



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Estudio de las
interacciones entre
nanopartículas de
metales nobles y ADN**

María Concepción Fraile Romero



Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia.

- **TRABAJO FIN DE GRADO.**
- **GRADO EN FARMACIA.**
- **TÍTULO: Estudio de las interacciones entre nanopartículas de metales nobles y ADN.**
- **AUTOR: María Concepción Fraile Romero.**
- **LUGAR Y FECHA DE PRESENTACIÓN: Sevilla, septiembre 2016.**
- **DEPARTAMENTO: Química Física.**
- **TUTOR: Rafael Prado Gotor.**
- **CO-TUTOR: José María Carnerero Panduro.**
- **TIPOLOGÍA DEL PROYECTO: Revisión bibliográfica.**

Índice

1. Resumen.....	4
2. Introducción	5
2.1 ¿Qué es la nanotecnología?	5
2.1.1 Antecedentes históricos.....	5
2.1.2 Propiedades.....	7
2.1.2.1 Resonancia del plasmón superficial (SPR).....	8
2.1.3 Estrategias para la síntesis.	10
2.1.4 Actualidad y aplicaciones de las nanopartículas	12
2.2 El Ácido Desoxirribonucleico	15
3. Objetivos	19
4. Metodología	20
5. Resultados y discusión	21
5.1 Mecanismos de unión de ADN con AU-NP.....	21
5.1.1 Interacciones electrostáticas.....	23
5.1.2 Fuerzas hidrofóbicas	24
5.1.3 Unión específica entre bases de ADN y el oro	25
5.2 Unión ADN-NP en biotecnología médica	26
5.2.1 La genoterapia.....	26
5.2.2 Detección óptica basada en biosensores	27
5.2.2.1 Aplicaciones basadas en diferentes uniones de ss-ADN y ds-ADN en nanopartículas de oro.	27
5.2.2.2 Las aplicaciones basadas en la adsorción dependiente de la secuencia de ADN sobre el oro.	29
6. Conclusión	32
7. Bibliografía	33

1. Resumen

Las nanopartículas de oro (AuNPs) de unos pocos nanómetros se encuentran en el mismo rango de tamaño que las proteínas, enzimas y ADN y, por tanto, son adecuados para interactuar con subunidades celulares o proteínas, permitiendo la preparación de nuevos híbridos biomolécula-nanopartícula. La unión de AuNPs a biomoléculas está atrayendo cada vez más atención debido a las posibles aplicaciones de estos nuevos materiales en los nuevos retos presentes en disciplinas como la Biología.

Una combinación de gran relevancia en la actualidad es la unión de AuNPs y ADN. La alta estabilidad físico-química de la molécula de ADN, los múltiples sitios de unión y un esqueleto cargado ofrecen gran cantidad de oportunidades para una modificación selectiva del ADN con AuNPs. La absorción de ADN en oro debido a las interacciones de afinidad es altamente deseable para el desarrollo *low-cost* de biosensores conveniente y sensible. Hasta la fecha el fenómeno de adsorción ADN-oro ha sido considerado como una de las mayores promesas en mecanismos físicos para lograr un control preciso sobre la agregación de AuNPs sin modificar y formación de monocapa de ADN en la superficie de oro. El fenómeno de absorción es controlado por muchos factores incluyendo las fuerzas intermoleculares, junto con la composición de ADN y la secuencia. El entendimiento y manipulación de estos factores permite ampliar notablemente las aplicaciones en biosensores, la secuencia dependiente de la absorción ADN-oro que puede ser ampliamente relevante para la detección de la metilación de ADN en cáncer. Aquí se revisan los principios subyacentes de ADN y oro, así como las recientes estrategias basadas en diferenciar la absorción en la cadena simple y doble de ADN con las nanopartículas de oro y la adsorción de ADN-ORO dependiente de la secuencia. Los dos grupos pioneros en diseñar estrategias para la funcionalización de nanopartículas de oro con ADN son el de Mirkin-Letsinger (Mirkin y cols., 1996) y Alivisatos-Schultz.

❖ Palabras claves: Nanopartícula de oro, ADN, biosensores.

2. Introducción

2.1 ¿Qué es la nanotecnología?

La nanotecnología es una ciencia que tiene su fundamento en el estudio de los fenómenos situados en la nanoescala y que utiliza nanomateriales en sus diseños y aplicaciones. Esta ciencia pertenece a una de las áreas del desarrollo científico y tecnológico actual, constituyendo un nuevo dominio que ha surgido para el diseño, fabricación y aplicación de nanoestructuras (Cao, 2004). Logrando el entendimiento fundamental de la relación entre las propiedades y fenómenos físicos y químicos y las dimensiones de los materiales (Cao, 2004).

El prefijo “nano” procede del término griego *νάνος*, que significa “enano”, es decir pequeño. En química se usa generalmente para describir un material o sustancia cuyas dimensiones se encuentran en el rango del nanómetro, entre 1 y 100 nm. Todas las nanopartículas se encuentran por tanto bajo esas dimensiones, independientemente de su naturaleza (Dreaden y cols., 2012). La importancia del tamaño de las AuNPs recae en la similitud con otros entes celulares como son los receptores superficiales o los virus.

2.1.1 Antecedentes históricos

Aunque el interés científico por las nanopartículas es relativamente reciente, ya las antiguas civilizaciones hicieron uso de ellas, por sus propiedades ópticas y medicinales. Así, respecto a los primeros usos en la historia de las nanopartículas de metal, es digno de mención el uso del oro coloidal por los romanos y egipcios en torno a los siglos IV y V a.C. La copa Lycurgus (Freestone y cols., 2007) (véase Figura 1.A), fabricada por los romanos en el siglo IV, es una muestra evidente del uso del oro coloidal con fines decorativos. Este vaso decorado, exhibido en el Museo Británico de Londres, está compuesto de vidrio con una pequeña cantidad de nanopartículas metálicas de oro y plata, que son los responsables de un notable fenómeno óptico: si la luz es reflejada presenta un color verde y cambia a color rojo si la luz es transmitida desde su interior. (Figura 1.A). De igual modo, los egipcios, utilizaban las nanopartículas de oro como coloides medicinales con la finalidad de mantener la juventud e incluso con fines curativos (artritis) (Liz-Marzan, 2004).

La civilización china ha utilizado nanopartículas, además de con fines curativos, para la decoración de sus porcelanas, empleando colorantes inorgánicos (Cao, 2004). Igualmente los Mayas también manejaban los materiales nanoestructurados, por ejemplo el famoso azul

maya encontrado en sus murales contiene nanopartículas que lo hace muy resistente, frente a las inclemencias del tiempo.

Durante la Edad Media, el oro fue empleado en el tratamiento de enfermedades como la epilepsia, la disentería, los tumores y los problemas cardíacos. Aunque también fueron consideradas las disoluciones de oro coloidal como elixires de la eterna juventud, claro ejemplo de ello es el caso de Diana de Poitiers, mujer que se caracterizó por tener un hermoso cutis debido a los elixires de oro que ingería. Sin embargo, el legado de las nanopartículas de oro en la Edad Media queda reflejado en las numerosas vidrieras de las catedrales e iglesias, donde el color rojo de las mismas es debido a estos coloides (Figura 1.B).

Pese a todo, no se realizaría el primer estudio científico hasta 1957, donde Michael Faraday realizó un análisis en profundidad sobre la síntesis y propiedades de coloides de oro (Faraday, 1857) (véase Figura 1.C).

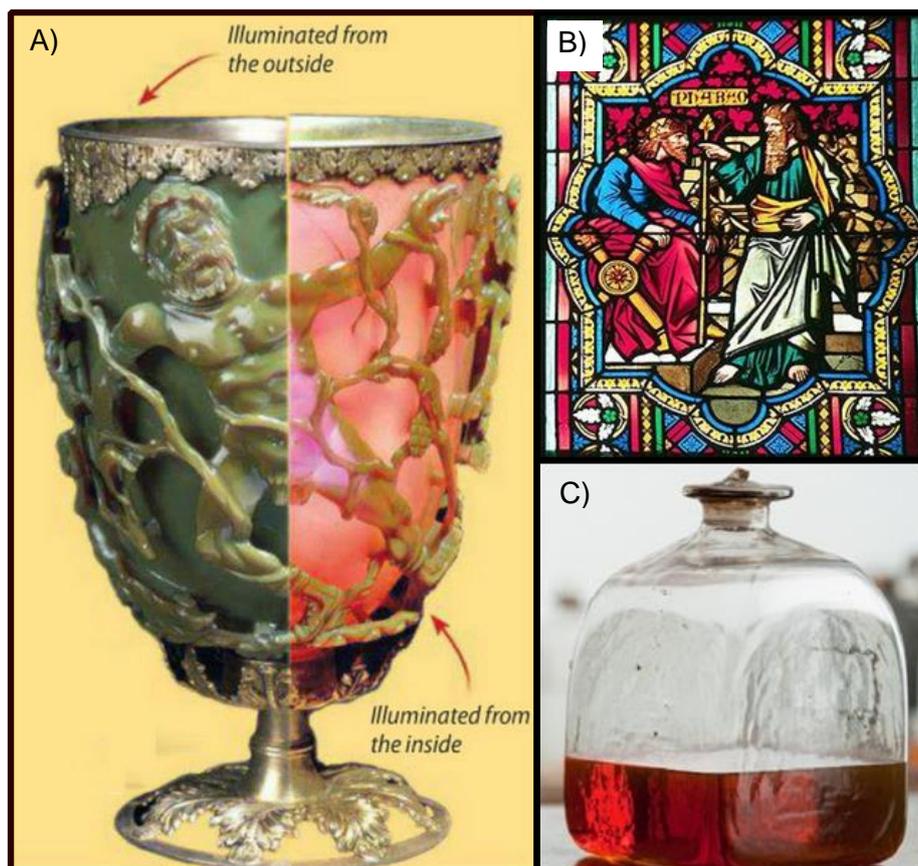


Figura 1. Distintos ejemplos de nanopartículas de oro a lo largo de la historia: A) Copa Lycurgus del siglo IV a.C (<https://wiredweirdworld.wordpress.com/tag/lycurgus-cup/>). B) Detalle de una vidriera gótica de la catedral de Colonia (<https://es.wikipedia.org/wiki/Vitral>). C) Nanopartículas de oro sintetizadas por Michael Faraday (<http://londonist.com/2015/10/london-lecture-cheat-sheet>).

2.1.2 Propiedades

El tamaño y forma de las nanopartículas ejercen una gran influencia en sus propiedades ópticas, magnéticas, electrónicas y catalíticas, dando lugar a un interés creciente en la búsqueda de nuevos procesos de síntesis que permitan controlar su geometría y morfología (Liz-Marzan, 2004).

Las nanopartículas y los materiales nanoestructurados que tienen, al menos, una dimensión de un tamaño menor de 100 nm, tienen los movimientos de los electrones obstaculizados al estar sometidos a un confinamiento cuántico en esa dirección. Como consecuencia del confinamiento electrónico manifiestan propiedades: ópticas, electrónicas, electromagnéticas, magnéticas y eléctricas, diferentes a las partículas de mayor tamaño del mismo material.

Cuando se reducen las partículas a tamaños muy pequeños, se modifica su estructura electrónica, pasando los electrones confinados a ocupar diferentes niveles de energía; se produce una cuantización de los niveles de energía, de los estados de densidad electrónica y de la carga (Cornejo, 2015a).

Son de gran importancia también los efectos de superficie, ya que las partículas pequeñas presentan una mayor área superficial por unidad de volumen, lo que conlleva a mayor energía libre superficial respecto los sólidos volumétricos (Israelachvili, 1991). Esto es debido a que los átomos en la superficie están menos "enlazados" que el resto de sus átomos, y su esfera de coordinación está incompleta, afectando a las propiedades de reactividad química y temperatura de fusión por el aumento de la energía libre superficial (Wang y cols., 1998).

La absorción óptica también es un fenómeno de la superficie que se modifica y se puede cambiar dependiendo de las características de la partícula como su composición, tamaño, etc. (Ratner y Ratner, 2002).

Una clasificación muy empleada es aquella que hace referencia a su composición, donde se diferencian cuatro grandes grupos (Fuentes, 2014):

1. Base carbón: pueden tener diferentes formas: esférica, tubular o elipsoide. Se caracterizan por tener baja densidad, gran dureza, elasticidad y conductividad eléctrica.
2. Base metálica: se llama así a las nanopartículas de oro, plata, platino, materiales reactivos como el dióxido de titanio, óxido de indio y estaño. En la actualidad las AuNPs son unas de las sondas más empleadas para la detección de analitos.

3. Dendrimeros: son polímeros a escala nanométrica de construcción arborescente con ramificaciones crecientes a medida que la partícula crece en tamaño. Sus características dependen de los sustituyentes elegidos o diseñados para ocupar esas terminaciones.

4. *Composites*: este tipo es el resultado de la combinación de nanopartículas con otras de mayor tamaño, como por ejemplo el caso de las arcillas nanoestructuradas.

2.1.2.1 Resonancia del plasmón superficial (SPR)

En las nanopartículas los electrones se encuentran formando una "nube" alrededor de los mismos, facilitando el transporte de carga. Cuando un haz de luz incide sobre los electrones libres de la banda de conducción de la superficie de las nanopartículas metálicas se induce una excitación colectiva de estos electrones libres, como consecuencia de la fuerte interacción con la luz incidente; produciéndose una vibración de la nube electrónica para disipar energía, estas oscilaciones se denominan plasmones. Según la mecánica cuántica pueden comportarse como ondas con cierto valor de energía, que son las responsables del efecto de la resonancia, ya que es debido a la absorción de éstas por la nube electrónica.

Este efecto es el que provoca el color rojo característico de las nanopartículas de oro. En la zona visible del espectro habrá parte absorbida y otra reflejada que será la responsable del color característico del material. Las AuNPs de pequeño tamaño absorben luz en la región verde-azul del espectro (400-500 nm) mientras que la luz roja (700 nm) es reflejada dando un color rojo intenso en las disoluciones de medio acuoso. Si el tamaño aumentara, la longitud de onda de la banda plasmón superficial se desplazaría a valores más altos, la luz roja sería absorbida y la azul sería reflejada dando lugar a un color azul-violeta (véase figura 2) (Cornejo, 2015b).

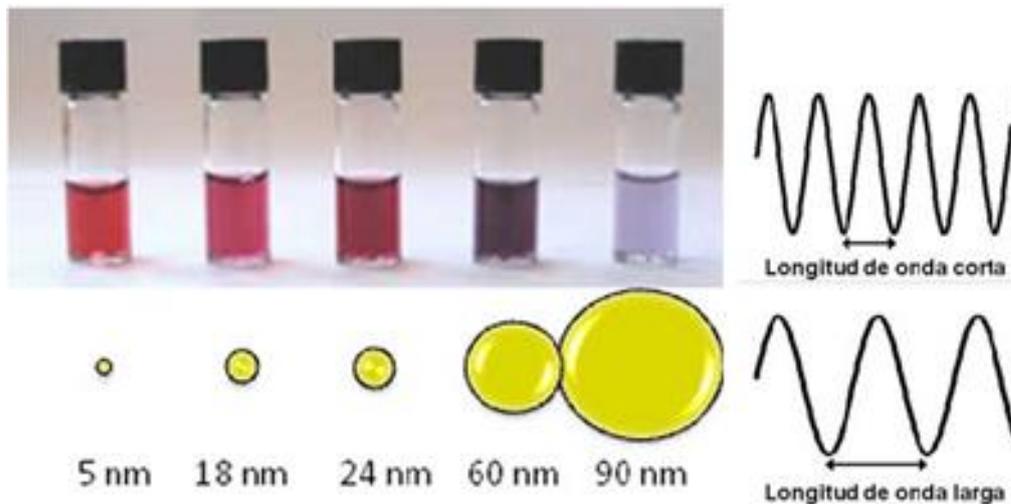


Figura 2. Disoluciones con AuNPs de distintos tamaños (Cornejo, 2015b).

Link y colaboradores (Link y El-Sayed, 1999) estudiaron la relación entre las variaciones de la forma y la posición de banda del plasmón superficial, respecto al tamaño de las AuNPs. Llegaron a la conclusión de que el ensanchamiento adicional de la banda y el desplazamiento hacia longitudes de ondas mayores a medida que aumenta el tamaño de las AuNPs está estrechamente relacionado con el tamaño de la misma, como se observa en la figura 2.

Otros factores que afectan a la banda de plasmón superficial son el medio que rodea a la nanopartícula, la distancia que haya entre las nanopartículas, la forma (véase en figura 3) y de qué material sean. En este último caso se pueden observar diferencias entre nanopartículas de oro y plata: las de plata presentan un rápido y fuerte espectro de absorción en las proximidades de longitudes de onda entre 300 y 400 nm. El valor máximo de la longitud de onda de transmisión se puede variar dentro de un amplio rango de valores $\lambda=393 \text{ nm} - 738 \text{ nm}$, variando el color de la suspensión coloidal entre un amarillo claro y un color verde respectivamente. Los colores absorbidos son mayoritariamente el azul y el rojo respectivamente. Mientras que las de oro, como ya se indicó antes, presentan un color rojo que puede llegar a azul.

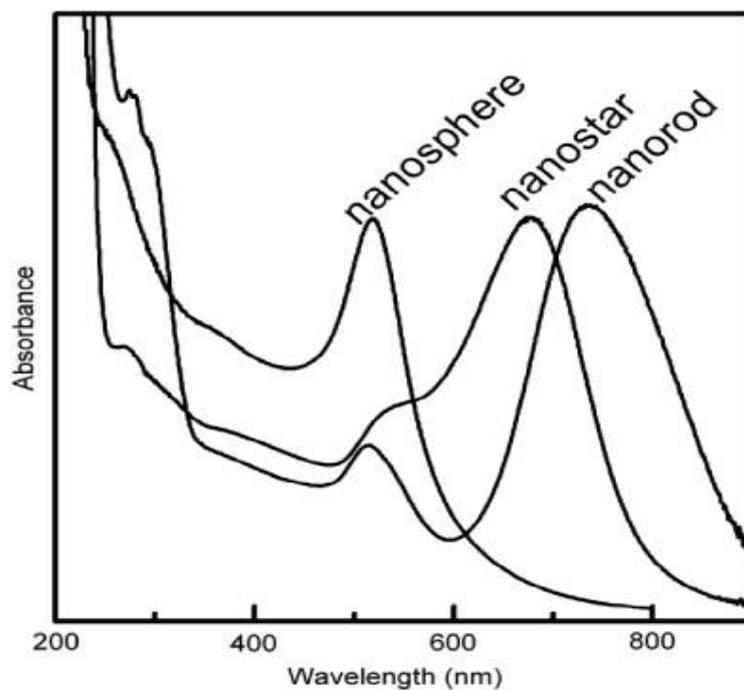


Figura 3. Variación de la longitud de onda absorbida con la forma de las nanopartículas (Cornejo, 2015b).

2.1.3 Estrategias para la síntesis.

Los métodos de síntesis de AuNPs se dividen en dos grandes bloques, denominados con la nomenclatura anglosajona como Top-Down (de arriba abajo) y Bottom-up (de abajo arriba) como se esquematiza en la figura 4.

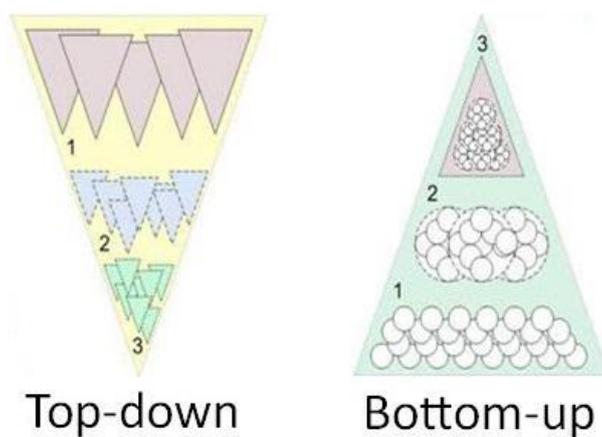


Figura 4. Representación esquemática de las dos rutas que existen en la obtención de nanopartículas.
<http://www.nepachemistry.com/2011/01/top-down-and-bottom-up-approaches-in.html>

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

2- El método químico o *bottom-up* (véase figura 5), consiste en la reducción de iones metálicos desde su estado de oxidación en disolución hasta su estado elemental, seguido de un proceso de nucleación o agregación. Tiene mayor efectividad ya que se obtienen nanopartículas más pequeñas y más homogéneas, controlando el proceso de agregación durante la síntesis (Sinfontes y cols., 2010).

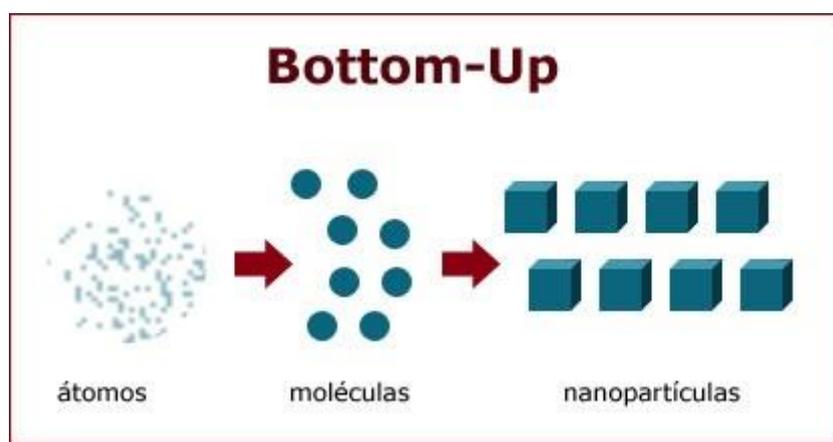


Figura 5. Representación esquemática del método *Bottom-up*.

<http://naotecnologi.blogspot.com.es/2014/11/tipos-de-nanotecnologia-la-forma-de.html>

Éste método es el más empleado para la obtención de AuNPs, ya que presenta las siguientes ventajas (Wang y cols., 2008):

- Obtención de una distribución de tamaño homogéneo.
- Método sencillo y reproducible.
- Permiten sintetizar nanopartículas a gran escala.
- Permite la variación del tamaño de las AuNPs cambiando las condiciones de reacción: agente reductor, temperatura, agitación y contenido de agentes metálicos.
- Las AuNPs que se obtienen, pueden ser empleadas en multitud de aplicaciones, son muy estables en el tiempo y no se agregan fácilmente (Friederici, 2013).

El mecanismo básico para dar lugar a la formación de clusters es reducir el Au^{3+} a Au elemental (véase figura 6), las AuNPs hay que protegerlas con un recubrimiento estabilizante

adsorbido sobre su superficie, para evitar la agregación y se emplean en muchas síntesis de AuNPs, como agentes estabilizadores se pueden utilizar los surfactantes entre otros, que controlan la velocidad del crecimiento de nanoclusters, gracias a que la interacción es débil, el surfactante puede adsorberse y resorberse con facilidad, favoreciendo la nucleación y el crecimiento y un mejor control del tamaño y forma del sistema coloidal (Quiros y cols., 2002).

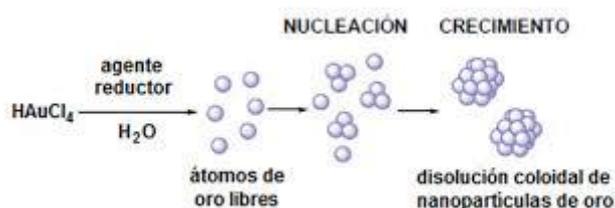


Figura 6. Esquema de la reducción de oro y formación de nanopartículas. <https://encrypted-tbn2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRTMuS5nqEYknVXUNq-QrY5X-5GcfSFvpikwqY7bmO0-19mQklmVQ>

Turkevich y colaboradores (Turkevich y cols., 1951) fueron los primeros en utilizar este método para sintetizar de forma rápida las AuNPs haciéndolo en tres pasos fundamentales: nucleación, desarrollo y aglomeración. Se considera una disolución de AuNPs monodispersa cuando no hay un desvío del tamaño medio mayor al 15%. (Bönnemann y Richards, 2001) Posteriormente, Murray (Murray y cols., 2000) y LaMer (LaMer y Dinigar, 1950), observaron que para obtener nanopartículas monodispersas se requieren separar la etapa de nucleación de la de desarrollo o crecimiento.

2.1.4 Actualidad y aplicaciones de las nanopartículas

Las nanopartículas tienen muchas aplicaciones debido a sus propiedades únicas, como son la dispersión de la luz, emisión fluorescente o el magnetismo. Esto ha hecho posible su aplicación en diversas tecnologías, como son la electrónica, la medicina y la catálisis. Igualmente las nanopartículas han sido empleadas en otras áreas menos sofisticadas, formando parte de productos, equipos y sistemas de uso común en la vida cotidiana, aunque no se perciba a primera vista. Algunas aplicaciones son (Gutierrez, 2005):

a) En la higiene se utiliza como desinfectante a base de nanoemulsiones: este es usado sobre todo en aviones para combatir el síndrome respiratorio agudo severo.

b) En la construcción como recubrimientos superhidrofóbicos repelentes de mugre y utilizados en los materiales, reduciendo la adhesión del agua y partículas de tierra.

c) En uso doméstico en lavadoras con nanopartículas de plata incorporadas en la tina, conocidas por su poder bactericida.

d) En textil se emplean nanopartículas de plata para la elaboración de calcetines y otros productos de vestir para prevenir infecciones como pie de atleta y otras causadas por pneumobacilo, colon bacili y hongos.

e) Como protección ambiental. Utilización de nanopartículas de dióxido de titanio en pintura de las casas o banquetas para que, con la luz del sol se descompongan los contaminantes atmosféricos.

d) En deportes, las pelotas de golf producidas por nano Dynamics, las nanopartículas corrigen vibraciones o pequeños corrimientos, canalizando la energía recibida del palo de golf.

e) En electrónica se utilizan nanopartículas metálicas para fabricar memorias para computadoras y nanotransistores.

F) En medicina, gasas para quemaduras o heridas crónicas. Estas gasas al poseer nanopartículas de plata actúan como un bactericida sobre 150 tipos de microbios. También se hallan en crema para dolores musculares utilizando liposomas de 90 nm, como adhesivo dental formado por nanopartículas de silicio que consigue uniones más fuertes con el esmalte y las coronas en endodoncias y otros tratamientos, utilización de nanopartículas de oro para detectar niveles de glucosa, uso de nanopartículas metálicas y magnéticas para la detección de células cancerígenas, de VIH y Alzheimers en sus comienzos, e incluso en test de embarazos (Winter, 2007).

De todas las aplicaciones, la más importante es la catálisis: los nanoclusters tienen muchas propiedades catalíticas para muchas reacciones orgánicas, como son su alta selectividad y sensibilidad (gracias a su elevada proporción superficie-volumen). También es interesante la aplicación en sistemas biológicos (Sperling y Parak, 2010), debido a su elevada superficie específica, facilita un estado de inmovilización correcto para moléculas como enzimas, ácidos

nucleicos, proteínas y biopolímeros. Se utilizan traductores de señal para manejar los cambios físicos y químicos producidos entre la unión del analito y del bioreceptor. Los diferentes tipos de biosensores son:

- Biosensores ópticos: La banda del plasmón superficial es la forma más empleada para la detección óptica. La unión de moléculas específicas sobre la superficie de las nanopartículas provoca cambios de la constante dieléctrica del entorno, siendo el espectro de las AuNPS muy sensible a esta perturbación. Este efecto provoca alteraciones en la interacción entre las ondas electromagnéticas y los electrones de la banda de conducción del metal. En 1998, Englebienne (Englebienne, 1998) observó un desplazamiento al rojo en el espectro de AuNPs recubiertas de un anticuerpo. Se demostró que dicho cambio no era debido a la aglomeración de las AuNPs, sino a variaciones en el índice de refracción provocadas por la unión de un ligando específico presente en el anticuerpo (Li y cols., 2010).
- Biosensores electroquímicos: Las propiedades conductoras de AuNPs favorece la transferencia electrónica, entre la proteína redox y el electrodo.
- Biosensores piezoeléctrico: La piezoelectricidad es un fenómeno que ocurre en determinados cristales al ser sometidos a tensiones mecánicas y adquieren polarización eléctrica. El más usado con fines analíticos es el cuarzo, es fácil determinar las variaciones de masas muy pequeñas ya que la medida de frecuencia se hace de forma sencilla con gran precisión.

Actualmente hay muchos avances en el conocimiento de las nanopartículas metálicas. Los coloides del oro son utilizados en química, biología, ingeniería y medicina. Actualmente estos materiales pueden ser fácilmente sintetizados y modificados con ligandos que contienen grupos funcionales tales como tioles, fosfinas y aminas, que exhiben afinidad superficial por el oro (Daniel y Astruc, 2004) Mediante el uso de estos grupos funcionales para anclaje de los ligandos, partes adicionales como oligonucleótidos, proteínas y anticuerpos pueden utilizarse para incluir una mayor funcionalidad. La realización de tales nanoconjugados de oro, ha permitido una amplia gama de investigaciones, incluyendo el montaje programado y cristalización de los materiales, (Mirkin y cols., 1996; Park, 2008) disposición de las nanopartículas en dímeros y trímeros dentro de moldes de ADN, bioelectrónica, y métodos de detección. La aplicación de nanoconjugados de oro para biodetección y biodiagnóstico han sido revisados en otros trabajos. En los últimos años, sus propiedades y nanoconjugados de

oro han llevado a nuevos y emocionantes desarrollos con enorme potencial en biología y medicina.

Estudios recientes, han demostrado que nanoconjugados de oro funcionalizados con fracciones de superficie apropiadas, pueden entrar fácilmente en las células vivas. Estos acontecimientos han creado un nuevo reto en la investigación de nanopartículas, incluyendo el uso más amplio de nanoconjugados de oro en biología celular y la promesa para su posible uso como agentes terapéuticos.

La superficie química es una de las claves características que controla las propiedades y funcionalidad, según el tipo de superficies de funcionalización, puede ser con: citrato, aminos, ácidos nucleicos, péptido, anticuerpo, y los lípidos ligados, se enfocan en la síntesis química para investigaciones y usos en células (Giljohann y cols., 2010).

Existen numerosos estudios referentes a la unión covalente de nanopartículas con el ADN, y escasos referentes a la unión no covalente (Lorente y Fernández, 2008). La interacción de sistemas de nanopartículas con largas cadenas de polímeros es muy importante en el campo de la medicina y biología molecular. En el interior del núcleo de las células eucariotas, especialmente dentro de la cromatina, el ADN se encuentra empaquetado y altamente unido a proteínas. La cromatina es un complejo de ADN y proteínas donde el componente proteico se conoce colectivamente como histonas que contienen residuos de arginina y lisina que les confiere carga positiva. Esto permite la rápida unión de una gran macromolécula con grupos fosfatos cargados negativamente, como es el ADN. Precisamente, el hecho de que las histonas tengan un tamaño similar al de las nanopartículas, hace de estos nanosistemas modelos de estudio para analizar en profundidad la forma de empaquetamiento y enrollamiento del ADN alrededor de las histonas.

2.2 El Ácido Desoxirribonucleico

El Ácido Desoxirribonucleico (ADN) es el portador de la información genética, de hecho muchos experimentos han demostrado que el ADN es el único componente cromosómico que contiene la información genética en las células vivas (Feduchi y cols., 2015). Tanto el ADN como el ARN pertenecen a un tipo de moléculas llamadas ácidos nucleicos, constituidos por nucleótidos. Los nucleótidos del ADN están constituidos por una 2-desoxi-D-ribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada; las bases nitrogenadas son de dos tipos: purinas (adenina y guanina) o pirimidinas (citosina y timina). Los nucleótidos del RNA presentan una D-ribosa a diferencia del ADN, y la timina es reemplazada por uracilo.

El modelo de la estructura tridimensional del ADN fue propuesto por Watson y Crick ,1953 (Calladine y cols., 2004). La principal característica es la formación de doble hélice, donde las dos cadenas de polinucleótidos están enrolladas alrededor de un eje común. Éstas dos cadenas del ADN son antiparalelas, las bases ocupan el centro de la hélice y en el exterior se sitúan las cadenas de azúcares y fosfatos. Esto hace que se reduzcan las repulsiones entre los grupos fosfatos cargados, porque se encuentran a mayor distancia. En la superficie de la doble hélice se encuentran dos hendiduras, el surco mayor y menor. Cada base se une por puentes de hidrógenos a la base opuesta de la hebra, para constituir un par de bases plano, de forma que bases complementarias se unen: A-T, G-C (éste último sería el par más estable, por estar conectado por tres puentes de hidrógeno en vez de dos, como es el caso del par, A-T) (Feduchi y cols., 2015).

El ADN tiene distintas conformaciones tridimensionales, ya que es una molécula muy flexible; la conformación más común en la mayoría de las células vivas es la conocida como el ADN B. Ésta es la estructura más estable que puede adoptar el ADN de secuencia al azar en condiciones fisiológicas. Las formas A y Z son dos variantes estructurales (Feduchi cols., 2015). La forma A es una forma más corta que la B pero más gruesa, estructurado en una doble hélice dextrógira. Se ha encontrado en muestras pobres en agua y raramente bajo circunstancias normales fisiológicas; el número de pares de bases de vuelta es de 11, diferente de los de ADN B que es 10.5 y al tener una inclinación en el plano de los pares de base, de 20° el surco mayor es más profundo y el menor más superficial (véase Figura 7).

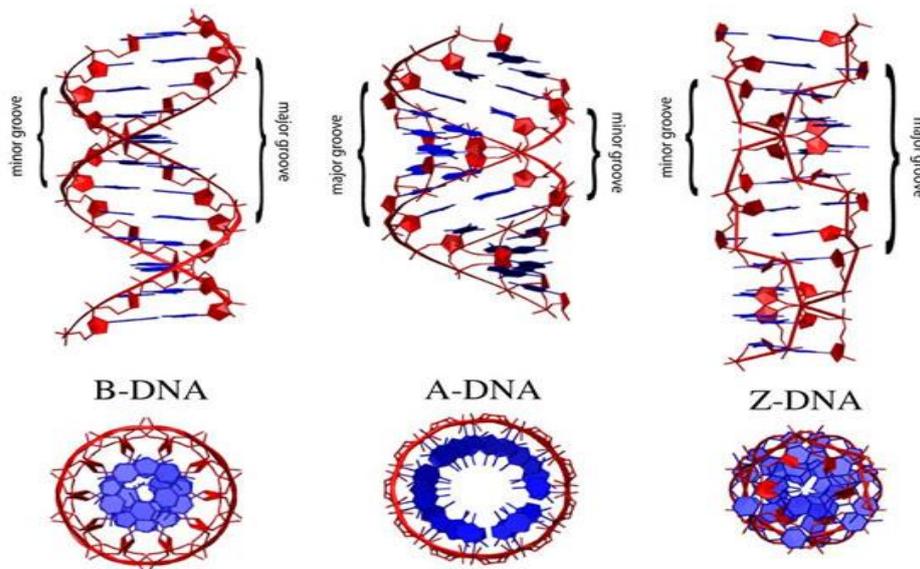


Figura 7. Variaciones en la estructura del ADN. <http://www.asturnatura.com/articulos/nucleotidos-acido-nucleico-adn/variaciones-estructura-ADN.jpg>

El ADN Z es una forma transitoria de ADN que solo aparece ocasionalmente en respuesta a ciertas actividades biológicas y desempeña un papel biológico importante contra enfermedades virales (Calladine y cols., 2004). Es una hélice levógira, contiene 12 pares de base por vuelta y la estructura es más delgada y alargada. Tiene un diámetro de hélice de 18 Å diferente al de ADN B que es de 20 Å, las bases se desplazan hacia la periferia de la hélice y hay solamente un surco profundo estrecho equivalente al surco menor en ADN B. El esqueleto del ADN Z sigue un camino en zigzag a diferencia de ADN B con un camino liso. Las interacciones electrostáticas juegan un papel crucial en la formación del ADN Z, porque el camino en zigzag del esqueleto hace que algunos grupos fosfato estén más cerca entre sí y la repulsión electrostática entre ellas es mayor que en ADN B. Por lo tanto, el ADN Z está estabilizado por las altas concentraciones de sal o cationes polivalentes, que protegen mejor la repulsión entre los grupos fosfatos que los cationes monovalentes (Ohyama, 2005).

Tabla 1: tipos de ADN con sus características.

<http://image.slidesharecdn.com/reconocimientosupramoleculardeladn-141125053519-conversion-gate01/95/reconocimiento-supramolecular-del-adn-3-638.jpg?cb=1434618472>

	ADN-A	ADN-B	ADN-Z
Sentido de giro	Dextrógiro	Dextrógiro	Levógiro
Surco mayor	Estrecho, profundo	Amplio, profundidad media	Sin profundidad
Surco menor	Amplio, no profundo	Estrecho, profundidad media	Estrecho, profundo
Diámetro hélice	2,55 nm	2,37 nm	1,84 nm
Unidad estructural	Par de bases	Par de bases	Dos pares de bases
Pares de bases/vuelta	11	10,4	12

Hay seis tipos de interacción y de unión reversible de moléculas con ADN de doble hélice.

- 1) Interacciones del ADN con el surco mayor.
- 2) Atracciones electrostáticas con el esqueleto de ADN.
- 3) Intercalación entre pares de bases del surco mayor de ADN.
- 4) Interacciones con surco menor de ADN.
- 5) Intercalación entre pares de bases al surco menor de ADN.
- 6) Modo intercalación de enhebrado.

Dependiendo de la característica estructural de la molécula que va a interactuar y el propio ADN, muchas moléculas muestran más de una interacción con el biopolímero. Intercalación y acoplamiento a surcos son los modos de interacción no covalente más frecuente (Strekowski y Wilson., 2007).

Las uniones a través del surco mayor son preferibles en el caso de largos ligandos como las poliaminas que tienen una interacción fuerte con el ADN al estar protonadas en condiciones fisiológicas. Dicha interacción depende de la estructura de las poliaminas y su carga neta. En las uniones a los surcos no es necesario un cambio conformacional importante de la doble hélice del ADN.

Por su parte, los intercaladores clásicos son moléculas aromáticas de anillos fusionados con carga positiva en una cadena lateral unida y/o el sistema de anillos en sí. El sistema de anillo plano se apila con pares de bases en el complejo de intercalación. La intercalación ocurre sin interferir con el enlace de hidrógeno de los pares de bases y obedece al principio de exclusión del vecino más cercano. Cuando el ADN está saturado con intercaladores, cada sitio de intercalación secundario de la hélice permanece vacío. La intercalación ha sido generalmente considerada como el resultado de interacciones hidrofóbicas en las cuales una molécula aromática hidrofóbica es empujada a un entorno hidrofóbico de la base. Las intercalaciones y los modos de unión del surco pueden ser distinguidos por la viscosidad y las mediciones de dicroísmo circular (Mata, 2013) (es la propiedad que poseen algunos materiales de absorber la luz a diferentes grados dependiendo de la forma de polarización del haz incidente). Si a la molécula de ADN se le une un ligando, el conjunto aumenta su viscosidad con respecto al ADN libre. Esta diferencia de viscosidad es la que hace que esta técnica permita determinar si un compuesto se une o no al ADN, ya que detecta cambios estructurales y variaciones en el tamaño de la molécula. Dado que, en la unión por intercalación el principal efecto es un alargamiento del ADN por desenrollamiento de la doble hélice, permite también diferenciar entre la unión por intercalación y la unión a surco, en la que no se produce un alargamiento de la cadena tan pronunciado. Los cambios que se producen en la viscosidad de una disolución que contiene ADN al añadir un ligando, se detectan mediante la utilización de un viscosímetro y midiendo el cambio en el tiempo de elución de dicha disolución (Suh y Chaires, 1995).

En un complejo de intercaladores enlazados con ADN, un sistema aromático es insertado entre los pares de la base, mientras un sustituyente catiónico se une en el surco mayor y otros sustituyentes interactúan con el surco menor. Los modos clásicos de intercalaciones y entrelazado pueden distinguirse a través de experimentos cinéticos de *stopped-flow*. Estos experimentos han demostrado que el entrelazado compone ambas asociaciones y

disociaciones con el ADN a velocidades más lentas que los intercaladores clásicos, aunque ambos tipos de agentes muestran constantes de unión de equilibrio comparables.

En los últimos años, los estudios de interacciones no covalentes del ADN con ligando han recibido una atención considerable a causa del aumento del número de aplicaciones derivadas de estas interacciones. Entre las aplicaciones destacan su utilidad en técnicas diagnósticas y agentes terapéuticos o la posibilidad del empleo del ADN como conductor molecular (Genereux y Barton, 2012). También es interesante su importancia en relación con procesos de transporte de genes (Akbulut y cols., 2007) y en la fabricación de biosensores (Rosi y Mirkin, 2005).

3. Objetivos

El objetivo de este trabajo consiste en el analizar en profundidad de los numerosos estudios que existen sobre las interacciones de AuNPs con el ADN, con el fin de sintetizar los resultados más recientes.

Las nanopartículas de metales nobles, más específicamente las AuNPs, exhiben unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su tamaño nanométrico. Dicho tamaño es similar al tamaño de las histonas, lo que hace de este nanosistema un modelo de estudio para analizar en profundidad la forma del empaquetamiento y enrollamiento del ADN alrededor de las propias histonas. Esto se realiza con la finalidad de obtener nanosistemas óptimos para las distintas aplicaciones terapéuticas.

Las AuNPs pueden ser producidas con distintos tamaños y formas y ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético...). Por todo ello, las AuNPs despiertan un gran interés en química, biología, ingeniería y medicina. En esta revisión bibliográfica destacan los avances recientes en la síntesis, *bioconjugation* y aplicaciones celulares de nanoconjugados de oro. Hay muchos ejemplos de ensayos de alta sensibilidad y selectividad sobre nanoconjugados de oro. Esto ha forjado una nueva frontera en la investigación de nanopartículas, incluyendo el uso más amplio de nanoconjugados de oro en biología celular y la promesa para su posible uso como agentes terapéuticos.

Las nuevas Tecnologías basadas en la unión de nanopartículas y ADN, así como en sus interacciones, han sido desarrolladas y usadas principalmente en el diagnóstico molecular y en

la terapia génica y de detección. Estos enfoques ofrecen una oportunidad para el desarrollo de tecnologías eficientes y de bajo coste para el diagnóstico de enfermedades y la detección de ADN con una alta sensibilidad. Todo ello muestra que las técnicas basadas en la unión entre nanopartículas y ADN podría tener una implicación prometedora en la biotecnología médica en un futuro próximo.

4. Metodología

La metodología seguida en esta revisión bibliográfica, se ha llevado a cabo a través de varias líneas complementarias:

- Asistencia al curso de bibliografía.
- Revisión de la literatura a partir de bases de datos científicas.
- Consulta de libros.

La asistencia al evento sobre *Competencias informacionales para el Trabajo Fin de Grado (TFG) para el Grado en Farmacia* fue impartida en el edificio CRAI Antonio de Ulloa por Marisa Balsa Anaya. Nos explicó cómo realizar las búsquedas bibliográficas, a través del catálogo del CRAI, como llegar a búsquedas avanzadas y, por último, profundizó en Mendeley (gestor de referencias bibliográficas con características avanzadas de red social que está integrada en base de datos comerciales, el repositorio institucional y el catalogo del CRAI de la UB). Con esta base de datos, Mendeley, hemos trabajado exhaustivamente, ya que ofrece la oportunidad de crear una biblioteca personal y poder organizar tus documentos.

También he utilizado otras bases de datos de gran fiabilidad tales como:

- PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).
- SCOPUS (<https://www.scopus.com/>).
- ISI Web of Knowledge (www.accesowok.fecyt.es/).

Además internet ha sido una herramienta útil. En concreto se ha hecho uso de *Google* para las búsquedas de información, lo que nos dirigía a páginas especializadas en el tema para poder comparar información y resolver dudas referentes a los artículos. Complementariamente, *Google Images* ha permitido buscar imágenes en busca de un mejor entendimiento del tema a tratar.

Durante la revisión de la literatura científica, en las bases de datos de carácter general hemos utilizado términos tanto en inglés como en español, teniendo como resultados artículos en ambos idiomas. De esta manera hemos abarcado un campo más amplio de revisión. Las palabras claves utilizadas en la búsqueda fueron: *ADN binding, ADN structure, non-covalent interactions, groove binding, electrostatic interaction, gold nanoparticles, Mirkin, nanoparticles*, ect.

Por último, hemos utilizado el catálogo FAMA perteneciente a la Universidad de Sevilla, para la consulta de libro de Bioquímica conceptos esenciales (Feduchi y cols., 2015).

5. Resultados y discusión

5.1 Mecanismos de unión de ADN con AU-NP

Es un método basado en el desarrollo de las nanopartículas hacia las aplicaciones de diagnóstico sensible y específico y sistemas eficaces de entrega de genes; logrando una alta sensibilidad mediante interacciones entre una única molécula de ADN y nanopartículas, a través de unión molecular específica o no específica. El ADN puede estar unido covalentemente a la superficie de las nanopartículas a través de grupos de anclaje (-SH, -OH, -NH₂, O -COOH). Las nanopartículas de oro (Au-NP) o nanopartículas de plata (Ag-NP) son, por lo general, funcionalizadas con oligonucleótido tiolado, generando la unión ADN-nanopartículas, que se investigan para la hibridación del ADN específico y el reconocimiento de secuencias complementarias de interés. La unión no específica entre el ADN y las nanopartículas puede ser alcanzada por simple adsorción a través de interacciones no covalentes. La afinidad de unión no covalente es similar a las interacciones in vivo del ADN y de la proteína represora. Se requieren para controlar la liberación de los ácidos nucleicos en la terapia génica o regulación.

Por lo tanto, una comprensión de este tipo de reacciones de uniones moleculares a nivel atómico es crucial, con el fin de describir la base estructural y funcional para los mecanismos subyacentes. Li y Rothberg (Li y Rothberg, 2004a) encontraron que la cadena corta de ADN simple se une a Au-NP de 13 nm y evita la agregación inducida por sal. Sin embargo, los oligómeros complementarios hibridados no logran estabilizar AuNP inalteradas, y da lugar a la agregación de partículas en la mezcla de solución salina. Se propuso que estas reacciones de unión molecular pueden ser útiles para las pruebas de mutación del ADN y polimorfismo nucleótido único (SNP).

La selectividad de la AuNP para la unión a ss-ADN puede surgir por varias razones. Muchos investigadores creen que fuerzas electrostáticas entre las cadenas de ADN aniónicas y las superficies cargadas negativamente de AuNP, estabilizada con citrato, son menos favorable para unión con ds-ADN porque tiene una mayor superficie de densidad de carga y exhibe más repulsión que la de ss-ADN (Gaylord y cols., 2002). Por otra parte, el estudio en la afinidad de unión de desoxinucleósidos a AuNP reveló que los cuatro desoxinucleósidos muestran afinidades altas, mientras que la timina interactúa mucho más débilmente con la superficie de oro que otras nucleobases (Storhoff y cols., 2002). La doble estructura de ADN impide la exposición de las bases a superficies de oro, y por lo tanto, limitan las interacciones ADN-AuNP (Boon y cols., 2000). Por último, ss-ADN es flexible y favorece la envoltura alrededor de AuNP, mientras que ds-ADN es relativamente rígida y no es favorable para envolverse alrededor de la AuNP. La estructura del ADN puede desempeñar un papel importante en las interacciones de ADN y nanopartículas de oro. Esta unión se debilita a medida que aumenta la longitud de la molécula de ss-ADN, y sólo se puede producir a alta temperatura, por ejemplo, 55 °C durante 50-mer ss-ADN. Como la estructura horquilla se forman fácilmente en ss-ADN más larga a temperatura ambiente, ésta puede impedir estéricamente las interacciones de unión. No se había encontrado unión de ss-ADN larga de 100-mer de oligómeros a 5 nm Au-NP (Zanchet y cols., 2000). Por otro lado, Sandström y colaboradores (Sandström y cols., 2003) informaron de la unión no específica de ds-ADN (12 pares de bases) a 13 nm Au-NP por interacciones dispersivas de ion- dipolo inducido. Ellos argumentaron que la polarizabilidad de una esfera conductora es proporcional al cubo del radio de la esfera. Se encontró que la polarizabilidad se reducía significativamente cuando los tamaños de las partículas variaban de 13 nm a 5 nm. El efecto del tamaño de la nanopartícula es uno de los aspectos más importantes en la aclaración del mecanismo de unión. Yang y colaboradores (Yang y cols., 2004) estudiaron la afinidad de unión de ss-ADN a AuNP, y declararon que la fuerza de interacción entre ss-ADN y la superficie de las partículas de Au, están estrechamente relacionadas con el tamaño de partícula.

La estrategia general, para modificar la superficie de las AuNPs, puede dividirse en dos métodos, basados en interacciones covalentes o no covalentes. Las interacciones no covalentes facilitan interesantes uniones de nanopartículas de oro con biomoléculas pero, por supuesto, más débiles que una interacción covalente. La unión covalente proporciona vehículos estables para el suministro, pero esta elevada estabilidad puede resultar un

inconveniente ya que, para la liberación del fármaco, se requiere un procesamiento intracelular del pro-fármaco.

Se describirán algunas de las fuerzas no covalentes: interacciones electrostáticas, fuerzas hidrofóbicas y unión específica entre bases de ADN y oro.

5.1.1 Interacciones electrostáticas

Las interacciones electrostáticas son unas fuerzas muy involucradas en los procesos de adsorción ADN-oro, debido a que las moléculas de ADN y las superficies de oro son dependientes a las cargas.

Debido a las características polianiónicas del esqueleto fosfato, el ADN está cargado negativamente, y las superficies de oro, especialmente en AuNPs, tienden a estar cargados negativamente. Por lo tanto, para lograr la adsorción, se deben de superar las fuerzas de repulsión que existen entre moléculas de ADN y la superficie de oro.

Experimentalmente, las condiciones tales como pH y concentración de sal, en solución electrolítica, pueden alterar la carga total en ADN, y con ello afectar de forma significativa en el proceso de adsorción ADN-oro. De modo que, la ausencia de sal favorece la repulsión entre ADN y oro y, por lo tanto, no se produce la adsorción. Los estudios realizados por Herne y Tarlov (Herne y Tarlov, 1997) sobre el oro plano, mostraron que la concentración de sal era directamente proporcional al nivel de la adsorción de ADN-oro. La máxima adsorción se ha logrado con una concentración mayor a 0.4 M KH_2PO_4 ; siendo similares a estudios observados con nanopartículas de oro (Zhang y cols., 2012).

Individualmente las bases de ADN tienen cargas neutras en el rango de pH de $4.0 < \text{pH} < 9.0$ (Saenger, 1984). Para la timina (T) y guanina (G) el $\text{pH} > 9.0$ se desprotonan mientras que en citosina (C) y adenina (A) son protonadas a $\text{pH} < 4.0$. La protonación de las bases de ADN favorece los procesos de adsorción de ADN, debido a que hay menos repulsión entre ADN y superficies de oro, una condición, que ha sido seguida ampliamente para aplicaciones en biosensores.

Las cargas negativas del esqueleto de fosfato son también dependientes de la estructura plegable del ADN. La cadena simple de ADN es flexible, y puede cambiar, fácilmente, su conformación expuesta, ya sea las bases o la carga negativa del esqueleto.

Sin embargo, la cadena doble de ADN, tiene una conformación más rígida, con las bases integradas, exponiendo las cargas negativas del esqueleto de fosfato (Li y Rothberg., 2004a; Li y Rothberg, 2004b).

5.1.2 Fuerzas hidrofóbicas

Las fuerzas hidrofóbicas pueden afectar la solvatación de las moléculas de ADN, que por su parte, es crítica para las interacciones de rango corto de ADN-oro (Nelson y Rothberg, 2011). Esto es debido a la adsorción de ADN-oro, que parece requerir la deshidratación de las bases de ADN y, en menor medida, la estructura de ADN. La interacción de las bases de ADN y el esqueleto fosfato de ADN con moléculas polares de agua es fuerte y distintas unas de otras.

Las bases de ADN acomodan las moléculas de agua en posiciones específicas, (por ejemplo, bases de anillos de nitrógenos, grupos amino y ceto exocíclicos), mientras que, las moléculas de agua, interaccionan con el esqueleto del ADN, de una manera menos organizada porque los contraiones hidratados en solución (por ejemplo, Na⁺) pueden moverse libremente sin estar unido a sitios específicos (Bour y cols., 2005).

Por lo tanto, la magnitud de la interacción ADN-oro, se verá afectada por las condiciones que la alteran, ya sea la fuerza de los grupos de unión de agua de las bases de ADN, o el tipo de contraiones condensados, que interactúan con el esqueleto de ADN (Liu, 2012). Por ejemplo, la energía de enlace del agua de adeninas protonadas (es decir, adeninas a pH inferior a 4) es significativamente pequeño en comparación con las de adeninas no protonada (Liu y cols., 2006). Por lo tanto, en condiciones que favorecen la protonación de adenina, las secuencias con un mayor contenido de adenina son ideales para la adsorción ADN-oro (Zhang y cols., 2012; Jiang y cols., 2013). Del mismo modo, la composición del tampón también influye en la unión de ADN a oro, debido a que la naturaleza de los iones influirá a la solvatación de la estructura de ADN y la superficie de oro. Estudios de adsorción de ss-ADN en AuNPs, de hecho han demostrado solamente un cambio de catión de Na⁺ a Mg²⁺ en un tampón que contiene Cl (es decir, MgCl₂ en lugar de NaCl) puede inducir la adsorción más rápida de ADN (Nelson y Rothberg, 2011).

5.1.3 Unión específica entre bases de ADN y el oro

La unión química del ADN con el oro es primordialmente con las bases del mismo. Las bases de ADN contienen grupos químicos específicos en sus anillos purínicos y pirimidínicos, para establecer unión fuerte con la superficie del oro (Demers y cols., 2002; Östblom y cols., 2005; Kimura-Suda y cols., 2003; Piana y Bilic, 2006) con la excepción de la adenina, todas las bases interactúan con el oro a través de fuerzas de fisorción (o adsorción física) (Demers y cols., 2002; Östblom y cols., 2005; Piana y Bilic, 2006). La adenina tiene un grupo amino exocíclico, localizado en la sexta posición y un anillo de nitrógeno en la séptima posición, el cual permite, excepcionalmente, una alta afinidad de adsorción en el rango de la quimisorción. La unión, presumiblemente, toma lugar a través de mecanismos coordinados, implicando la interacción directa de los anillos de nitrógeno con el oro, con la contribución parcial del grupo amino exocíclico (véase figura 8) (Demers y cols., 2002; Kimura-Suda y cols., 2003; Piana y Bilic, 2006; Jang, 2002). La afinidad de la adenina hacia el oro es tan alta, que puede efectivamente competir con la unión estable de Watson-Crick del ds-poly-AT (Kimura-Suda y cols., 2003). Como resultado en las inmediaciones de las superficies del oro, secuencias poly-A absorben fuertemente como ss-moléculas, a pesar de la presencia de secuencias poly-T complementarias. Este modo de unión tiene características diferentes de la secuencia poly-A, y no seguido por otras bases de ADN, dando lugar a diferentes fuerzas de afinidad de las bases hacia las superficies de oro.

Las bases del ADN también interactúan con el oro a través de anillos aromáticos. Algunos estudios, usando nucleobases individuales, han confirmado que, excepto la adenina, todas las bases tienden a orientarse paralelamente con respecto a la superficie. Esta configuración permite una superposición máxima, de densidades electrónicas entre bases y oro, en favor de la carga transferida, entre los anillos aromáticos y la superficie del oro. La única unión, en quimisorción de adenina, causa que esta nucleobase pierda la planaridad de su grupo amino, y se queda ligeramente inclinado, con respecto a la superficie del oro (Demers y cols., 2002; Piana y Bilic, 2006). Para una mayor cobertura de la superficie, interacciones pi-apiladas entre bases pueden surgir, principalmente de condensación de bases en la superficie de oro, y formación de multicapas de bases de ADN en orientaciones específicas.

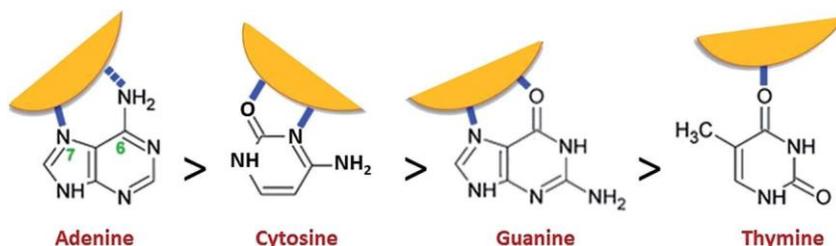


Figura 8. La unión de bases de ADN y el oro. Las bases de ADN interactúan con superficies de oro principalmente a través de grupos amino y átomos de oxígeno. Las afinidades relativas de bases de ADN en moléculas de ADN siguen la tendencia $A > C > G > T$ (koo y cols., 2015).

5.2 Unión ADN-NP en biotecnología médica

Muchas de las tecnologías convencionales para el diagnóstico y el tratamiento de diversas enfermedades, ahora se enfrentan a retos en términos de coste, eficiencia y sensibilidad de los sistemas de biodetección y dispositivos utilizados. El desarrollo de sistemas de detección rentables, y portátiles con alta sensibilidad es de gran importancia. Nuevos enfoques, basados en la tecnología de nanopartículas, han sido desarrollados para la detección temprana y precisa de cáncer o enfermedades usando marcadores de ADN. La AuNP es capaz de mejorar las señales de dispersión Raman en orden de 10^5 - 10^{15} , haciendo posible la detección de una sola molécula (Freeman y cols., 1995). El uso de AuNPs permitió mejorar 1000 veces la sensibilidad de la SPR (White y Rosi, 2008). Las actuales investigaciones, basadas en técnicas de unión de ADN-nanopartículas, que tienen la ventaja de tener tamaño único y propiedades ópticas, darán lugar a ensayos para una variedad de aplicaciones biológicas.

5.2.1 La genoterapia

La genoterapia es una tecnología convencional de la transfección de ADN. Ésta consiste en abrir agujeros en la membrana de la célula, usando fosfato de calcio por la electroporación o mezcla de ADN con un liposoma catiónico, pero ha demostrado ser una técnica ineficaz. Las moléculas de ADN pueden ser rápidamente degradados antes de llegar a la meta si el ADN desnudo es entregado directamente. El uso de vectores virales, para entregar ADN, puede causar algunos problemas porque pueden producir una respuesta inmune seria en el huésped, que puede ser letal, y poner en peligro a los pacientes. Las AuNPs son consideradas como vectores no virales eficaces para superar los obstáculos para el transporte de ADN plasmídico,

siARN u oligonucleótidos antisentido para terapia génica (Guo y cols., 2010), donde la tecnología de unión a ADN, desempeña un papel importante en la entrega efectiva, tales como la protección de ácido nucleico de la degradación por las nucleasas, y la liberación de los ácidos nucleicos en una forma funcional (Han y cols., 2007).

5.2.2 Detección óptica basada en biosensores

5.2.2.1 Aplicaciones basadas en diferentes uniones de ss-ADN y ds-ADN en nanopartículas de oro.

En los últimos años, muchos ensayos de biosensores han sido desarrollados, utilizando las diferentes adsorciones de oligonucleótidos de cadena simple y doble, sobre nanopartículas de oro sin modificar para la lectura colorimétrica. Estas AuNPs fueron sintetizadas a través del proceso de reducción de citrato, y sus superficies, han sido cargadas negativamente, las cuales solo permiten adsorber la cadena simple de los oligonucleótidos. En soluciones altamente salinas, la rápida adsorción de ss-oligonucleotidos sobre nanopartículas de oro, prevendrá la agregación de nanopartículas de oro, mientras que, los oligonucleótidos de doble cadena, cargados negativamente, causan la agregación espontánea de nanopartículas de oro, generando una transición de color de rojo a azul en la solución. Esta lectura colorimétrica es observable a simple vista, por lo tanto elimina la necesidad de cualquier instrumento especializado de lectura, y en consecuencia es muy adecuado para el desarrollo de biosensores. Además, estos ensayos son atractivos por su eficiencia en coste, y convenientes para la detección de un amplio rango de analitos. Las aplicaciones claves, desarrolladas usando el mecanismo, incluye la detección de ADN, que desarrollamos en el siguiente apartado.

➤ Detección colorimétrica de secuencias de ADN

La detección de secuencias específicas de oligonucleótidos tiene importantes aplicaciones en la investigación médica y diagnóstico, seguimiento industria farmacéutica y alimentaria, y la vigilancia del medio ambiente (Primrose y Twyman, 2003). La adsorción selectiva de ss-ADN sobre ADN de doble cadena en AuNPs no modificadas con carga negativa fue reportada por primera vez por Li y Rothberg (Li y Rothberg, 2004c). La diferencia en las propiedades electrostáticas de oligonucleótidos de ds-ADN y ss-ADN se puede utilizar para diseñar un método colorimétrico, para detectar la hibridación de oligonucleótidos. El cambio de color se

deriva de la agregación de partículas coloidales de oro, pero el mecanismo en el trabajo de Li y Rothberg es diferente, por lo que no se requiere ninguna modificación del oro o la sonda de ss-ADN o de hebras diana. Por otra parte, la hibridación es totalmente independiente de detección, de modo que, se puede hacer en condiciones óptimas, sin restricciones estéricas de sondas, unidas a la superficie que enlentece la hibridación, y hace que sea menos eficiente.

La idea central es que, los oligonucleótidos de cadena doble y simple (ds-ADN y ss-ADN), tienen diferentes propiedades electrostáticas. La diferencia esencial surge porque ss-ADN puede desenrollarse suficientemente para exponer sus bases, mientras que ds-ADN tiene una geometría de doble hélice estable, que siempre presenta la carga negativa del esqueleto de fosfato (Watson, 1968; Bloomfield, 1999). Las nanopartículas de oro en solución se estabilizan típicamente por iones negativos adsorbidos (por ejemplo, citrato), cuya repulsión evita que la fuerte atracción de fuerzas van der Waals entre partículas de oro provoque que se agreguen. (Hunter, 2001; Shaw, 1991).

La repulsión entre la cadena principal de fosfato cargada de ADN de doble cadena, y los iones citrato adsorbidos, domina la interacción electrostática entre el oro y ADN de doble cadena para que ds-ADN no adsorba. La ss-ADN es suficientemente flexible para desenrollarse parcialmente sus bases, que pueden estar expuestas a las nanopartículas de oro. En estas condiciones, la carga negativa de la estructura es, a una distancia suficiente, para que la atracción de las fuerzas de van der Waals, entre las bases y la nanopartícula de oro sean suficientes para causar que la ss-ADN se pegue al oro. El mismo mecanismo no es operativo con ds-ADN, debido a que, la estructura dúplex, no permite el desenrollado necesario para exponer las bases.

Debido a que el color de las nanopartículas de oro, se determina principalmente por SPR, y porque este se ve afectada drásticamente por la agregación de las nanopartículas (Link y El-Sayed, 2000; Quinten y Kreibitz, 1986), se puede utilizar la diferencia en las propiedades electrostáticas de ss-ADN y ds-ADN, para diseñar un simple ensayo colorimétrico de hibridación, en el que se observarían, que en las soluciones con pocas ss-ADN por nanopartículas de oro, tienen claramente diferentes espectros de absorción; a pesar del hecho, de que el área de la superficie de las nanopartículas, es suficiente para dar cabida a varios cientos de ss-ADN 24-meros. Con suficiente ss-ADN, el coloide retiene un color rosa. Desde un punto de vista práctico, la diferencia en la agregación de oro y de partículas causada por adsorción ss-ADN, nos permite diseñar un ensayo, para determinar si una muestra dada contiene ss-ADN o ds-ADN según el protocolo que se representa en la figura 7. Por lo tanto, las soluciones con cantidades adecuadas de ss-ADN, previene la agregación y el coloide de oro

permanece rosa, mientras que las soluciones con ds-ADN no afectan a la agregación y las soluciones se vuelven azules. Presumiblemente, la adsorción de ss-ADN tiene que ver con una redistribución de la carga que hace que la superficie aparezca más cargada negativamente (Li y Rothberg, 2004b).

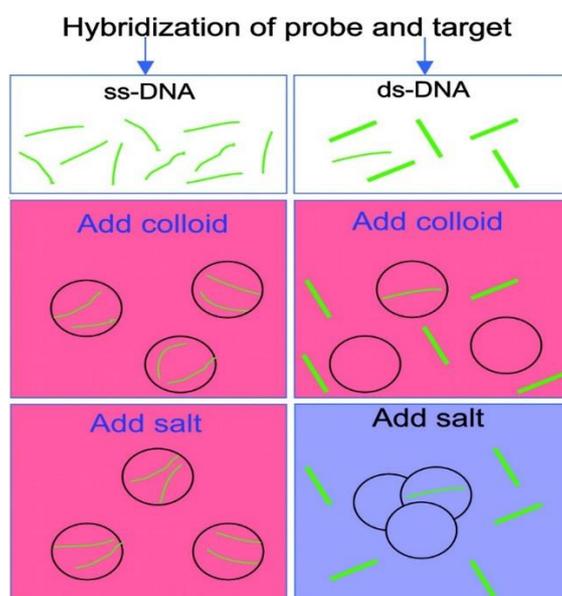


Figura 9. Representación pictórica del método colorimétrico para diferenciar entre los oligonucleótidos de una y de doble cadena. Los círculos representan las nanopartículas de oro coloidal (koo y cols., 2015).

5.2.2.2 Las aplicaciones basadas en la adsorción dependiente de la secuencia de ADN sobre el oro.

La adsorción de la secuencia dependiente de ADN con el oro tiene un interés generalizado en la última década debido a su potencial aplicación en biodetección de ADN. Los biosensores de ADN implica típicamente la inmovilización de sondas de ADN monocatenario, modificado con tiol, en la superficie del sensor, para generar monocapa autoensamblada, que pueda específicamente, hibridar la secuencia diana complementaria de la enfermedad específica (Carrascosa y cols., 2014).

Sin embargo, el montaje de sondas de captura ss-ADN modificado con tiol es caro y consume mucho tiempo, a diferencia de la interacción ADN- oro dependiente de la secuencia, que es una alternativa potencialmente más barata y más rápida para inmovilizar ss-ADN sin modificar,

como sondas de captura en superficies de oro. Además, la adsorción secuencia-dependiente de ADN puede también ser un enfoque viable para la detección de cambios en la secuencia ADN y una potencial aplicación para tal enfoque es la detección de metilación del ADN en cáncer. La metilación del ADN implica una adición de grupo metilo en la posición quinta del anillo de citosina (Suzuki y Bird, 2008).

Aunque metilación de ADN no altera la secuencia de ADN, éstas adición de grupos metilo pueden ser químicamente tratadas y convertidas en cambios de secuencia que podrían directamente afectar a la naturaleza de procesos de adsorción y magnitud de la fuerza afinidad de ADN- oro.

Debido a estos cambios de secuencia podría significativamente alterar la magnitud de la fuerza de adsorción de ADN-oro, en la medición exacta de esta fuerza de adsorción de diferente afinidad podrían ser útil en la detección de la metilación del ADN.

➤ **Metilación del ADN**

Hasta la actualidad se han hecho muy pocos intentos para detectar la metilación del ADN basado en la diferente afinidad de interacción de las bases de ADN hacia las superficies de oro. Recientemente, Chang y colaboradores (Lin y Chang, 2013) informaron de un ensayo colorimétrico para la detección del nivel de metilación del ADN basado en la fuerza de las interacciones hidrófobas entre el ADN y AuNPs. Así, las diferentes fuerzas de afinidad de la adsorción de ADN en AuNPs fue suficiente para discriminar la base de nitrogenada del ADN, permitiendo medir los estados de metilación de una isla específica CpG (Son regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos. Sin embargo, la tendencia de la interacción de afinidad de las bases de ADN con AuNPs (es decir, $A = T > C = G$) fue marcadamente diferente desde estudios anteriores utilizando AuNPs o superficie planas de oro (es decir, $A > C > G > T$). Esta diferencia se explica teniendo en cuenta las interacciones hidrofóbicas y lipofóbicas de bases de ADN individuales. A diferencia de los métodos tradicionales de metilación del ADN, este método tiene varias ventajas: (1) se podría detectar directamente a simple vista el estado de metilación de ADN genómico convertido con bisulfito (seguido de la amplificación PCR), (2) podría ser determinada la heterogeneidad de la metilación del ADN dentro de un único tipo de célula cancerígena, y (3) no es requerida la modificación de la superficie de ligandos biomoleculares específicos sobre la AuNPs. Sin

embargo, este método se basa en la agregación inducida por sal de AuNPs, y está limitada por una baja sensibilidad para la detección de la metilación.

Más recientemente, Sina y colaboradores (Sina y cols., 2014a) demostraron un método único conocido como "Methylsorb" para cuantificar eventos de metilación de ADN utilizando la interacción de la afinidad dependiente de secuencia de ADN no modificada por las superficies planas de oro. El mecanismo subyacente de este método se basa en: (tratamiento con bisulfito de ADN que convierte eventos de metilación en cambios de base, y la interacción de afinidad dependiente de secuencia entre las bases de ADN y la superficie de oro (es decir, la adsorción de ADN sigue la tendencia, $A > C > G > T$). El tratamiento con bisulfito convierte citosinas no metiladas en uracilos, pero la citosina metilada se mantiene sin cambios. La etapa posterior de PCR asimétrica amplifica la cadena antisentido del ADN tratado con bisulfito para generar productos de ss-ADN. Este paso también convierte uracilos en adeninas en la cadena antisentido de ADN no metilado, mientras que guaninas se generan en el ADN metilado. Estas diferencias de bases en las secuencias de ADN metiladas y no metiladas modifican su comportamiento de adsorción con el oro y se utilizan para cuantificar el estado de metilación original de la muestra.

En condiciones optimizadas, el enfoque eMethylsorb se utilizó con éxito para detectar la metilación del ADN en 10 min. Además, este método mostró una buena sensibilidad con la resolución CpG solo y detección de la metilación del 10% tanto en muestras sintéticas y biológicas. Una de las innovaciones más importantes de este método es el uso de la adsorción directa de muestras de ADN objetivo en un electrodo de oro desnudo en lugar del enfoque convencional de la utilización de capas de reconocimiento y de transducción en biosensores de ADN.

Esta es una evolución sustancial ya que simplifica significativamente el método evitando las complicaciones químicas subyacentes en cada paso de la fabricación de sensores. Además se demostró con éxito que la tecnología de eMethylsorb tiene bajo coste y los electrodos oro serigrafiado pueden ser desechable (Koo y cols., 2014), con una excelente sensibilidad y reproducibilidad del ensayo. Así eMethylsorb es un ensayo de metilación con potencial para aplicaciones clínicas futuras.

La literatura actual indica que eMethylsorb (Sina y cols., 2014b; Koo y cols., 2014) es el primer método para la detección electroquímica de la metilación del ADN basada en la interacción de la afinidad de ADN - oro. Aunque el mecanismo subyacente entre el eMethylsorb y el enfoque de detección de la metilación del ADN colorimétrico descrito por Chang y colaboradores (Lin y

Chang, 2013) es ligeramente diferente, ambos métodos detectan la metilación del ADN basándose en la interacción directa entre el ADN y el oro desnudo. La detección colorimétrica tiene varias ventajas para aplicaciones de biosensores. Sin embargo, este método se basa en la lectura de UV- visible para obtener el nivel cuantitativo de metilación del ADN. Por el contrario, eMethylsorb muestra una excelente capacidad en la cuantificación de la metilación del ADN en una sola resolución CpG.

6. Conclusión

En esta revisión se presentan los fundamentos de las interacciones moleculares entre nanopartículas y ADN, y los mecanismos de unión de ADN de nanopartículas con sus implicaciones en las ciencias biológicas y biotecnología médica. Se han investigado las diferentes fuerzas intermoleculares: interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas y uniones específicas de ADN-oro, para poder averiguar los principales factores que afectan a las interacciones ADN-oro. En estos estudios se ha demostrado que la secuencia de ADN y su conformación pueden afectar a la adsorción de ADN-oro; exponiendo las diferentes afinidades que se dan en la AuNP no modificada,(1) que se dan en los cuatro desoxinucleotidos (adenina > citosina > guanina > Timina), ya que la timina interacciona más débilmente con la superficie del oro que otras bases y limita las interacciones de ADN-AuNP; y (2) diferencias entre ss y ds -ADN, por lo que la cadena simple es más flexible y favorece la envoltura con la AuNP, a diferencia de la doble, que es más rígida y también porque exhibe más repulsión de cargas debido a su mayor superficie de densidad.

Se ha comprobado la importancia de los ensayos colorimétricos basados en la adsorción diferencial ss-ADN / ds-ADN en los cuales se puede lograr la detección óptica a simple vista, ya que con cantidades adecuadas de ss-ADN, el coloide de oro permanece rosa porque estas previenen la agregación de las AuNPs, a diferencia de las soluciones con ds- ADN, en las que sí se produce la agregación y las soluciones se vuelven azules .El segundo tipo de ensayo se basó en la adsorción dependiente de la secuencia de ADN- oro, que ha sido utilizado para la novedosa detección de secuencias de ADN metilado en el cáncer. Ambos tipos de ensayos tienen la ventaja de ser rápidos, rentables y fáciles de realizar, por lo que es prometedor en futuras aplicaciones para ofrecer resultados positivos o negativos de detección con el fin de realizar diagnósticos.

En conclusión, la comprensión de estas interacciones moleculares y los mecanismos de unión de ADN-NP servirán para fomentar en el futuro el desarrollo de nuevas biotecnologías para superar las limitaciones de terapia y diagnóstico clásico.

7. Bibliografía

- Akbulut M, Alig A, Min Y, Belman N, Reynolds M, Golan Y et al. Forces between Surfaces across Nanoparticle Solutions: Role of Size, Shape, and Concentration. *Langmuir*. 2007; 23(7): 3961-3969.
- Bloomfield VA, Crothers VADM, Tinoco I. *Nuclei Acids: Structures, Properties, and Functions*. Sausalito: University Science Books; 1999
- Bönnemann H, Richards R. Nanoscopic Metal Particles – Synthetic Methods and Potential Applications. *Eur J Inorg Chem*. 2001; 2001(10): 2455-2480.
- Boon EM, Ceres DM, Drummond TG, Hill MG, Barton JK. Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 1096–100.
- Bour P, Andrushchenko V, Kabelác M, Maharaj V, Wieser H. Simulations of Structure and Vibrational Spectra of Deoxyoctanucleotides. *J. Phys. Chem. B*. 2005; 109(43): 20579-20587.
- Calladine C. *Understanding DNA*. 3ªed. London: Elsevier Academic Press; 2004.
- Cao G. *Nanostructures and nanomaterials*. London: Imperial College Press; 2004.
- Carrascosa LG, Sina AAI, Palanisamy R, Sepulveda B, Otte MA, Rauf S et al. Molecular inversion probe-based SPR biosensing for specific, label-free and real-time detection of regional DNA methylation. *Chem. Commun*. 2014; 50(27): 3585–3588.
- Cornejo L. Porqué de las diferentes propiedades de las nanopartículas - Nuevas Tecnologías y Materiales. 2015a [Internet]. [Consultado el 30 Julio 2016]. Disponible en: <http://nuevatecnologiasmateriales.com/el-porque-las-diferentes-propiedades-de-las-nano-particulas/>.
- Cornejo L. Resonancia del plasmón de la superficie (RPS). 2015b [Internet]. [Consultado el 30 Julio 2016]. Disponible en: <http://nuevatecnologiasmateriales.com/resonancia-del-plasmon-de-la-superficie-rps-propiedades-optoelectronicas/>
- Daniel M, Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*. 2004; 104(1): 293-346.

- Demers LM, Östblom M, Zhang H, Jang NH, Liedberg B, Mirkin CA. Thermal Desorption Behavior and Binding Properties of DNA Bases and Nucleosides on Gold. *J Am Chem Soc.* 2002; 124(38): 11248-11249.
- Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed M. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev.* 2012; 41(7):2740-2779.
- Englebienne P. 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. *The Analyst.* 1998; 123(7):1599-1603.
- Faraday M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and other metals) to light. *Philos Trans.* 1857; 147:145-181.
- Feduchi Canosa E, Romero Magdalena C, Yáñez Conde E, Blasco Castiñeyra I, García-Hoz Jiménez C. *Bioquímica conceptos esenciales .2ª ed. España: Panamericana; 2015.*
- Freeman R, Grabar K, Allison K, Bright R, Davis J, Guthrie A, et al. Self-assembled metal colloid monolayers: an approach to SERS substrates. *Science.* 1995; 267(5204): 1629–32.
- Freestone I, Meeks N, Sax M, Higgitt C, *The journal of gold science, technology and applications.* *Gold bull.* 2007; 40: 270-277.
- Friederici Muñoz M. *Nanopartículas de Au y Pd: síntesis, funcionalización y aplicaciones catalíticas. [Tesis Doctoral]. Universidad de Barcelona; 2013.*
- Fuentes Rojas J. *Estudio de la interacción directa entre biopolímeros y sistemas metálicos nanodispersos: efecto del protocolo de inmovilización [Máster de estudios avanzados en química]. Universidad de Sevilla; 2014.*
- Gaylord BS, Heeger AJ, Bazan GC. ADN detection using water-soluble conjugated polymers and peptide nucleic acid probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 10954–7.
- Genereux J, Barton J. Mechanisms for DNA Charge Transport. *Chemical Reviews.* 2010; 110(3):1642-1662.
- Giljohann D, Seferos D, Daniel W, Massich M, Patel P, Mirkin C. *Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. Angewandte Chemie International Edition.* 2010; 49(19):3280-3294.
- Guo S, Huang Y, Jiang Q, Sun Y, Deng L, Liang Z, et al. Enhanced gene delivery and siRNA silencing by gold nanoparticles coated with charge-reversal polyelectrolyte. *ACS Nano.* 2010; 4(9): 5505–11.

- Gutierrez Wing C. Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial [Internet]. [consultado el 29 Julio 2016]. Disponible en: <http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/39%20NANOPARTICULAS.pdf>
- Han G, Ghosh P, De M, Rotello V. Drug and gene delivery using gold nanoparticles. *Nanobiotechnology*. 2007; 3(1): 40–5.
- Herne M, Tarlov MJ. Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *J Am Chem Soc*. 1997; 119(38): 8916-8920.
- Hunter R. *Foundations of colloid science*. Oxford: Oxford University Press; 2001.
- Israelachvili JN. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press. 1991.
- Jang NH. The coordination chemistry of DNA nucleosides on gold nanoparticles as a probe by SERS. *Bull. Korean Chem. Soc*. 2002; 23(12): 1790–1800.
- Jiang H, Materon EM, Sotomayor MDPT, Liu J. *J. Colloid Interface Sci*. 2013; 411: 92–97.
- Kimura-Suda H, Petrovykh DY, Tarlov MJ, Whitman LJ. Base-Dependent Competitive Adsorption of Single-Stranded DNA on Gold. *J Am Chem Soc*. 2003; 125(30): 9014-9015.
- Koo K, Sina A, Carrascosa L, Shiddiky M, Trau M. DNA–bare gold affinity interactions: mechanism and applications in biosensing. *Anal Methods*. 2015; 7(17): 7042-7054.
- Koo KM, Sina AAI, Carrascosa LG, Shiddiky MJA, Trau M. eMethylsorb: rapid quantification of DNA methylation in cancer cells on screen-printed gold electrodes. *Analyst*. 2014; 139(23): 6178-6184.
- LaMer V, Dinegar R. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J Am Chem Soc*. 1950; 72(11): 4847-4854.
- Li HX, Rothberg LJ. Colorimetric detection of ADN sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004a; 101(39): 14036–14039.
- Li HX, Rothberg LJ. DNA Sequence Detection Using Selective Fluorescence Quenching of Tagged Oligonucleotide Probes by Gold Nanoparticles. *Anal. Chem*. 2004c; 76(18): 5414-5417.
- Li HX, Rothberg LJ. Label-Free Colorimetric Detection of Specific Sequences in Genomic DNA Amplified by the Polymerase Chain Reaction. *J Am Chem Soc*. 2004b; 126(35): 10958-10961.
- Li Y, Schluesener H, Xu S. Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bulletin*. 2010; 43(1): 29-41.

- Lin YZ, Chang P. Colorimetric Determination of DNA Methylation Based on the Strength of the Hydrophobic Interactions between DNA and Gold Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013; 5(22): 12045-12051.
- Lin YZ, Chang P. Colorimetric Determination of DNA Methylation Based on the Strength of the Hydrophobic Interactions between DNA and Gold Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013; 5(22): 12045-12051.
- Link S, El-Sayed M. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *Int. Rev. Phys. Chem.* 2000; 19(3): 409-453.
- Link S, El-Sayed M. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J Phys Chem. B.* 1999; 103(21): 4212-4217.
- Liu D, Wyttenbach T, Bowers M. Hydration of Mononucleotides. *J Am Chem Soc.* 2006; 128(47): 15155-15163.
- Liu J. Adsorption of DNA onto gold nanoparticles and graphene oxide: surface science and applications. *Phys Chem Chem Phys.* 2012; 14(30): 10485-10496.
- Liz-Marzan L, Nanometals and formation of color. *Materials Today.* 2004; 7(2): 26-31.
- Lorente A, Fernandez MJ .Interacciones no covalentes con el ADN.*An.Quim.*2008; 104(4):280-289.
- Mata Martinez M. Dicroísmo circular [Internet]. [consultado el 30 julio 2016]. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/dicroismocircular2013.pdf>.
- Mirkin C, Letsinger R, Mucic R, Storhoff J. A ADN-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature.* 1996; 382(6592):607-609.
- Murray C, Kagan C, Bawendi MG. Synthesis and Characterization of Monodisperse Nanocrystals and Close-Packed Nanocrystal Assemblies. *Annu. Rev.Mater.Sci.* 2000; 30(1): 545-610.
- Nelson EM, Rothberg LJ. Kinetics and Mechanism of Single-Stranded DNA Adsorption onto Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles in Colloidal Solution. *Langmuir.* 2011; 27(5): 1770-1777.
- Ohyama, T. DNA Conformation and transcriptions. New York: springer, 2005; p.3-9.
- Östblom M, Liedberg B, Demers LM, Mirkin CA. On the Structure and Desorption Dynamics of DNA Bases Adsorbed on Gold: A Temperature-Programmed Study *J. Phys. Chem. B.* 2005; 109(31): 15150-15160.

- Park S, Lytton-Jean A, Lee B, Weigand S, Schatz G, Mirkin C. DNA-programmable nanoparticle crystallization. *Nature*. 2008; 451(7178): 553-556.
- Piana S, Bilic A. The Nature of the Adsorption of Nucleobases on the Gold [111] Surface. *J. Phys. Chem. B*. 2006; 110(46): 23467-23471.
- Primrose SB, Twyman R. Principles of genome analysis and genomics. 3rded. Malden: Blackwell Pub; 2003.
- Quinten M, Kreibig U. Optical properties of aggregates of small metal particles. *Surface Science*. 1986; 172(3): 557-577.
- Quiros I, Yamada M, Kubo K, Mizutani J, Kurihara M, Nishihara H. Preparation of Alkanethiolate-Protected Palladium Nanoparticles and Their Size Dependence on Synthetic Conditions. *Langmuir*. 2002; 18(4): 1413-1418.
- Ratner M, Ratner D. Nanotechnology: a Gentle Introduction to the next big idea. Prentice Hall; 2003.
- Rosi NL, Mirkin CA. Nanostructures in Biodiagnostics. *Chemical Reviews*. 2005; 105(4): 1547-1562.
- Saenger W. Principles of nucleic acid structure. New York: Springer-Verlag; 1984. p. 1–556.
- Sandström P, Boncheva M, Åkerman B. Nonspecific and thiol-specific binding of DNA to gold nanoparticles. *Langmuir* 2003; 19: 7537–43.
- Shaw D. Introduction to colloid and surface chemistry. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd; 1991.
- Sina AAI, Howell S, Carrascosa LG, Rauf S, Shiddiky M, Trau M. eMethylsorb: electrochemical quantification of DNA methylation at CpG resolution using DNA–gold affinity interactions. *Chem Commun*. 2014a; 50(86): 13153-13156.
- Sina AAI, Carrascosa LG, Palanisamy R, Rauf S, Shiddiky MJ, Trau M. Methylsorb: A Simple Method for Quantifying DNA Methylation Using DNA–Gold Affinity Interactions. *Anal. Chem.* 2014b; 86(20): 10179-10185.
- Sinfuentes AB, Melo L, Maza C, Mendes J, Mediavilla M, Brito J et al. Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polímeros estabilizantes. *Quím Nova*. 2010; 33 (6): 1266-1269.
- Sperling R, Parak W. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc.* 2010; 368(1915): 1333-1383.
- Storhoff JJ, Elghanian R, Mirkin CA, Letsinger RL. Sequence-dependent stability of DNA-modified gold nanoparticles. *Langmuir* 2002; 18:6666–70.

- Strekowski L, Wilson B. Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutation Research*. 2007; 623(1-2): 3-13.
- Suh D, Chaires JB. Criteria for the mode of binding of ADN binding agents. *Bioorg. Med. Chem*. 1995; 3:723-728.
- Suzuki M, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*. 2008; 9(6): 465-476.
- Turkevich J, Stevenson P, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc*. 1951; 11:55.
- Wang H, Kou X, Zhang L, Li J. Size-controlled synthesis, microstructure and magnetic properties of Ni nanoparticles. *Materials Research Bulletin*. 2008; 43(12): 3529-3536.
- Wang Z, Petroski J, Green T, El-Sayed M. Shape Transformation and Surface Melting of Cubic and Tetrahedral Platinum Nanocrystals. *J Phys Chem B*. 1998; 102(32): 6145-6151.
- Watson, J. D. *The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of ADN*. London; 1968.
- White KA, Rosi NL. Gold nanoparticle-based assays for the detection of biologically relevant molecules. *Nanomedicine*. 2008; 3(4): 543–53.
- Winter J. Gold nanoparticle biosensors [Internet]. [consultado el 29 julio2016]. Disponible en: <https://leelab.engineering.osu.edu/sites/nsec.osu.edu/files/uploads/WinterGoldNanoparticles.pdf>
- Yang J, Lee J-Y, Deivaraj T-C, Too H-P. Single stranded DNA induced assembly of gold nanopartilces. *Molecular Engineering of Biological and Chemical Systems (MEBCS) Series/Report 2004-01*. <http://hdl.handle.net/1721.1/3949>.
- Zanchet D, Micheel CM, Parak WJ, Gerion D, Alivisatos AP. Electrophoretic isolation of discrete au nanocrystal/ ADN conjugates. *Nano Lett* 2000; 1: 32–5.
- Zhang X, Liu B, Dave N, Servos MR, Liu J. Instantaneous Attachment of an Ultrahigh Density of Nonthiolated DNA to Gold Nanoparticles and Its Applications. *Langmuir*. 2012; 28(49): 17053-17060.
- Zhang X, Servos MR, Liu J. Surface Science of DNA Adsorption onto Citrate-Capped Gold Nanoparticles. *Langmuir*. 2012; 28(8): 3896-3902.

