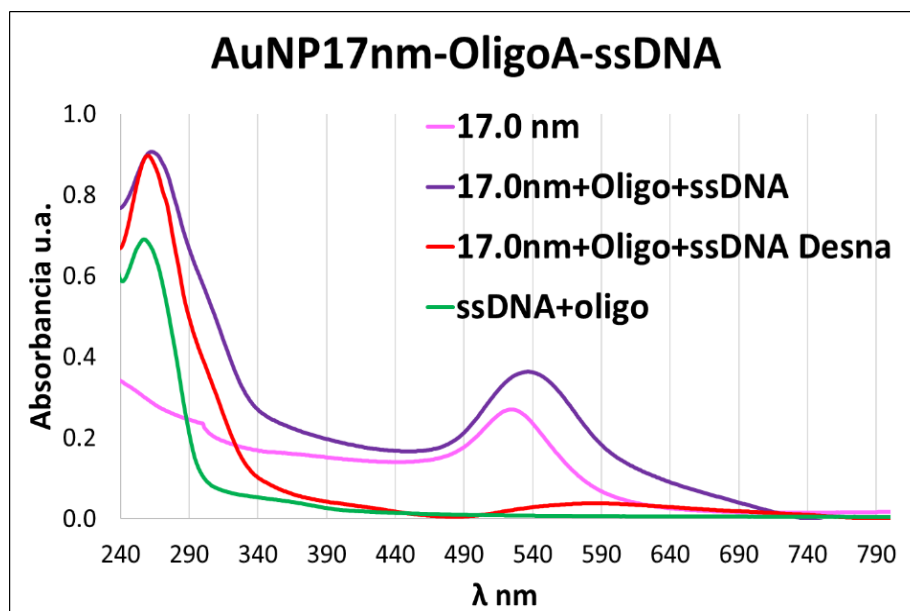


Figura 29. En rosa el espectro UV-Vis de las AuNP, en morado el espectro UV-Vis de la interacción de AuNP-Oligo(A)-ssDNA, en fiusha el espectro UV-Vis de la interacción de AuNP-Oligo(A)-ssDNA después de ser desnaturalizado y en verde el espectro UV-Vis del DNA con el oligo.

Los espectros muestran un ensanchamiento del RPS-L en la primera interacción (línea color morado) y después del proceso de desnaturalización notamos un ensanchamiento aun mayor y una baja en la intensidad de los RPS-L de las NP, posiblemente por la precipitación de las NP.

Tabla 10. Características obtenidas de las AuNP con la interacción con el DNA. Los tamaños y potenciales de las AuNP con su respectiva la desviación estándar (*).

Au 17.0 nm	AuNP	AuNP+OligoA+ssDNA	AuNP+OligoA+ssDNA denaturalizado
Longitud de onda	$524 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$536 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$587 \pm 0.5^* \text{ nm}$
Diámetro hidrodinámico	$16.8 \pm 5.1^* \text{ nm}$	$952.6 \pm 285.8^* \text{ nm}$	$1719.7 \pm 515.9^* \text{ nm}$
Potencial	$35.9 \pm 5.5^* \text{ mV}$	$20.7 \pm 3.2^* \text{ mV}$	$19.8 \pm 3.5^* \text{ mV}$
Longitud de onda ssDNA	$259 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$262 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$260 \pm 0.5^* \text{ nm}$

Esta aglomeración de las AuNP debida a la interacción con DNA fue verificada mediante DLS. En la **Tabla 10** muestran los valores obtenidos mediante esta técnica, notando que los diámetros hidrodinámicos de las NP aumentan de tamaño, y, debido a la agregación, más que a la coalescencia de las AuNP. Respecto de la carga, se observa que las moléculas estabilizantes probablemente son reemplazadas por las moléculas de ssDNA, lo que hace que haya un cambio notable en el potencial zeta; ya que el CTAB (q+) es desplazado por ssDNA (q-), desde 35.9 hasta 19.8 mV.

Por otro lado, para verificar esta agregación entre el DNA y las AuNP se obtuvieron imágenes de TEM. Como se observa en la **Figura 30** las NP forman un cúmulo debido a la disociación de estas con el oligo, ya que el oligo se hibridó al DNA. Esta interpretación ya sido reportada por otros investigadores [75] lo que confirma nuestra hipótesis.

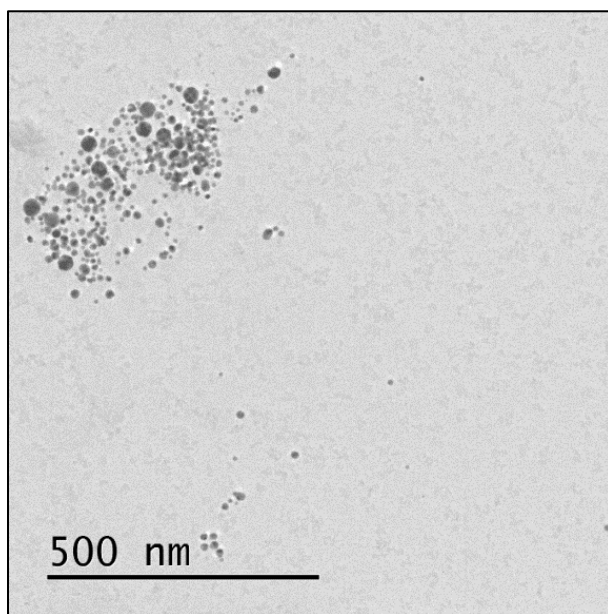


Figura 30. Imagen de TEM de la interacción de AuNP-Oligo(A)-ssDNA después de la desnaturalización.

De igual forma, se propuso un mecanismo de interacción entre las NP, el oligo y el DNA objetivo, mostrándose en el siguiente esquema (**Figura 31**), el cual ilustra el posible la interacción entre las NP que están estabilizadas por moléculas como CTAB, que son desplazadas por el oligo, quedando funcionalizadas, finalmente, con oligo. Al agregar DNA las moléculas de oligo tiene preferencia por el DNA complementario, lo cual se acentúa con la desnaturalización, provocando la aglomeración cómo se mostró en la Fig. 33.

Cabe mencionar que este efecto se ha observado para otro tipo de interacciones específicas: proteína-ligando, aptamero-DNA, observando siempre agregación de NP como lo indica el cambio de color y el desplazamiento del RPS-L hacia el rojo como lo esquematiza Xia y colaboradores [73].

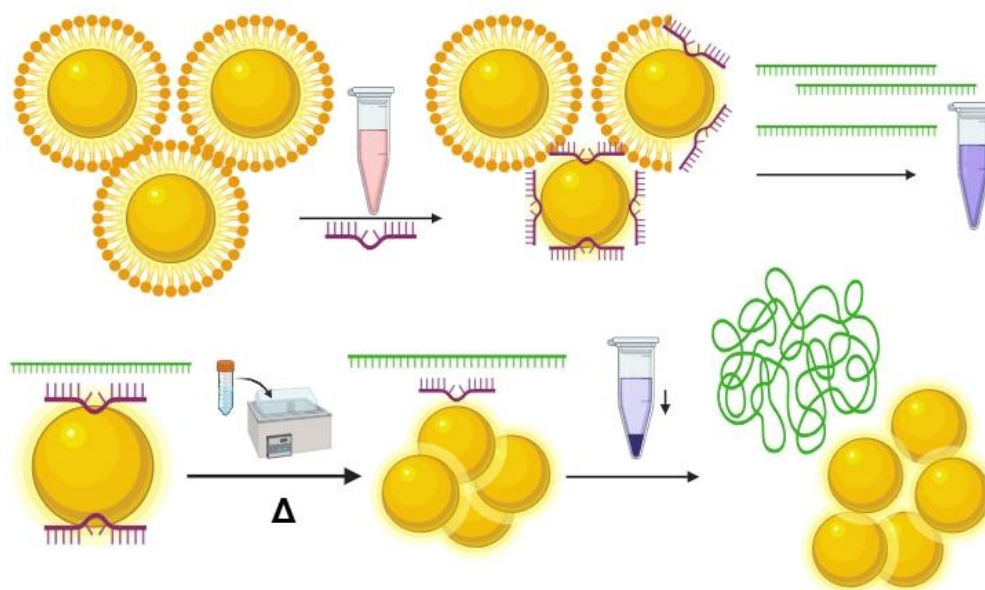


Figura 31. Imagen que ilustra el mecanismo posible de las interacciones de las AgNP con el ssDNA. Imagen diseñada en BioRender.com [20].

Por otro lado, también se realizó el estudio de esta interacción por espectroscopia IR (**Figura 32**) de las AuNP-OligoCP-dsDNA, el oligo CP es el oligo totalmente complementario, es decir, no tiene mutaciones. Una primera observación es la aparición de picos; en las NP después de su interacción con ácidos nucleicos, a 3500 a 3200 cm^{-1} indicando la existencia de los grupos hidroxilos y las aminas, respectivamente, provenientes de las moléculas de DNA, así como las bandas entre 1400 y 1700 cm^{-1} debidas a las vibraciones de los enlaces C=O, C=C and C=N [76]. Del espectro es claro que hubo un desplazamiento de las moléculas estabilizantes por las moléculas de DNA, las cuales estabilizan ahora a las NP.

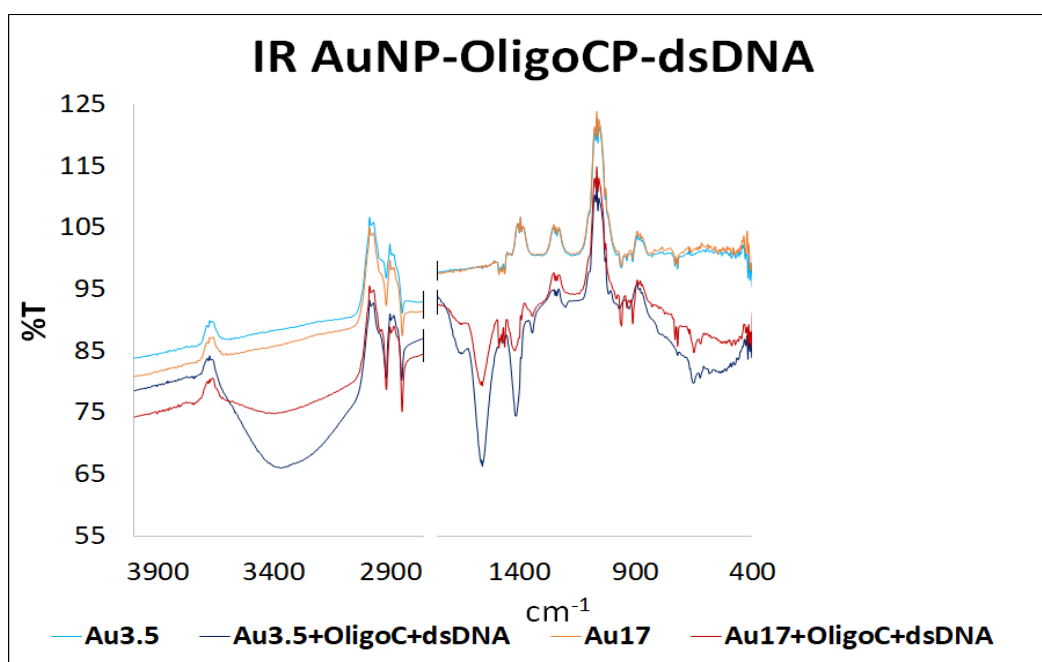


Figura 32. Espectrofotometría IR de las AuNP y su interacción con las diferentes moléculas de ácido nucleico.

4.11. Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AuNP17-oligoCN con dsDNA.

Para demostrar las interacciones entre oligos y DNA complementario, también se realizó el experimento con un oligo no complementario (CN, este oligo es totalmente diferente a las secuencias del *Gen VIII* del dsDNA del *M13mp18*). En principio el oligo se adsorbería a la superficie de las NP desplazando a la molécula estabilizante, sin embargo, al agregar el DNA y desnaturalizar no se observan cambios significativos de color (ver **Figura 33**), confirmando que el oligo tiene preferencia por las NP y no por el DNA.

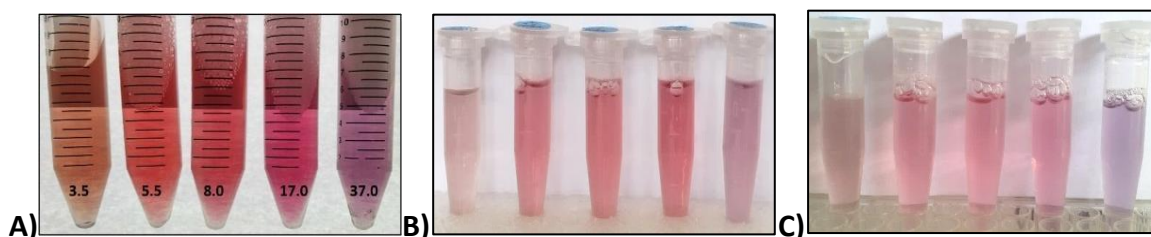


Figura 33. A) Soluciones de AuNP originales, B) Soluciones de AuNP-Oligo(A)-dsDNA, C) Soluciones de AuNP-Oligo(A)-dsDNA después de desnaturalizar.

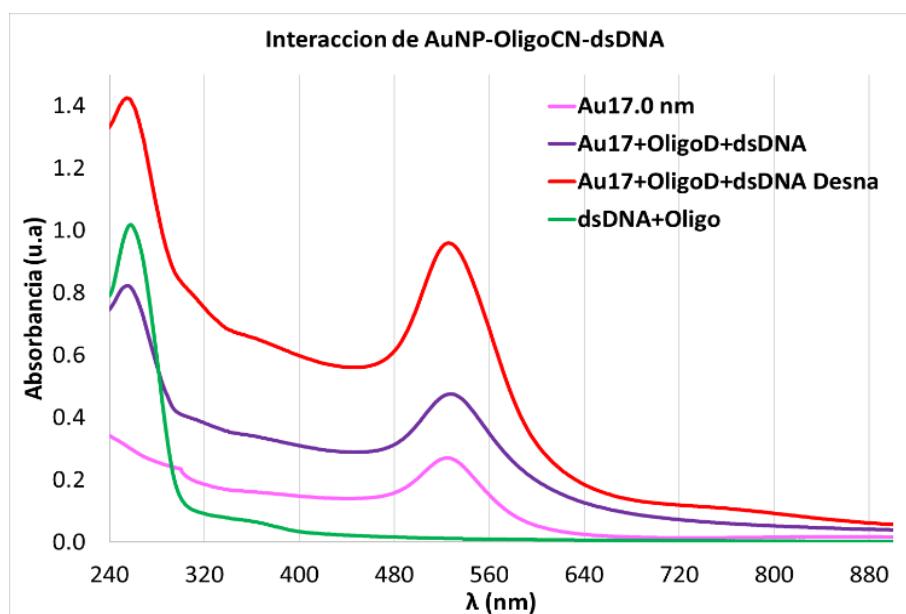


Figura 34. Espectros de la interacción de las AuNP17-oligoCN con dsDNA. En color rosa el espectro UV-Vis de las AuNP 17 nm, en morado la interacción de AuNP-OligoCN-dsDNA, en rojo AuNP-OligoCN-dsDNA después de ser desnaturalizar y en verde el DNA.

En la **Figura 34** observamos el espectro del DNA en color verde, el cual tiene un máximo alrededor de los 260 nm y las NP un tienen máximo en 505 nm (línea rosa), de acuerdo a lo esperado. Como se observa los espectros no muestran cambios en el máximo del RPS-L indicando que las NP no se están agregando, lo que está de acuerdo con nuestra observación para el color de la mezcla, que no cambia de tonalidad ya que el oligo y el DNA no son complementarios. A diferencia del oligo A que posee cierta complementariedad y la solución cambio de color.

Capítulo 5

5. Interacción AgNP-DNA.

Como ya se mencionó las AgNP poseen ventajas sobre las AuNP, por ejemplo, tienen un coeficiente de extinción mayor, y su gama de colores es más diversa, e incluso tiene un mayor intervalo de absorbancia ya que absorben desde los 390 nm hasta el IR cercano en función del tamaño y de la forma [42]. Por estas razones hay un gran interés por observar el comportamiento de estas en ensayos colorimétricos ya que pueden tornar desde el color amarillo hasta el marrón, pasando por el azul, indicando diferentes grados de agregación. Así, en este trabajo nos propusimos estudiarlas como potenciales detectores más eficaces para la fabricación de biosensores colorimétricos. En esta investigación, las AgNP se emplearon en la detección del Gen VIII del plásmido M13mp18, por lo que a continuación, presentaremos los estudios realizados con ellas, mostrando solamente los resultados con las NP de 30 nm, ya que estas mostraban mayores cambios de color a la vista, lo que en un futuro permitiría el diseño de dispositivos de detección sin el uso de equipos sofisticados.

5.1 Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AgNP30-oligoA con dsDNA.

En la **Figura 35 A)** se pueden observar a las AgNP tal como se sintetizaron, seguida de una imagen justo después de la adición del oligo A y del DNA en la cual es muy notable el cambio de color a simple vista sin importar el tamaño AgNP. Después de la desnaturalización no solo hubo un cambio de color, sino que se formó un precipitado de NP.

Como ya se mencionó esto se debe a la estabilización de las NP por el oligo, sin embargo, este se disocia y se hibrida con el DNA objetivo después de la desnaturalización conduciendo a su aglomeración y posterior precipitación.

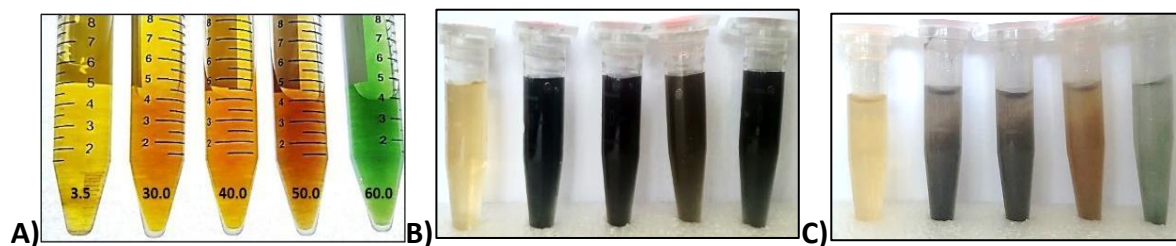


Figura 35. A) Soluciones de AgNP originales, B) Soluciones de AgNP-Oligo(A)-dsDNA, C) Soluciones de AgNP-Oligo(A)-dsDNA después de desnaturalizar.

Esta hipótesis fue demostrada por otros estudios como se menciona a continuación. En la **Figura 36** se observan los espectros UV-Vis de las AgNP 30 con y sin oligo A, y con y sin dsDNA. En la línea verde tenemos el RPS-L de AgNP, la cual sufre un ligero desplazamiento y ensanchamiento al agregar el DNA, fenómeno que se profundiza a la desnaturalizar la muestra, ensanchando aún más su de RPS-L y por lo tanto conduciendo a su agregación y coalescencia. Estos resultados son satisfactorios ya que tienen un comportamiento similar al encontrado en la literatura [77], en este estudio, la melanina de sésamo negro tiene una absorción máxima desde 210 nm hasta 403 nm, acompañada de un cambio de color de amarillo claro a marrón, lo que confirmó la formación de un complejo Mel-AgNP.

Cabe mencionar que este fenómeno es muy pronunciado también en nuestros estudios con el DNA, como se esperaba, probando que podría resultar en el desarrollo de un método más sensible y fácil de detectar a simple vista respecto a las AuNP, que es uno de nuestros objetivos.

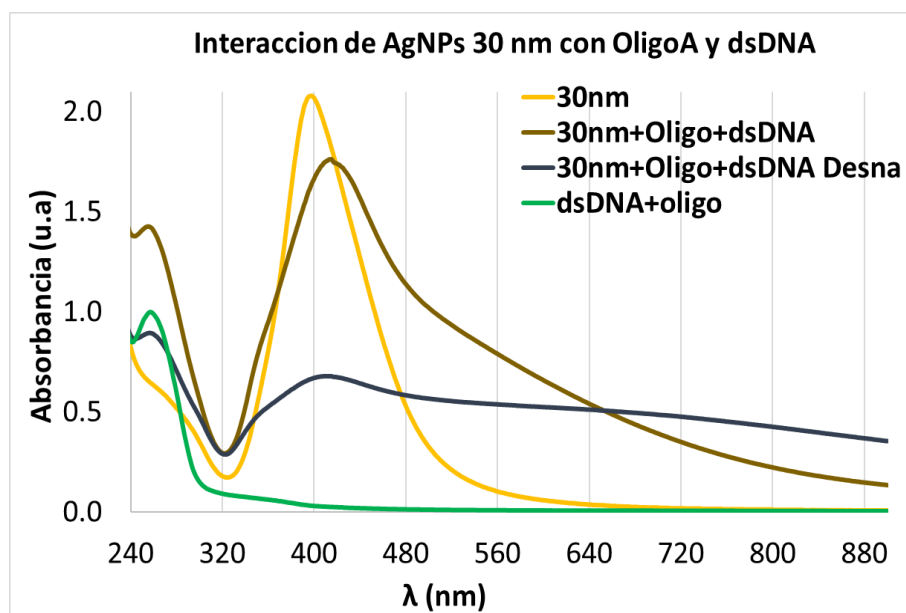


Figura 36. En verde el espectro UV-Vis de las AgNP, en rojo el espectro UV-Vis de la interacción de AgNP-Oligo(A)-dsDNA, en negro el espectro UV-Vis de la interacción de AgNP-Oligo(A)-dsDNA después de ser desnaturalizado y en azul el espectro UV-Vis del DNA con el oligo.

En la **Tabla 11** se presentan las características obtenidas por medio del DLS de las AgNP, dónde tenemos a las AgNP; por sí solas, con un máximo de absorción a 397 nm y en su primera interacción con el dsDNA y el oligo su máximo de absorción paso a 412 nm, y después de la desnaturalización a 408 nm. Por otro lado, el radio hidrodinámico de las AgNP era de 31.3 nm, el cual se incrementó al agregar el oligo y el DNA a 78.2 nm, y posterior a la desnaturalización creció a 291 nm.

En cuanto al potencial Z las AgNP presentaron un potencial de -20.1 mV y en su primera interacción con el dsDNA y el decreció a -25.8 mV, después de la desnaturalización hubo un cambio nuevamente ya que presentó un potencial de -29.5 mV. Estos resultados apoyan el

mecanismo que hemos propuesto, en el cual el DNA desplaza a las moléculas estabilizantes produciendo la disminución en la carga y después de la desnaturalización ya no es el oligo, sino la molécula de DNA que estabiliza la superficie manteniendo un potencial negativo. Nuevamente, estos resultados están en línea con los que se ha reportado para otros trabajos entre AgNP y biomoléculas [77] validando nuestra propuesta de interacción-aglomeración.

Tabla 11. Características obtenidas de las AgNP con la interacción de las diferentes moléculas de DNA. Los tamaños y potenciales de las AgNP con su respectiva la desviación estándar (*).

Ag 30 nm	AgNP	AgNP+OligoA+dsDNA	AgNP+OligoA+dsDNA denaturalizado
Longitud de onda	$397 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$412 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$408 \pm 0.5^* \text{ nm}$
Diámetro hidrodinámico	$31.3 \pm 9.4^* \text{ nm}$	$78.2 \pm 7.8^* \text{ nm}$	$290.8 \pm 87.2^* \text{ nm}$
Potencial	$-20.1 \pm 3.1^* \text{ mV}$	$-25.8 \pm 3.9^* \text{ mV}$	$-29.5 \pm 3.4^* \text{ mV}$
Longitud de onda dsDNA	$259 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$256 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$257 \pm 0.5^* \text{ nm}$

Este ordenamiento (agregación) pareciera alinear a las NP sobre el eje de DNA como muestran las imágenes TEM (ver **Figura 37**) y explicando el cambio de color y el cambio en potencial zeta.

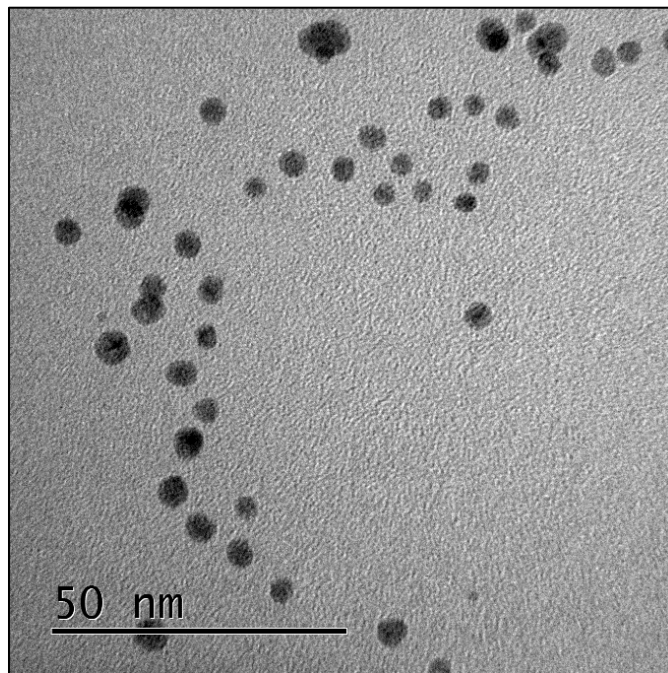


Figura 37 Imagen TEM de las AgNP con la interacción del oligo A y el dsDNA.

5.2 Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AgNP30-oligoA con ssDNA.

En la **Figura 38** se pueden observar a las AgNP antes y después con la interacción con el oligo(A) y ssDNA, las cuales cambiaron de color dramáticamente al entrar en contacto con el ssDNA y precipitaron después de la desnaturalización.

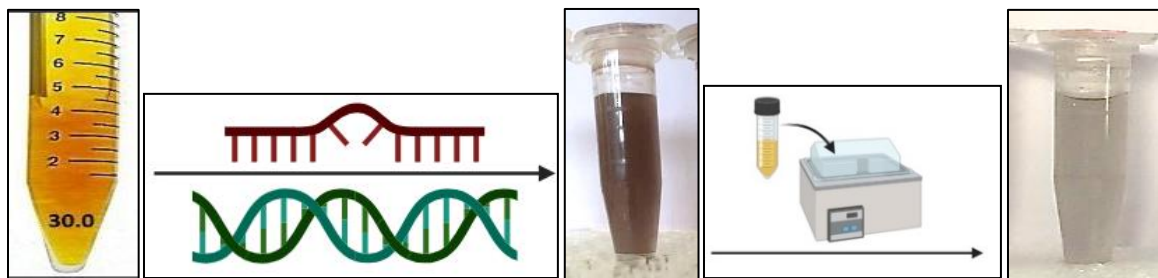


Figura 38. Fotografía de las AgNP (izquierda) con oligo-ssDNA (central) y después de desnaturalizar (derecha).

El espectro de UV-Vis es muy similar al anterior (**Figura 39**), sin embargo, después del proceso de desnaturalización se observa la desaparición del RPS-L de AgNP debido a su total coalescencia y precipitación, explicando porque la solución se vuelve casi incolora.

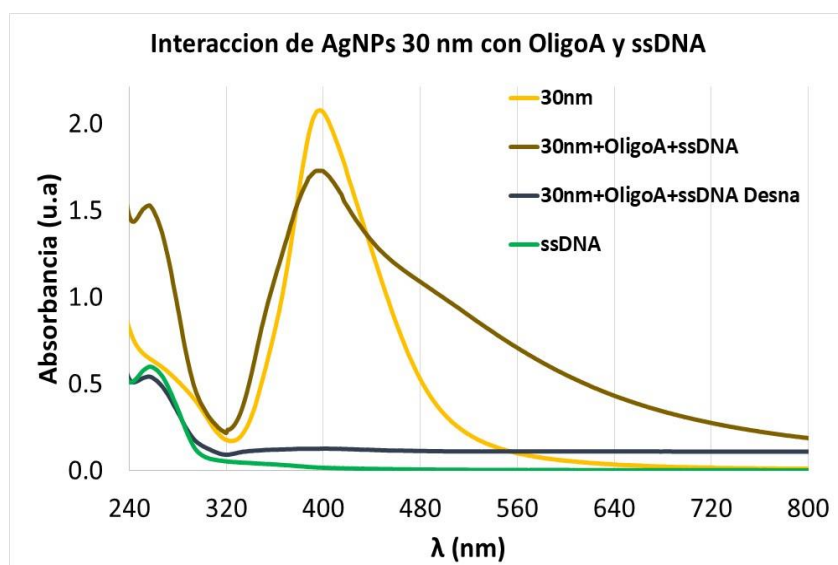


Figura 39. En amarillo el espectro UV-Vis de las AgNP, en café el espectro UV-Vis de la mezcla de AgNP-Oligo(A)-ssDNA, en gris el espectro de la mezcla de AgNP-Oligo(A)-ssDNA después de ser desnaturalizado. Para efectos de comparación en verde se muestra el espectro UV-Vis del del ssDNA.

La **Tabla 12** resume el cambio en las propiedades de las AgNP en cada paso del experimento. Debe destacarse el incremento cerca de diez veces el tamaño original y del potencial zeta (en valores absolutos) indicando cambios importantes en la estabilidad de las AgNP.

Tabla 12. Características obtenidas de las AgNP con la interacción con el ssDNA. Los tamaños y potenciales de las AgNP con su respectiva la desviación estándar (*).

Ag 30 nm	AgNP	AgNP+OligoA+ssDNA	AgNP+OligoA+ssDNA denaturalizado
Longitud de onda	$397 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$402 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$406 \pm 0.5^* \text{ nm}$
Diámetro hidrodinámico	$31.3 \pm 9.4^* \text{ nm}$	$260.8 \pm 26.0^* \text{ nm}$	$308.2 \pm 30.8^* \text{ nm}$
Potencial	$-20.1 \pm 3.1^* \text{ mV}$	$-29.9 \pm 4.6^* \text{ mV}$	$-30.4 \pm 4.7^* \text{ mV}$
Longitud de onda ssDNA	$259 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$256 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$255 \pm 0.5^* \text{ nm}$

Finalmente, los cambios debido a la agregación y coalescencia de las AgNP son corroborados por TEM. En la **Figura 40** puede verse claramente como el tamaño de las NP aumentó y se formaron cúmulos, sin ningún orden aparente. De esta forma se observa claramente como el oligo A prefiere interaccionar con ssDNA, provocando la desestabilización y agregación de las NP.

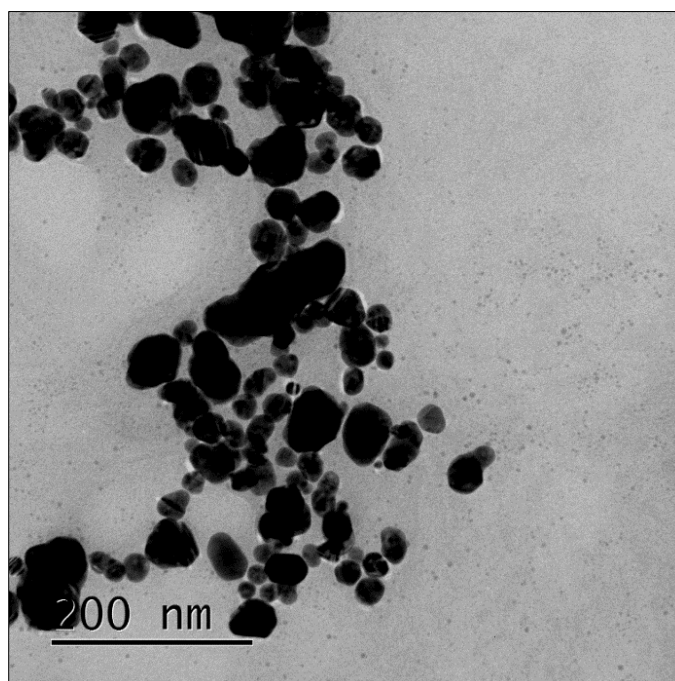
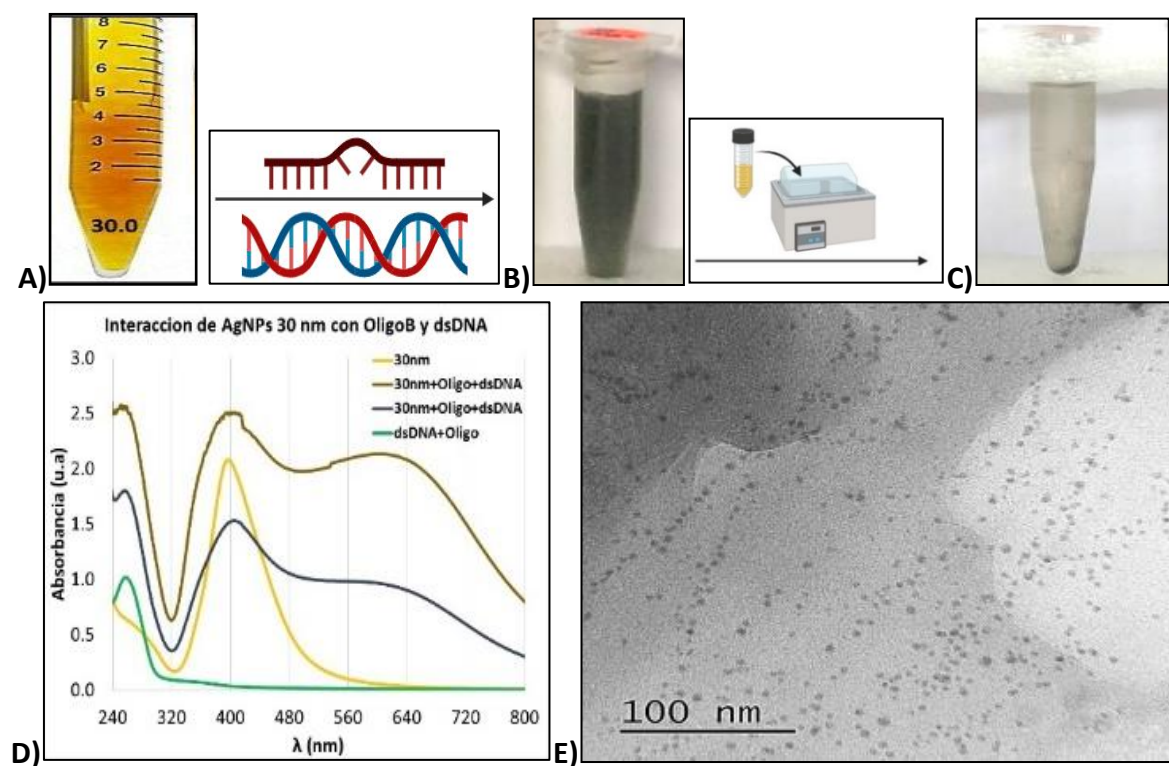


Figura 40. Imagen TEM de las AgNP con la interacción del oligo A y el ssDNA.

A continuación, se presentan los resultados de las interacciones entre el **oligo B y el oligo CP** y los diferentes tipos de DNA. Como puede observarse en la **Figura 41 C** la interacción es muy similar a la del oligo A, ya que ambos presentan mutaciones en el oligo conduciendo al mismo tipo de ordenamiento, sin embargo se observa que la distancia entre las NP es mínima provocando un segundo plasmón, de manera muy similar al plasmón transversal de los nanovarillas (**Figura 41 D**). Mientras, que el oligo **CP** (100% complementario) se hibrida perfectamente a la doble hélice (**Figura 41 E**) provocando la agregación de las NP sobre esta última, como lo sugiere la imagen de TEM.

5.3. Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AgNP30nm-Oligo B y CP -dsDNA. AgNP30nm-Oligo B -dsDNA

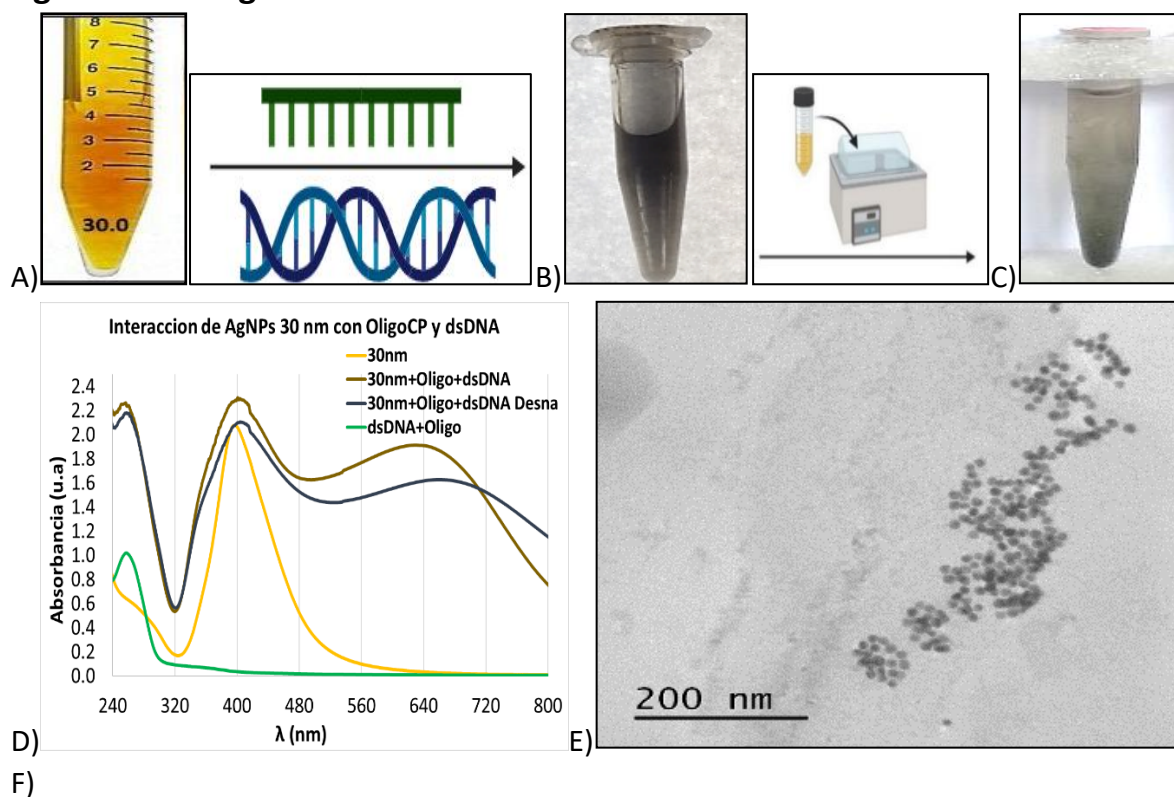


F)

Ag 30 nm	AgNP	AgNP+OligoB+dsDNA	AgNP+OligoB+dsDNA denaturalizado
Longitud de onda	397 ± 0.5 nm	406 ± 0.5 nm 600 ± 0.5 nm	408 ± 0.5 nm 613 ± 0.5 nm
Diámetro hidrodinámico	31.3 ± 9.4 nm	1065 ± 319.5 nm	716.8 ± 215.1 nm
Potencial	-20.1 ± 3.1 mV	-27.4 ± 4.2 mV	-28.4 ± 2.8 mV
Longitud de onda dsDNA	259 ± 0.5 nm	263 ± 0.5 nm	257 ± 0.5 nm

Figura 41. Conjunto de imágenes de las reacciones de desnaturalización-hibridación de las AgNP30nm-OligoB-dsDNA

AgNP30nm-OligoCP -dsDNA



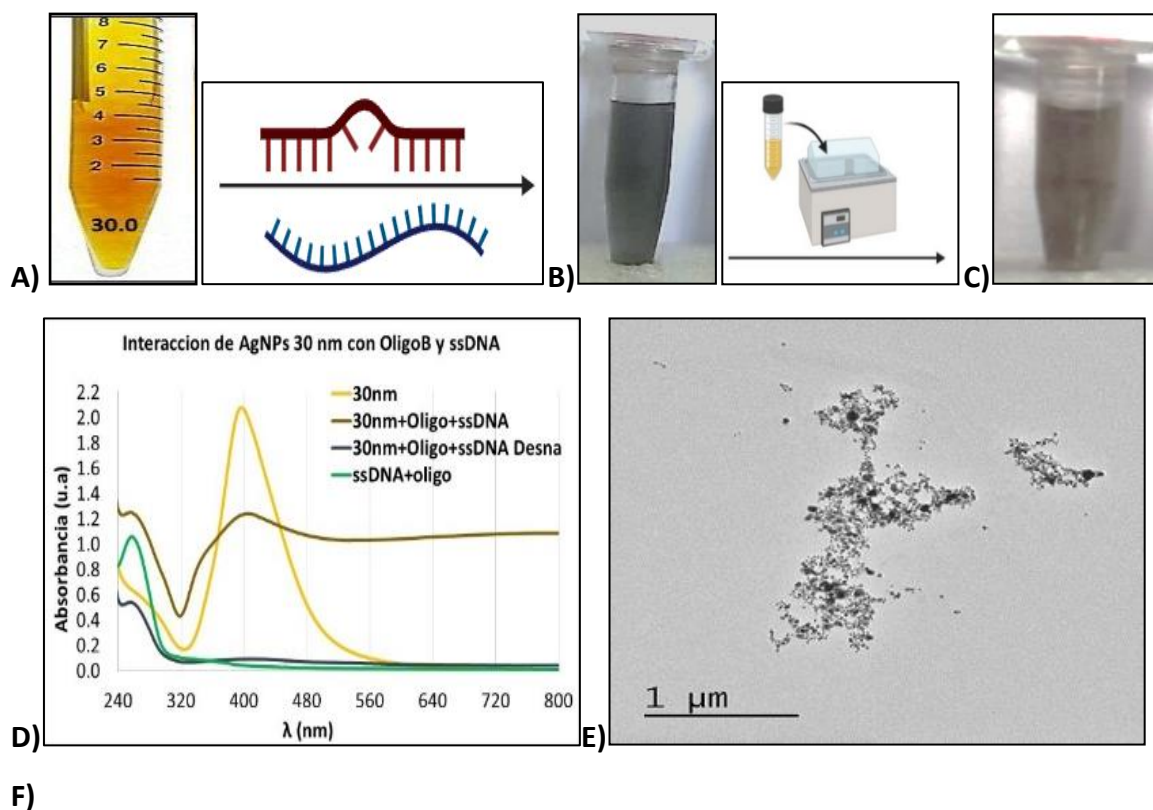
Ag 30 nm	AgNP	AgNP+OligoC+dsDNA	AgNP+OligoC+dsDNA denaturalizado
Longitud de onda	397 ± 0.5* nm	401 ± 0.5* nm 629 ± 0.5* nm	404 ± 0.5* nm 659 ± 0.5* nm
Diámetro hidrodinámico	31.3 ± 9.4* nm	1383 ± 414.9* nm	662.3 ± 198.7*
Potencial	-20.1 ± 3.1* mV	-24.9 ± 4.2* mV	-32.5 ± 3.4*
Longitud de onda dsDNA	259 ± 0.5* nm	257 ± 0.5* nm	258 ± 0.5* nm

Figura 42. Conjunto de imágenes de las reacciones de desnaturalización-hibridación de las AgNP30nm-OligoCP-dsDNA

5.4. Reacciones de desnaturalización-hibridación de las AgNP30nm-Oligo-ssDNA

De los experimentos de la interacción de los diferentes oligos con ssDNA es claro que hay un cambio de color similar, sin embargo, por espectroscopía y TEM se observa que la aglomeración de las NP no forma estructuras alineadas, sino en forma de conjuntos amorfos **(Figura 43 E)**, para el caso de oligos con mutaciones. Interesantemente, cuando el oligo es complementario al 100 % se forman conjuntos cuasi esféricos **(Figura 44 E)**. En ambos casos se muestran las tablas con el resumen de los cambios observados en estos experimentos, que explican los mecanismos arriba descritos.

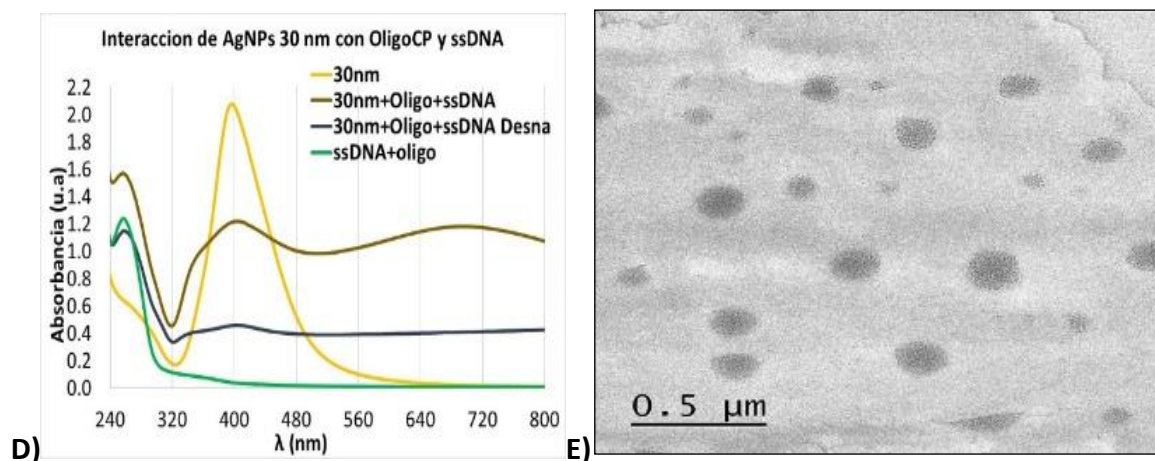
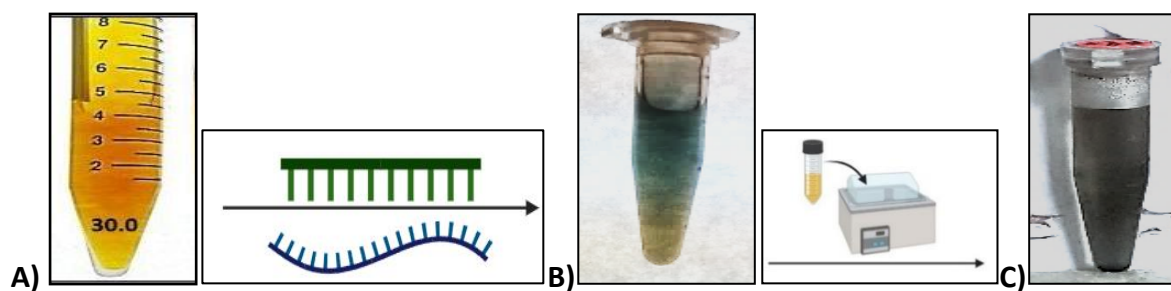
AgNP30nm-OligoB-ssDNA



Ag 30 nm	AgNP	AgNP+OligoB+ssDNA	AgNP+OligoB+ssDNA denaturalizado
Longitud de onda	$397 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$405 \pm 0.5^* \text{ nm}$ $758 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$408 \pm 0.5^* \text{ nm}$
Diámetro hidrodinámico	$31.3 \pm 9.4^* \text{ nm}$	$304.7 \pm 46.92^* \text{ nm}$	$557.5 \pm 18.4^* \text{ nm}$
Potencial	$-20.1 \pm 3.1^* \text{ mV}$	$-25.3 \pm 4.1^* \text{ mV}$	$-31.9 \pm 4.7^* \text{ mV}$
Longitud de onda ssDNA	$259 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$256 \pm 0.5^* \text{ nm}$	$255 \pm 0.5^* \text{ nm}$

Figura 43. Conjunto de imágenes de las reacciones de desnaturalización-hibridación de las AgNP30nm-OligoB-ssDNA

AgNP30nm-OligoCP-ssDNA



F)

Ag 30 nm	AgNP	AgNP+OligoC+dsDNA	AgNP+OligoC+dsDNA denaturalizado
Longitud de onda	397 ± 0.5* nm	401 ± 0.5* nm 629 ± 0.5* nm	404 ± 0.5* nm 659 ± 0.5* nm
Diámetro hidrodinámico	31.3 ± 9.4* nm	1383 ± 414.9* nm	662.3 ± 198.7* nm
Potencial	-20.1 ± 3.1* mV	-26.9 ± 4.2* mV	-30.5 ± 3.4* mV
Longitud de onda dsDNA	259 ± 0.5* nm	257 ± 0.5* nm	258 ± 0.5* nm

Figura 44. Conjunto de imágenes de las reacciones de desnaturalización-hibridación de las AgNP30nm-OligoCP-ssDNA.

Capítulo 6

6. Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones

A manera de conclusión podemos afirmar que:

La estabilidad de las NP es un factor primordial para su implementación y posible aplicación. Las AuNP y AgNP fueron estables hasta 2 y 6 semanas, respectivamente y se logró incrementar su estabilidad almacenándolas a temperatura ligeramente mayor al ambiente (32 °C).

Se diseñaron oligos complementarios y con mutaciones a la secuencia del Gen VIII del plásmido M13mp18, así como un control negativo (sin ninguna afinidad al gen) para probar la aglomeración de las NP. Se sabe que NP aisladas presentan un color, mientras que NP agregadas presentan un cambio de color. Aquí las NP eran estabilizadas por el oligo y en presencia de secuencias complementarias se hibridaban al DNA provocando su aglomeración.

Si bien todos los tamaños de NP mostraron cambios de color después de la desnaturalización, se eligieron NP de Au de 17 nm y de Ag de 30 nm, ya que presentaron mayores cambios a simple vista.

Demuéstranos que la Ag es un elemento que puede sustituir al Au debido a las ventajas ya mencionadas y más importante aún a los cambios pronunciados en el color de la solución, mostrando que pueden ser herramientas útiles en el desarrollo de plataformas basadas en AgNP ya que mostraron ser más estables y de menor costo.

Las pruebas colorimétricas de las AuNP y AgNP muestran cambios significativos a simple vista. En este trabajo demostramos que hay cambios cualitativos de los materiales, cuando las NP se aglomeran, evidenciando que se pueden implementar en el diseño de biosensores colorimétricos para detectar secuencias específicas de manera sencilla y e incluso en condiciones urgentes (pandemia). Estas observaciones se confirmaron por técnicas

cuantitativas como el desplazamiento del RPS-L, incremento en el tamaño de partícula por DLS, entre otros.

Con base en lo observado con los sistemas a base de NP de plata, demostraron cambios cualitativos de los materiales, observando los cambios de coloración de los sistemas coloidales, por la funcionalización de las NP con los oligos complementarios a las secuencias de DNA trabajadas, se podría investigar un futuro trabajo con características cuantitativas, por ejemplo, los límites de detección, ya que en este trabajo nos enfocamos en la posibilidad de diseñar un precursor de un biosensor capaz de detectar estos genes.

6.2. Perspectivas

Hemos logrado proponer una plataforma específica para reconocer secuencias de genes, en nuestro caso para detectar en gen 8 del plásmido M13mp18, sin embargo, esta idea se puede aplicar a cualquier otro gen de interés, incluso para detectar agentes patógenos.

Mejorar la estabilidad de las AgNP para que puedan usarse en regiones donde no hay suficiente infraestructura, con ayuda de sales o agentes estabilizantes que nos brinden una estabilidad mayor a la obtenida en este trabajo.

Capítulo 7

7. Referencias

1. Jazayeri, M. H., Aghaie, T., Avan, A., Vatankhah, A., & Ghaffari, M. R. S. (2018). ***Colorimetric detection based on gold nano particles (GNP): An easy, fast, inexpensive, low-cost and short time method in detection of analytes (protein, DNA, and ion)***. Sensing and bio-sensing research, 20, 1-8.
2. Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). ***Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications***. Journal of drug delivery science and technology, 53, 101174.
3. JE Hulla, ***Nanotechnology: History and future***, 2015. DOI: 10.1177/0960327115603588
4. He, Q., Wu, Q., Feng, X., Liao, Z., Peng, W., Liu, Y., ... & Mo, M. (2020). ***Interfacing DNA with nanoparticles: surface science and its applications in biosensing***. International journal of biological macromolecules, 151, 757-780.
5. Reddy, V. R. (2006). ***Gold nanoparticles synthesis and applications***. Synlett, 2006(11), 1791-1792.
6. Yaqoob, S. B., DNAAn, R., Rameez Khan, R. M., & Rashid, M. (2020). ***Gold, silver, and palladium nanoparticles a chemical tool for biomedical applications***. Frontiers in chemistry, 8, 376.
7. Verma HN, Singh P and Chavan RM (2014) ***Gold nanoparticle: synthesis and characterization***, Veterinary World 7(2): 72-77. doi: 10.14202/vetworld.2014.72-77
8. Yu, L., & Li, N. (2019). ***Noble metal nanoparticles-based colorimetric biosensor for visual quantification: A mini review***. Chemosensors, 7(4), 53.

9. Dahm, R. (2005). ***Friedrich Miescher and the discovery of DNA***. Developmental biology, 278(2), 274-288.
10. Verma, M. S., Rogowski, J. L., Jones, L., & Gu, F. X. (2015). ***Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles***. Biotechnology advances, 33(6), 666-680.
11. Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). ***Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR)***. The Journal of investigative dermatology, 133(3), e6.
12. Wich, P. R. (2015). ***Research Topics Explore the scientific questions that fascinate us***. Consultada en junio, 7, 2015 de WichLab Sitio web: <http://wichlab.com/research/>
13. Wu R, Peng H, Zhu J-J, Jiang L-P and Liu J (2020) ***Attaching DNA to Gold Nanoparticles With a Protein Corona***. Front. Chem. 8:121. doi: 10.3389/fchem.2020.00121
14. Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (1999). ***Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification***. Pure and applied chemistry, 71(12), 2333-2348. <https://iupac.org/project/550-31-87>
15. Naresh, V., & Lee, N. (2021). ***A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors***. Sensors, 21(4), 1109.
16. Xiao-Ming, M. A., Mi, S., Yue, L., Yin-Jin, L., Fang, L. U. O., Long-Hua, G., ... & Guo-Nan, C. (2018). ***Progress of visual biosensor based on gold nanoparticles***. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 46(1), 1-10.
17. Mehrotra, P. (2016). ***Biosensors and their applications—A review***. Journal of oral biology and craniofacial research, 6(2), 153-159.
18. Nangare, S. N., & Patil, P. O. (2020). ***Affinity-based nanoarchitected biotransducer for sensitivity enhancement of surface plasmon resonance sensors for in vitro diagnosis a review***. ACS Biomaterials Science & Engineering, 7(1), 2-30.

19. Englebienne, P. (1998). ***Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes.*** *Analyst*, 123(7), 1599-1603.
20. <https://www.biorender.com/>
21. Khansili, N., Rattu, G., & Krishna, P. M. (2018). ***Label-free optical biosensors for food and biological sensor applications.*** *Sensors and Actuators B Chemical*, 265, 35-49.
22. Song, Y., Wei, W., & Qu, X. (2011). ***Colorimetric biosensing using smart materials.*** *Advanced Materials*, 23(37), 4215-4236.
23. Stewart, M. E., Anderton, C. R., Thompson, L. B., Maria, J., Gray, S. K., Rogers, J. A., & Nuzzo, R. G. (2008). ***Nanostructured plasmonic sensors.*** *Chemical reviews*, 108(2), 494-521.
24. Kirsch, J., Siltanen, C., Zhou, Q., Revzin, A., & Simonian, A. (2013). ***Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine.*** *Chemical Society Reviews*, 42(22), 8733-8768.
25. Clark Jr, L. C., & Lyons, C. (1962). ***Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery.*** *Annals of the New York Academy of sciences*, 102(1), 29-45.
26. Lomillo, M. A. A., Ruiz, J. G., & Pascual, F. J. M. (2005). ***Biosensor based on platinum chips for glucose determination.*** *Analytica chimica acta*, 547(2), 209-214.
27. Chard, T. (1992). ***Pregnancy tests: a review.*** *Human reproduction*, 7(5), 701-710.
28. Haarbarger, D., & Pillay, T. S. (2011). ***Historical perspectives in diagnostic clinical pathology: development of the pregnancy test.*** *Journal of clinical pathology*, 64(6), 546-548.
29. Mody, V. V., Siwale, R., Singh, A., & Mody, H. R. (2010). ***Introduction to metallic nanoparticles.*** *Journal of Pharmacy and bioallied sciences*, 2(4), 282-289.

30. Lira Oliver, A., & Oliver, A. (2017). **La nanotecnología, la arquitectura y el arte.** Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nano ciencias y nanotecnología, 10(19), 117-128.
31. Loiseau, A., Asila, V., Boitel-Aullen, G., Lam, M., Salmain, M., & Boujday, S. (2019). ***Silver-based plasmonic nanoparticles for and their use in biosensing.*** Biosensors, 9(2), 78.
32. Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012). **Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda.** Avances en Ciencias e Ingeniería, 3(2), 67-78.
33. Kim, H. S., & Lee, D. Y. (2018). ***Near-infrared-responsive cancer photothermal and photodynamic therapy using gold nanoparticles.*** Polymers, 10(9), 961.
34. Dadosh, T. (2009). ***Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size.*** Materials letters, 63(26), 2236-2238.
35. Gentry, S. T., Kendra, S. F., & Bezpalko, M. W. (2011). ***Ostwald ripening in metallic nanoparticles: stochastic kinetics.*** The Journal of Physical Chemistry C, 115(26), 12736-12741.
36. Sahu, P., & Prasad, B. L. (2014). ***Time and temperature effects on the digestive ripening of gold nanoparticles: is there a crossover from digestive ripening to Ostwald ripening?*** Langmuir, 30(34), 10143-10150.
37. Kabalnov, A. (2001). ***Ostwald ripening and related phenomena. Journal of Dispersion Science and Technology,*** 22(1), 1-12.
38. Yunji Lee, Seong-Geun Oh, ***Ostwald ripening and control of Ag ion reduction degree by ammonium hydroxide in alcohol reduction process,*** Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Volume 21, 2015, Pages 768-771, ISSN 1226-086X, <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.04.010>.

39. Samanta, A., & Medintz, I. L. (2016). ***Nanoparticles and DNA—a powerful and growing functional combination in bionanotechnology***. *Nanoscale*, 8(17), 9037-9095.
40. Shehzad, K., Xu, Y., Gao, C., & Duan, X. (2016). ***Three-dimensional macro-structures of two-dimensional nanomaterials***. *Chemical Society Reviews*, 45(20), 5541-5588.
41. Shukla, G. C., Haque, F., Tor, Y., Wilhelmsson, L. M., Toulme, J. J., Isambert, H., ... & Shapiro, B. A. (2011). ***A boost for the emerging field of RNA nanotechnology: report on the first international conference on RNA nanotechnology***. *ACS nano*, 5(5), 3405-3418.
42. Vilela, D., González, M. C., & Escarpa, A. (2012). ***Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: chemical creativity behind the assay***. A review. *Analytica chimica acta*, 751, 24-43.
43. Sperling, R. A., & Parak, W. J. (2010). ***Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles***. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1915), 1333-1383.
44. Kim, J. H., & Chung, B. H. (2011). ***Naked eye detection of mutagenic DNA photodimers using gold nanoparticles***. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 2805-2809.
45. Tan, Y. N., Lee, J. Y., & Wang, D. I. (2010). ***Uncovering the design rules for peptide synthesis of metal nanoparticles***. *Journal of the American Chemical Society*, 132(16), 5677-5686.
46. Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2012). ***Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis***. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 24-36.

47. Xu, Q., Zhao, Y., Xu, J. Z., & Zhu, J. J. (2006). ***Preparation of functionalized copper nanoparticles and fabrication of a glucose sensor.*** Sensors and Actuators B: Chemical, 114(1), 379-386.
48. Sokolov, I. L., Cherkasov, V. R., Tregubov, A. A., Buiuclic, S. R., & Nikitin, M. P. (2017). ***Smart materials on the way to theranostic nanorobots: molecular machines and nanomotors, advanced biosensors, and intelligent vehicles for drug delivery.*** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1861(6), 1530-1544.
49. Harish, V., Tewari, D., Gaur, M., Yadav, A. B., Swaroop, S., Bechelany, M., & Barhoum, A. (2022). **Review on nanoparticles and nanostructured materials: Bioimaging, biosensing, drug delivery, tissue engineering, antimicrobial, and agro-food applications.** Nanomaterials, 12(3), 457.
50. Carrillo-Inungaray, M. L., Trejo-Ramirez, J. A., Reyes-Munguia, A., & Carranza-Alvarez, C. (2018). ***Use of nanoparticles in the food industry: advances and perspectives.*** Impact of nanoscience in the food industry, 419-444.
51. <https://openstax.org/books/biology/pages/3-5-nucleic-acids>
52. Mihalache, V., & Salomaa, A. (2001). ***Language-theoretic aspects of DNA complementarity.*** Theoretical Computer Science, 250(1-2), 163-178.]
53. Rich, A. (1959). ***Molecular structure of the nucleic acids.*** Reviews of Modern Physics, 31(1), 191.
54. Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). ***Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid.*** Nature, 171(4356), 737-738.
55. Klug, A. (2004). ***The discovery of the DNA double helix.*** Journal of molecular biology, 335(1), 3-26.
56. Beaucage, S. L. (2001). ***Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications.*** Current Medicinal Chemistry, 8(10), 1213-1244.

57. Pall, G. S., & Hamilton, A. J. (2008). ***Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA***. Nature protocols, 3(6), 1077-1084.
58. Marcadet, A., O'Connell, P., & Cohen, D. (1989). ***Standardized Southern blot workshop technique***. In Immunobiology of HLA (pp. 553-560). SPR-L -Linger, New York, NY.
59. Liu, H., Bebu, I., & Li, X. (2010). ***Microarray probes and probe sets***. Frontiers in bioscience (Elite edition), 2, 325.
60. Ying, S. Y. (2004). ***Complementary DNA libraries***. Molecular biotechnology, 27(3), 245-252.
61. Alberts, B., & Bray, D. (2006). ***Introducción a la biología celular***. Ed. Médica Panamericana. Pag 209.
62. <https://www.neb.com/en/products/n4040-m13mp18-single-stranded-dna>
63. Nikhil R. Jana. ***Seeding Growth for Size Control of 5-40 nm Diameter Gold Nanoparticles***, Department of Chemistry and Biochemistry, University of South Carolina, 631 Sumter Street, Columbia, South Carolina 29208, August 7, 2001
64. Yaqiong Qin, ***Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction***, 19 September 2010. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.10.013
65. <https://eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/oligo-analysis/>.
66. Chirayil, C. J., Abraham, J., Mishra, R. K., George, S. C., & Thomas, S. (2017). ***Instrumental techniques for the characterization of nanoparticles. In Thermal and rheological measurement techniques for nanomaterials characterization*** (pp. 1-36). Elsevier.
67. Tomaszewska, E., Soliwoda, K., Kadziola, K., Tkacz-Szczesna, B., Celichowski, G., Cichomski, M., ... & Grobelny, J. (2013). ***Detection limits of DIs and Uv-Vis***

- spectroscopy in characterization of polydisperse nanoparticles colloids.*** Journal of Nanomaterials, 2013(1), 313081.
68. Zheng, Y., Hong, Y., Wu, W., Sun, D., Wang, Y., Huang, J., & Li, Q. (2015). ***Separation of different shape biosynthesized gold nanoparticles via agarose gel electrophoresis.*** Separation and Purification Technology, 151, 332-337.
 69. Bastús, N. G., Comenge, J., & Puentes, V. (2011). ***Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening.*** Langmuir, 27(17), 11098-11105.
 70. Piwoński, I., Spilarewicz-Stanek, K., Kisielewska, A., Kądzioła, K., Cichomski, M., & Ginter, J. (2016). ***Examination of Ostwald ripening in the photocatalytic growth of silver nanoparticles on titanium dioxide coatings.*** Applied surface science, 373, 38-44.
 71. Karakuş, E., Erdemir, E., Demirbilek, N., & Liv, L. (2021). ***Colorimetric and electrochemical detection of SARS-CoV-2 spike antigen with a gold nanoparticle-based biosensor.*** Analytica chimica acta, 1182, 338939.
 72. Seow, N., Tan, Y. N., Yung, L. Y. L., & Su, X. (2015). ***DNA-directed assembly of nanogold dimers: a unique dynamic light scattering sensing probe for transcription factor detection.*** Scientific reports, 5(1), 18293.
 73. Xia, F., Zuo, X., Yang, R., Xiao, Y., Kang, D., Vallée-Bélisle, A., ... & Plaxco, K. W. (2010). ***Colorimetric detection of DNA, small molecules, proteins, and ions using unmodified gold nanoparticles and conjugated polyelectrolytes.*** Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(24), 10837-10841.
 74. Tan, Y. N., Lee, K. H., & Su, X. (2011). ***Study of single-stranded DNA binding protein–nucleic acids interactions using unmodified gold nanoparticles and its application for detection of single nucleotide polymorphisms.*** Analytical chemistry, 83(11), 4251-4257.

75. Yang, J., Lee, J.Y., Deivaraj, T.C., & Too, H. (2004). ***Single Stranded DNA Induced Assembly of Gold Nanoparticles.***
76. Rageh, M. M., Gaber, M. H., & Mostafa, S. M. (2023). **Effect of ionic strength on the interaction of AuNPs with calf spleen DNA.** Gold Bulletin, 56(1), 23-30.
77. Gao, L., Guo, L., Zhang, S., Zhao, Y., Xie, J., Liu, L., & Xu, H. (2022). ***Preparation of melanin-silver nanocomposites material and its physiological activity in vitro.***



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00122

Matrícula: 2211800530

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN
ENTRE DNA Y NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS DE ORO Y PLATA:
HACIA EL DISEÑO DE
BIOSENSORES.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas
del día 13 del mes de marzo del año 2025 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DR. NIKOLA BATINA SKELEDZIJA
DR. ALFONSO RAMON GARCIA MARQUEZ
DRA. LILIANA IRAIS VERA ROBLES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de
Secretaría la última, se reunieron para proceder al Examen
de Grado cuya denominación aparece al margen, para la
obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (QUÍMICA)

DE: ESTEBAN ALVAREZ HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del
Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad
Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado
resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al
interesado el resultado de la evaluación y, en caso
aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ESTEBAN ALVAREZ HERNANDEZ
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

Roman Linares Romero
DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE

Nikola Batina Skeledzija
DR. NIKOLA BATINA SKELEDZIJA

VOCAL

Alfonso Ramon Garcia Marquez
DR. ALFONSO RAMON GARCIA MARQUEZ

SECRETARIA

Liliana Irais Vera Robles
DRA. LILIANA IRAIS VERA ROBLES