

NUEVOS GENOSENSORES AMPEROMÉTRICOS

Diseño y Construcción

MEMORIA PRESENTADA POR
MARÍA ISABEL PIVIDORI
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS



Segunda edición
Bellaterra, junio de 2002

La presente tesis doctoral, titulada *"Nuevos genosensores amperométricos. Diseño y construcción"*, ha sido realizada en los laboratorios del Grup de Sensors i Biosensors del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la dirección del profesor Salvador Alegret.

Bellaterra, junio de 2002

Salvador Alegret
Catedrático de Química Analítica

Este trabajo de investigación se ha realizado gracias a las siguientes ayudas institucionales:

Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Madrid.

Proyectos: *"Desarrollo de biosensores y bioinstrumentación analítica basados en biomateriales compuestos"* (BIO 96-0740) y *"Bioinstrumentación avanzada: Biosistemas analíticos integrados, biosensores y sensores biomiméticos aplicados a los campos medioambiental y alimentario"* (BIO2000-0681-C02-01)

Beca para profesores universitarios. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina

La defensa pública de la tesis doctoral se llevó a cabo el día 14 de junio de 2002 en la Universitat Autònoma de Barcelona y fue calificada Excelente Cum Laude.

El tribunal estuvo formado por los siguientes miembros:

Presidente:

Dr. Jordi Barbé García, catedrático de la Universitat Autònoma de Barcelona

Vocal 1:

Víctor Manuel Fernández López, profesor de investigación de la Universidad Autónoma de Madrid

Vocal 2:

Elena Domínguez, catedrática de la Universidad de Alcalá de Henares

Vocal 3:

María Encarnación Lorenzo Abad, profesora titular de la Universidad Autónoma de Madrid

Secretario:

Manel del Valle Zafra, profesor titular de la Universitat Autònoma de Barcelona

a mi madre,
que me quiso tanto como para dejarme partir

Parte del trabajo descrito en la presente Memoria ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

The strategy of renewing biosensor surface: past, present and future. A review

S. Alegret, E. Fàbregas, F. Céspedes, A. Merkoçi, S. Solé, M. Albareda, M. I. Pividori
Química Analítica 1999, 18 (suplem. 1), 109-113

Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods

M. I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret
Biosensors & Bioelectronics 2000, 15, 291-303

Classical dot-blot format implemented as an amperometric hybridisation genosensor

M. I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret
Biosensors & Bioelectronics 2001, 16, 1133-1142

Dot-blot amperometric genosensor for detecting a novel determinant of β -lactamase resistance in Staphylococcus aureus

M. I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret
Analyst 2001, 126, 1551-1557

Graphite-epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing

M. I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret
Biosensors & Bioelectronics. Pendiente de publicación

Rapid electrochemical genosensor assay using a streptavidin-carbon-polymer composite

E. Williams, M. I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret
Biosensors & Bioelectronics. Pendiente de publicación

Electrochemical genosensor system for rapid and specific detection of Salmonella typhimurium

M. I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret, J. Barbé
Analytica Chimica Acta. Pendiente de publicación

ÍNDICE

ABREVIATURAS

xvii

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA MOLÉCULA DE DNA	1
1.1.1 LA MOLÉCULA DE DNA DESDE EL PUNTO DE VISTA ESTRUCTURAL.....	3
1.1.2 LA MOLÉCULA DE DNA DESDE EL PUNTO DE VISTA ANALÍTICO.....	8
1.1.3 LA MOLÉCULA DE DNA DESDE EL PUNTO DE VISTA BIOLÓGICO Y FUNCIONAL.....	11
1.1.3.1 Replicación del DNA.....	11
1.1.3.2 Transcripción del DNA.....	13
1.1.3.3 Traducción.....	16
1.1.4 PROYECTO GENOMA HUMANO.....	17
1.1.4.1 Métodos de secuenciación utilizados.....	18
1.1.4.2 Resultados del Proyecto Genoma Humano.....	18
1.1.4.3 Consecuencias del Proyecto Genoma Humano.....	23
1.2 TÉCNICAS CLÁSICAS DE ANÁLISIS DE DNA	24
1.2.1 MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO. PREPARACIÓN.....	25
1.2.2 AMPLIFICACIÓN DEL DNA. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	27
1.2.3 PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS EN MEMBRANA.....	30
1.2.3.1 Southern blot.....	30
1.2.3.2 Dot (slot)-blot.....	32
1.2.3.3 Dot-blot reverso.....	32
1.2.4 HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN.....	32
1.2.4.1 Marcaje primario o directo.....	33
1.2.4.2 Marcaje compuesto.....	33
1.2.4.3 Formatos analíticos de hibridación.....	34
1.3 NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DEL DNA	37

1.3.1 CHIPS DE DNA.....	37
1.3.1.1 Principios teóricos.....	37
1.3.1.2 Aplicaciones de los chips de DNA.....	39
1.3.1.3 Tipos de chips de DNA.....	39
1.3.1.4 Retos futuros.....	43
1.3.2 LABORATORIOS EN UN CHIP.....	43
1.4 LOS GENOSENSORES: UNA NUEVA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE DNA	46
1.4.1 LOS SENSORES QUÍMICOS.....	46
1.4.2 TÉCNICA AMPEROMÉTRICA.....	47
1.4.2.1 Caracterización de los transductores amperométricos. Voltamperometría cíclica.....	49
1.4.2.2 Materiales utilizados como transductores amperométricos. Composites.....	49
1.4.2.3 Ventajas y desventajas de la técnica amperométrica.....	50
1.4.3 BIOSENSORES.....	51
1.4.4 BIOSENSORES DE DNA: GENOSENSORES.....	52
1.4.4.1 Características principales de los genosensores.....	53
1.4.4.2 Ventajas y limitaciones de los genosensores.....	53
1.4.4.3 Clasificación de los genosensores.....	54
1.4.5 GENOSENSORES ELECTROQUÍMICOS.....	55
1.4.5.1 Metodologías de inmovilización en genosensores electroquímicos.....	55
1.4.5.2 Métodos de detección más utilizados en genosensores electroquímicos.....	61
1.4.5.3 Estudio electroquímico del DNA y de daño en el DNA.....	63
1.4.5.4 Otros tipos de metodologías de detección de DNA.....	64
1.4.6 CAMPOS DE APLICACIÓN DE LOS GENOSENSORES.....	66
1.4.7 PERSPECTIVAS FUTURAS DE LOS GENOSENSORES.....	67
1.5 OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS	69
1.6 BIBLIOGRAFÍA	71

CAPÍTULO 2. CONSTRUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE TRANSDUCTORES AMPEROMÉTRICOS ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE SU UTILIZACIÓN EN LA CONSTRUCCIÓN DE GENOSENSORES

2.1 INTRODUCCIÓN	83
2.1.1 SELECCIÓN DEL TRANSDUCTOR.....	84
2.1.2 INMOVILIZACIÓN DEL DNA.....	85
2.1.3 CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE NUEVOS TRANSDUCTORES BASADOS EN COMPOSITES RÍGIDOS.....	86
2.2 EXPERIMENTAL	87
2.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	87
2.2.1.1 Equipamiento.....	87
2.2.1.2 Reactivos y materiales.....	87
2.2.2 CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA DE CALIBRACIÓN AMPEROMÉTRICA.....	88
2.2.3 CONSTRUCCIÓN DEL CUERPO DEL SENSOR AMPEROMÉTRICO.....	89
2.2.4 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS TRANSDUCTORES ELECTROQUÍMICOS.....	89
2.2.4.1 Condiciones de calibración.....	89
2.2.4.2 Efecto de la agitación.....	90
2.2.4.3 Renovación de la superficie.....	90
2.2.4.4 Pretratamiento de la superficie con ultrasonidos.....	90
2.2.4.5 Observación microscópica de la superficie.....	90
2.2.4.6 Utilización de membranas de diálisis durante la calibración.....	90
2.2.5 COMPOSITE GRAFITO-METACRILATO MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO.....	91
2.2.5.1 Preparación, curado y conservación del composite.....	91
2.2.5.2 Evaluación del transductor grafito-metacrilato modificado con ácido esteárico.....	92
2.2.6 COMPOSITE GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO.....	92
2.2.6.1 Preparación, curado y conservación del composite.....	92
2.2.6.2 Evaluación del transductor grafito-epoxi modificado con ácido esteárico.....	93
2.2.7 COMPOSITE GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON MACROMOLÉCULAS CON	

<i>FUNCIONES CARBOXÍLICAS</i>	93
2.2.7.1 Sensores de composite grafito-epoxi modificado con carboximetilcelulosa.....	93
2.2.7.2 Sensores de composite grafito-epoxi modificado con CM Sephadex C50.....	93
<i>2.2.8 COMPOSITE DE PASTA DE GRAFITO MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO</i>	93
<i>2.2.9 SELECCIÓN DEL TRANSDUCTOR IDÓNEO PARA SU POSIBLE IMPLEMENTACIÓN EN GENOSENSORES CON DNA ADSORBIDO</i>	94
2.2.9.1 Preparación, curado y conservación del composite grafito-metacrilato.....	94
2.2.9.2 Preparación, curado y conservación del composite grafito-epoxi.....	94
<i>2.2.10 TRANSDUCTOR AMPEROMÉTRICO CON MEMBRANA DE NYLON HYBOND™ INTEGRADA A LA SUPERFICIE</i>	95
2.2.10.1 Selección del composite idóneo para la transducción amperométrica.....	95
2.2.10.2 Integración de la membrana de nylon HYBOND™ al transductor grafito-epoxi.....	95
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96
<i>2.3.1 EVALUACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-METACRILATO MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO</i>	96
2.3.1.1 Efecto de la incorporación de ácido esteárico al composite grafito-metacrilato.....	96
2.3.1.2 Efecto del pulido en la superficie del transductor grafito-metacrilato modificado con ácido esteárico.....	97
2.3.1.3 Pretratamiento de la superficie con ultrasonidos.....	97
2.3.1.4 Observación microscópica de la superficie.....	99
<i>2.3.2 EVALUACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO</i>	100
2.3.2.1 Efecto de la incorporación de ácido esteárico al composite grafito-epoxi.....	100
2.3.2.2 Efecto del pulido en la superficie del transductor grafito-epoxi modificado con ácido esteárico.....	100
2.3.2.3 Pretratamiento de la superficie con ultrasonidos.....	101
<i>2.3.3 EVALUACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXY-CARBOXIMETILCELULOSA</i>	103
2.3.3.1 Efecto del pulido en la superficie del transductor grafito-epoxi-carboximetilcelulosa.....	103
2.3.3.2 Observación microscópica de la superficie.....	103
<i>2.3.4 EVALUACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON CM SEPHADEX</i>	104
2.3.4.1 Efecto del pulido en la superficie del transductor grafito-epoxi modificado con CM Sephadex.....	104
<i>2.3.5 EVALUACIÓN DE TRANSDUCTORES DE GRAFITO NO MODIFICADOS PARA SU POSIBLE IMPLEMENTACIÓN EN GENOSENSORES CON DNA ADSORBIDO</i>	104
2.3.5.1 Comparación de las propiedades electroquímicas de distintos transductores rígidos.....	105
2.3.5.2 Observación microscópica de la superficie.....	106
2.3.5.3 Reproducibilidad de la fabricación de los sensores basados en un composite grafito-epoxi.....	107
2.3.5.4 Reproducibilidad del pulido de la superficie del transductor grafito-epoxi.....	108
<i>2.3.6 TRANSDUCTOR AMPEROMÉTRICO CON MEMBRANA DE NYLON HYBOND™ INTEGRADA A LA SUPERFICIE</i>	108
2.3.6.1 Selección del composite idóneo para la transducción amperométrica.....	108
2.3.6.2 Comparación de la respuesta amperométrica de los transductores grafito-epoxi y grafito-epoxi con una membrana de nylon HYBOND™ integrada a la superficie.....	109
2.4 CONCLUSIONES	110
2.5 BIBLIOGRAFÍA	113
CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA PEROXIDASA ESTUDIO DE SU IMPLEMENTACIÓN COMO SISTEMA DE MARCACIÓN EN EL DESARROLLO DE GENOSENSORES.	
EVALUACIÓN DE NUEVOS TRANSDUCTORES ELECTROQUÍMICOS MODIFICADOS QUÍMICAMENTE MEDIANTE LA INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE LA PEROXIDASA	
<hr/>	
3.1 INTRODUCCIÓN	115
3.2 EXPERIMENTAL	117
3.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	117
3.2.2 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA PEROXIDASA.....	118

3.2.2.1 Utilización de agentes mediadores.....	119
3.2.2.2 Caracterización electroquímica del mediador hidroquinona.....	120
3.2.2.3 Evaluación de la estabilidad de la solución de hidroquinona.....	120
3.2.2.4 Evaluación de la respuesta amperométrica de la enzima HRP.....	121
3.2.2.5 Disminución de la sensibilidad del transductor.....	122
3.2.3 INMOVILIZACIÓN SUPERFICIAL COVALENTE DE PEROXIDASA EN COMPOSITES RÍGIDOS MODIFICADOS CON ÁCIDO ESTEÁRICO.....	122
3.2.3.1 Construcción del cuerpo del sensor amperométrico.....	125
3.2.3.2 Preparación, curado y conservación de los composites modificados con ácido esteárico.....	125
3.2.3.3 Procedimiento de inmovilización.....	125
3.2.3.4 Evaluación de la respuesta.....	126
3.2.4 INMOVILIZACIÓN SUPERFICIAL COVALENTE DE PEROXIDASA EN UN TRANSDUCTOR DE PASTA DE CARBONO-ÁCIDO ESTEÁRICO.....	126
3.2.4.1 Construcción del cuerpo del sensor amperométrico.....	126
3.2.4.2 Preparación y conservación del composites.....	126
3.2.4.3 Procedimiento de inmovilización.....	126
3.2.4.4 Evaluación de la respuesta.....	126
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	127
3.3.1 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA PEROXIDASA.....	127
3.3.1.1 Caracterización electroquímica del mediador hidroquinona.....	127
3.3.1.2 Evaluación de la estabilidad de la solución de hidroquinona.....	128
3.3.1.3 Evaluación de la respuesta electroquímica de la enzima HRP.....	129
3.3.2 EVALUACIÓN DE LOS TRANSDUCTORES GRAFITO-EPOXI Y GRAFITO-EPOXI/HYBOND™.....	130
3.3.3 INMOVILIZACIÓN SUPERFICIAL COVALENTE DE PEROXIDASA EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO.....	131
3.3.4 INMOVILIZACIÓN SUPERFICIAL COVALENTE DE PEROXIDASA EN UN COMPOSITE GRAFITO-METACRILATO MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO.....	132
3.3.5 INMOVILIZACIÓN SUPERFICIAL COVALENTE DE PEROXIDASA EN UN SENSOR DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO.....	133
3.4 CONCLUSIONES.....	134
3.5 BIBLIOGRAFÍA.....	136

CAPÍTULO 4. INMOVILIZACIÓN DE DNA EN UNA MEMBRANA DE NYLON INTEGRACIÓN DE LA MEMBRANA DE NYLON MODIFICADA A UN TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI. CONSTRUCCIÓN DE GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO DOT-BLOT

4.1 INTRODUCCIÓN.....	139
4.2 EXPERIMENTAL.....	142
4.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	142
4.2.2 MODIFICACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND™: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN.....	143
4.2.3 INMOVILIZACIÓN DE dT(20)-dG(25) EN MEMBRANA DE NYLON HYBOND™.....	143
4.2.3.1 Evaluación de las metodologías de inmovilización del DNA en nylon.....	144
4.2.3.2 Preparación del DNA que será inmovilizado.....	145
4.2.3.3 Protocolo de inmovilización de dT(20)-dG(25) en las membranas de nylon.....	145
4.2.3.4 Conservación de las membranas de nylon modificadas con el DNA.....	145
4.2.4 TRATAMIENTOS DE PREHIBRIDACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND™ MODIFICADAS CON EL ANALITO.....	145
4.2.4.1 Selección de la solución de prehibridación.....	146
4.2.4.2 Preparación de la solución de prehibridación.....	148
4.2.4.3 Temperatura y tiempo del tratamiento de prehibridación.....	148
4.2.4.4 Agitación durante el tratamiento de prehibridación.....	149
4.2.4.5 Volumen del tratamiento de prehibridación.....	149
4.2.4.6 Protocolo del tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon.....	149
4.2.4.7 Evaluación de la efectividad del tratamiento de prehibridación.....	149

4.2.5 HIBRIDACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND™ MODIFICADAS CON EL ANALITO.....	149
4.2.5.1 Selección de la solución de hibridación.....	150
4.2.5.2 Preparación de la solución de hibridación.....	152
4.2.5.3 Temperatura y tiempo de hibridación.....	153
4.2.5.4 Agitación durante la hibridación.....	153
4.2.5.5 Volumen de hibridación.....	154
4.2.5.6 Lavados posthibridación.....	154
4.2.5.7 Preparación de la sonda biotinilada.....	155
4.2.5.8 Protocolo de hibridación del analito soportado en las membranas de nylon.....	155
4.2.5.9 Evaluación de la hibridación.....	155
4.2.6 MARCACIÓN ENZIMÁTICA POSTHIBRIDACIÓN.....	155
4.2.6.1 Selección de la solución bloqueante para la marcación enzimática.....	156
4.2.6.2 Composición de la solución bloqueante.....	156
4.2.6.3 Temperatura y tiempo de premarcación con solución bloqueante.....	156
4.2.6.4 Temperatura y tiempo de marcación enzimática.....	156
4.2.6.5 Agitación durante la marcación enzimática.....	156
4.2.6.6 Volumen de marcación enzimática.....	157
4.2.6.7 Lavados postmarcación enzimática.....	157
4.2.6.8 Preparación del complejo HRP-estreptavidina.....	158
4.2.6.9 Protocolo de marcación enzimática posthibridación.....	158
4.2.7 INTEGRACIÓN AL TRANSDUCTOR DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS.....	158
4.2.8 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES.....	159
4.2.9 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PREPARACIÓN DEL GENOSENSOR.....	160
4.2.9.1 Protocolo de preparación de las membranas "genosensoras".....	160
4.2.9.2 Protocolo de preparación de las membranas "blanco".....	160
4.2.9.3 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los genosensores.....	161
4.2.10 CANTIDAD DE dT(20)-dG(25) INMOVILIZADA EN LA MEMBRANA.....	161
4.2.11 CANTIDAD DE dA(20)-biotina EN LA SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN.....	162
4.2.12 CANTIDAD DE HRP-ESTREPTAVIDINA EN LA SOLUCIÓN BLOQUEANTE.....	163
4.2.13 EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN INESPECÍFICA.....	164
4.2.13.1 Preparación de las membranas.....	165
4.2.13.2 Diseño del experimento.....	166
4.2.13.3 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los sensores.....	166
4.2.14 ANÁLISIS DE INTERFERENCIAS.....	168
4.2.14.1 Protocolo de preparación de las membranas.....	168
4.2.14.2 Diseño del experimento.....	169
4.2.14.3 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los genosensores.....	169
4.2.15 EVALUACIÓN DE LA VARIABLE EXPERIMENTAL QUE DETERMINA LA REPRODUCIBILIDAD Y EL ERROR ANALÍTICO.....	170
4.2.16 REPRODUCIBILIDAD DE ENSAYOS IDÉNTICOS REALIZADOS EN DÍAS DIFERENTES.....	170
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	171
4.3.1 CANTIDAD DE dT(20)-dG(25) INMOVILIZADA EN LA MEMBRANA.....	171
4.3.2 CANTIDAD DE SONDA BIOTINILADA EN LA SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN.....	172
4.3.3 CANTIDAD DE HRP-ESTREPTAVIDINA EN LA SOLUCIÓN BLOQUEANTE.....	173
4.3.4 EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN INESPECÍFICA.....	177
4.3.5 ANÁLISIS DE INTERFERENCIAS.....	179
4.3.6 EVALUACIÓN DE LA VARIABLE EXPERIMENTAL QUE DETERMINA LA REPRODUCIBILIDAD Y EL ERROR ANALÍTICO.....	180
4.3.7 REPRODUCIBILIDAD DE ENSAYOS IDÉNTICOS REALIZADOS EN DÍAS DIFERENTES.....	181
4.4 CONCLUSIONES.....	182
4.5 BIBLIOGRAFÍA.....	184
APÉNDICE A - CAPÍTULO 4. CONSTRUCCIÓN DE UN GENOSENSOR DE MEMBRANA RECAMBIABLES EN FORMATO COMPETITIVO	
4A.1 INTRODUCCIÓN.....	187
4A.2 EXPERIMENTAL.....	190

4A.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	190
4A.2.1.1 Equipamiento.....	190
4A.2.1.2 Reactivos y materiales.....	190
4A.2.2 MODIFICACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND™: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN.....	191
4A.2.2.1 Inmovilización de dT(20)-dG(25) en la membrana de nylon HYBOND™.....	191
4A.2.2.2 Tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™.....	192
4A.2.2.3 Hibridación de las membranas de nylon HYBOND™.....	193
4A.2.2.4 Marcación enzimática posthibridación.....	194
4A.2.3 INTEGRACIÓN AL TRANSDUCTOR DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS.....	196
4A.2.4 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES.....	196
4A.2.5 PREPARACIÓN DEL GENOSENSOR DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO COMPETITIVO.....	196
4A.2.5.1 Protocolo de preparación de las membranas "genosensoras".....	198
4A.2.5.2 Protocolo de preparación de las membranas "controles".....	198
4A.2.5.3 Protocolo de preparación de las membranas "blanco".....	199
4A.2.5.4 Integración al transductor y evaluación de los genosensores.....	200
4A.2.5.5 Diseño del experimento en formato competitivo.....	201
4A.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	201
4A.4 CONCLUSIONES	204
4A.5 BIBLIOGRAFÍA	205

APÉNDICE B - CAPÍTULO 4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

4B.1 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PARA LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS NETAS	207
4B.1.1 CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.....	207
4B.1.2 DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA.....	208
4B.1.3 PRUEBA F PARA LA COMPARACIÓN DE DESVIACIONES ESTÁNDAR.....	208
4B.1.4 COMPARACIÓN DE LOS VALORES MEDIOS DE DOS GRUPOS DE DATOS CON VARIANZAS COMPARABLES.....	209
4B.1.4.1 Estimación conjunta de la desviación estándar.....	209
4B.1.4.2 Prueba t de comparación de los valores medios de dos grupos de datos con varianzas comparables.....	209
4B.1.4.3 Cálculo de los grados de libertad.....	210
4B.1.4.4 Mínimo nivel de significación de la señal de los genosensores.....	211
4B.1.5 COMPARACIÓN DE LOS VALORES MEDIOS DE DOS GRUPOS DE DATOS CON VARIANZAS NO COMPARABLES.....	211
4B.1.5.1 Prueba t de comparación de los valores medios de dos grupos de datos con varianzas no comparables.....	211
4B.1.5.2 Cálculo de los grados de libertad.....	212
4B.1.5.3 Mínimo nivel de significación de la señal de los genosensores.....	213
4B.2 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PARA LAS SEÑALES DE HIBRIDACIÓN	213
4B.2.1 CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.....	213
4B.2.2 COMPARACIÓN DE LOS VALORES MEDIOS OBTENIDOS POR DIFERENCIA DE DOS GRUPOS DE DATOS.....	214
4B.2.2.1 Estimación conjunta de la desviación estándar.....	214
4B.2.2.2 Prueba t de comparación de la señal de hibridación de dos grupos de datos.....	214
4B.2.2.3 Cálculo de los grados de libertad para la comparación de la señal de hibridación de dos grupos de datos.....	215
4B.2.2.4 Mínimo nivel de significación de una señal de hibridación respecto a otra.....	215
4B.3 TABLAS ESTADÍSTICAS	216
4B.4 BIBLIOGRAFÍA	217

CAPÍTULO 5. CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO DE MEMBRANAS RECAMIABLES EN FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO SIMPLE Y DOBLE
DETERMINACIÓN DE UN NUEVO DETERMINANTE DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

5.1 INTRODUCCIÓN	219
5.2 EXPERIMENTAL	222
5.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	222
5.2.2 MODIFICACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND™: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN	224
5.2.2.1 Inmovilización del oligonucleótido determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos en la membrana de nylon HYBOND™.....	224
5.2.2.2 Tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el analito.....	225
5.2.2.3 Hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el analito.....	226
5.2.2.4 Marcación enzimática posthibridación.....	228
5.2.3 INTEGRACIÓN AL TRANSDUCTOR DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS.....	229
5.2.4 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES.....	230
5.2.5 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMIABLES EN FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO SIMPLE.....	230
5.2.5.1 Protocolo de preparación de las membranas "genosensoras".....	231
5.2.5.2 Protocolo de preparación de las membranas "blanco".....	232
5.2.5.3 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los biosensores.....	233
5.2.5.4 Diseño del experimento en formato de reconocimiento simple.....	233
5.2.6 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMIABLES EN FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO DOBLE.....	234
5.2.6.1 Protocolo de preparación de las membranas "genosensoras".....	235
5.2.6.2 Protocolo de preparación de las membranas "blanco".....	235
5.2.6.3 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los biosensores.....	236
5.2.6.4 Diseño del experimento en formato de reconocimiento doble.....	237
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	238
5.3.1 GENOSENSORES DE RECONOCIMIENTO SIMPLE.....	238
5.3.2 GENOSENSORES DE RECONOCIMIENTO DOBLE.....	240
5.3.3 COMPARACIÓN DE LA SEÑAL DE HIBRIDACIÓN DE LOS FORMATOS DE RECONOCIMIENTO SIMPLE Y DOBLE.....	241
5.3.4 EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN INESPECÍFICA.....	242
5.4 CONCLUSIONES	243
5.5 BIBLIOGRAFÍA	245

CAPÍTULO 6. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO DE MEMBRANAS RECAMIABLES DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE EN DIFERENTES FORMATOS
ESTUDIO DE LA CONSERVACIÓN DE LAS MEMBRANAS GENOSENSORAS

6.1 INTRODUCCIÓN	247
6.2 EXPERIMENTAL	250
6.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	250
6.2.2 MODIFICACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND™: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN.....	251
6.2.2.1 Inmovilización del poli(dA) en la membrana de nylon HYBOND™.....	252
6.2.2.2 Conservación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con DNA.....	252

6.2.2.3 Tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con DNA.....	252
6.2.2.4 Hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con DNA.....	253
6.2.2.5 Marcación enzimática posthibridación.....	255
6.2.2.6 Procedimiento de hibridación y de marcación enzimática en un solo paso de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el DNA analito.....	257
6.2.3 INTEGRACIÓN AL TRANSDUCTOR DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS.....	259
6.2.4 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES.....	259
6.2.5 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE.....	260
6.2.5.1 Protocolo de preparación de las membranas "genosensoras".....	261
6.2.5.2 Protocolo de preparación de las membranas "blanco".....	261
6.2.5.3 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los genosensores.....	262
6.2.5.4 Diseño del experimento en formato dot-blot de reconocimiento múltiple.....	262
6.2.6 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO COMPETITIVO DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE.....	263
6.2.6.1 Protocolo de preparación de las membranas "genosensoras".....	263
6.2.6.2 Protocolo de preparación de las membranas "controles".....	263
6.2.6.3 Protocolo de preparación de las membranas "blanco".....	264
6.2.6.4 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los genosensores.....	265
6.2.6.5 Diseño del experimento en formato competitivo de reconocimiento múltiple.....	265
6.2.7 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES EN FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE EN UN SOLO PASO.....	266
6.2.7.1 Protocolo de preparación de las membranas "genosensoras".....	266
6.2.7.2 Protocolo de preparación de las membranas "blanco".....	266
6.2.7.3 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los genosensores.....	267
6.2.7.4 Diseño del experimento en formato dot-blot de reconocimiento múltiple en un solo paso.....	268
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	268
6.3.1 GENOSENSORES EN FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE.....	268
6.3.2 CONSERVACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON MODIFICADAS CON DNA.....	270
6.3.3 GENOSENSORES EN FORMATO COMPETITIVO DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE.....	272
6.3.4 FORMATO DOT-BLOT DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE EN UN SOLO PASO.....	275
6.4 CONCLUSIONES.....	276
6.5 BIBLIOGRAFÍA.....	278
CAPÍTULO 7. DESARROLLO DE UN NUEVO GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO DE MEMBRANAS RECAMBIABLES BASADO EN UN SISTEMA DE MARCACIÓN ENZIMÁTICA ACOPLADA A UNA REACCIÓN INMUNOLÓGICA	
<hr/>	
7.1 INTRODUCCIÓN.....	279
7.2 EXPERIMENTAL.....	282
7.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	282
7.2.2 MODIFICACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN.....	283
7.2.2.1 Inmovilización de poli(dA) (analito) en la membrana de nylon HYBOND™.....	283
7.2.2.2 Tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el analito.....	284
7.2.2.3 Hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el analito.....	285
7.2.2.4 Marcación enzimática posthibridación.....	286
7.2.3 INTEGRACIÓN AL TRANSDUCTOR DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS.....	289
7.2.4 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES.....	290
7.2.5 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PREPARACIÓN DEL GENOSENSOR.....	290
7.2.5.1 Protocolo de preparación de las membranas "genosensoras".....	292
7.2.5.2 Protocolo de preparación de las membranas "blanco".....	292
7.2.5.3 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los genosensores.....	293
7.2.5.4 Diseño del experimento. Variación de las cantidades de antiDIG-HRP.....	293
7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	294

7.4 CONCLUSIONES	298
-------------------------	------------

7.5 BIBLIOGRAFÍA	299
-------------------------	------------

**CAPÍTULO 8. APLICACIÓN DEL GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO DE MEMBRANAS
RECAMBIABLES EN FORMATO DOT-BLOT A UNA MUESTRA REAL
DETERMINACIÓN DE *SALMONELLA* SP**

8.1 INTRODUCCIÓN	301
-------------------------	------------

8.2 EXPERIMENTAL	305
-------------------------	------------

8.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	305
-------------------------------------	-----

8.2.2 PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA GÉNICA IS200 MEDIANTE PCR.....	307
---	-----

8.2.2.1 Preenriquecimiento de la bacteria <i>Salmonella</i>	307
---	-----

8.2.2.2 Extracción del DNA cromosómico de las <i>Salmonella</i>	307
---	-----

8.2.2.3 Electroforesis del DNA cromosómico.....	308
---	-----

8.2.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	309
---	-----

8.2.2.5 Electroforesis del amplicón.....	310
--	-----

8.2.2.6 Purificación de la banda obtenida.....	310
--	-----

8.2.2.7 Preparación del amplicón purificado para su utilización en el genosensor.....	310
---	-----

8.2.3 MODIFICACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NYLON HYBOND: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN.....	310
---	-----

8.2.3.1 Inmovilización del amplicón en la membrana de nylon HYBOND™.....	311
--	-----

8.2.3.2 Tratamiento de prehibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el amplicón.....	311
--	-----

8.2.3.3 Hibridación de las membranas de nylon HYBOND™ modificadas con el amplicón.....	312
--	-----

8.2.3.4 Marcación enzimática posthibridación.....	313
---	-----

8.2.4 INTEGRACIÓN AL TRANSDUCTOR DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS.....	314
--	-----

8.2.5 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES.....	315
---	-----

8.2.6 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES PARA LA DETECCIÓN DEL AMPLICÓN IS200.....	315
---	-----

8.2.6.1 Protocolo de preparación de las membranas "genosensoras".....	316
---	-----

8.2.6.2 Protocolo de preparación de las membranas "blanco".....	316
---	-----

8.2.6.3 Integración al transductor de las membranas modificadas y evaluación de los genosensores	317
--	-----

8.2.6.4 Diseño del experimento de detección del amplicón IS200.....	318
---	-----

8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	319
-----------------------------------	------------

8.3.1 EXTRACCIÓN DEL DNA CROMOSÓMICO DE LA BACTERIA <i>SALMONELLA</i>	319
---	-----

8.3.2 PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA IS200 MEDIANTE PCR.....	319
--	-----

8.3.3 PURIFICACIÓN DEL AMPLICÓN.....	319
--------------------------------------	-----

8.3.4 GENOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DEL AMPLICÓN IS200.....	320
--	-----

8.4 CONCLUSIONES	321
-------------------------	------------

8.5 BIBLIOGRAFÍA	323
-------------------------	------------

**CAPÍTULO 9. INMOVILIZACIÓN DE DNA SOBRE SUPERFICIES GRAFITO-POLÍMERO
DESARROLLO DE UN GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO DE RECONOCIMIENTO MÚLTIPLE**

9.1 INTRODUCCIÓN	325
-------------------------	------------

9.2 EXPERIMENTAL	328
-------------------------	------------

9.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	328
-------------------------------------	-----

9.2.2 MODIFICACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN.....	329
--	-----

9.2.2.1 Inmovilización del poli(dA) en un composite grafito-epoxi.....	329
--	-----

9.2.2.2 Tratamiento de prehibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el analito.....	330
--	-----

9.2.2.3 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el analito.....	331
--	-----

9.2.2.4 Marcación enzimática posthibridación.....	333
---	-----

9.2.3 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES.....	335
9.2.4 PREPARACIÓN DE LOS GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI..	335
9.2.4.1 Protocolo de preparación de los biosensores.....	336
9.2.4.2 Protocolo de preparación de los sensores blanco.....	336
9.2.4.3 Evaluación de los biosensores.....	337
9.2.5 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA PREPARACIÓN DE LOS GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI.....	338
9.2.5.1 Eficacia del tratamiento de prehibridación y de premarcación con solución bloqueante.....	339
9.2.5.2 Tiempo de hibridación. Diseño del experimento.....	341
9.2.5.3 Cantidad de analito inmovilizado en el transductor grafito-epoxi. Diseño del experimento.....	342
9.2.5.4 Cantidad de conjugado enzimático. Diseño del experimento.....	342
9.2.5.5 Tiempo del procedimiento de marcación enzimática. Diseño del experimento.....	343
9.2.5.6 Tiempo del procedimiento de inmovilización. Diseño del experimento.....	344
9.2.5.7 Cantidad de sonda funcionalizada con biotina. Diseño del experimento.....	345
9.2.5.8 Evaluación de interferencias: estudio de las interacciones del conjugado enzimático con el composite grafito-epoxi modificado con DNA de distinto origen. Diseño del experimento.....	346
9.2.5.9 Evaluación de interferencias: estudio de la hibridación inespecifica entre DNA de distinto origen inmovilizado y sonda funcionalizada con biotina. Diseño del experimento.....	347
9.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	348
9.3.1 COMPARACIÓN DE GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMIABLES Y GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI.....	348
9.3.2 UTILIDAD DEL TRATAMIENTO DE PREHIBRIDACIÓN Y DE PREMARCACIÓN.....	353
9.3.3 TIEMPO DE HIBRIDACIÓN.....	355
9.3.4 CANTIDAD DE ANALITO INMOVILIZADO EN EL TRANSDUCTOR.....	356
9.3.5 CANTIDAD DE HRP-ESTREPTAVIDINA EN LA SOLUCIÓN BLOQUEANTE.....	357
9.3.6 TIEMPO DEL PROCEDIMIENTO DE MARCACIÓN ENZIMÁTICA.....	359
9.3.7 TIEMPO DEL PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN.....	361
9.3.8 CANTIDAD DE Sonda funcionalizada con biotina.....	362
9.3.9 EVALUACIÓN DE INTERFERENCIAS: ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DEL CONJUGADO ENZIMÁTICO CON EL COMPOSITE GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON DNA DE DISTINTO ORIGEN.....	363
9.3.10 EVALUACIÓN DE INTERFERENCIAS: ESTUDIO DE LA HIBRIDACIÓN INESPECÍFICA ENTRE DNA DE DISTINTO ORIGEN INMOVILIZADO EN EL COMPOSITE GRAFITO-EPOXI Y Sonda funcionalizada con biotina.....	364
9.4 CONCLUSIONES	365
9.5 BIBLIOGRAFÍA	367

APÉNDICE A - CAPÍTULO 9. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

DEFINICIÓN E INTERPRETACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.

ESTUDIO DE LOS EFECTOS E INTERACCIONES DE LAS PRINCIPALES VARIABLES IMPLICADAS EN LA CONSTRUCCIÓN DE GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI

9A.1 INTRODUCCIÓN	369
9A.2 EXPERIMENTAL	370
9A.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	370
9A.2.2 DISEÑO DEL EXPERIMENTO.....	371
9A.2.2.1 Codificación y construcción del diseño. Determinación del dominio experimental de cada variable.....	371
9A.2.2.2 Construcción de la matriz del diseño de experimentos.....	372
9A.2.3 REALIZACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS: MODIFICACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA.....	373
9A.2.3.1 Inmovilización de poli(dA) en un composite grafito-epoxi.....	374
9A.2.3.2 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el analito.....	374
9A.2.3.3 Marcación enzimática posthibridación.....	374
9A.2.3.4 Preparación de los biosensores basados en un composite grafito-epoxi.....	375
9A.2.3.5 Evaluación de los biosensores.....	376

9A.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	377
9A.3.1 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EN LA SEÑAL DE HIBRIDACIÓN.....	377
9A.3.1.1 Modelo 1.....	379
9A.3.1.2 Modelo 2.....	381
9A.3.1.3 Modelo 3.....	384
9A.3.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EN LA SEÑAL DEBIDA A LA ADSORCIÓN INESPECÍFICA.....	387
9A.3.2.1 Modelo 1.....	388
9A.4 CONCLUSIONES	390
9A.5 BIBLIOGRAFÍA	392

APÉNDICE B - CAPÍTULO 9. VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE MARCACIÓN BASADO EN LA UNIÓN BIOTINA-ESTREPTAVIDINA

ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA POR LA PRESENCIA DE BIOTINA EN LA MUESTRA DE DNA INMOVILIZADA SOBRE UNA SUPERFICIE GRAFITO-POLÍMERO

9B.1 INTRODUCCIÓN	393
9B.2 EXPERIMENTAL	395
9B.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	395
9B.2.2 MODIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI.....	396
9B.2.2.1 Inmovilización de poli(dA) en un composite grafito-epoxi.....	396
9B.2.2.2 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el analito.....	397
9B.2.2.3 Marcación enzimática posthibridación.....	397
9B.2.2.4 Preparación de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi.....	398
9B.2.2.5 Evaluación de los genosensores.....	400
9B.2.3 EVALUACIÓN DE LA INTERFERENCIA DE LA BIOTINA EN LA MUESTRA DE DNA. DISEÑO DEL EXPERIMENTO.....	400
9B.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	402
9B.4 CONCLUSIONES	403
9B.5 BIBLIOGRAFÍA	404

APÉNDICE C - CAPÍTULO 9. DETECCIÓN DE LA SEÑAL DE HIBRIDACIÓN MEDIANTE UN AMPERÍMETRO PORTÁTIL

9C.1 INTRODUCCIÓN	405
9C.2 EXPERIMENTAL	406
9C.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	406
9C.2.2 MODIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI.....	407
9C.2.2.1 Inmovilización de poli(dA) en un composite grafito-epoxi.....	407
9C.2.2.2 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el analito.....	408
9C.2.2.3 Marcación enzimática posthibridación.....	408
9C.2.2.4 Preparación de los genosensores basados en un composite grafito-epoxi.....	408
9C.2.2.5 Evaluación de los genosensores.....	410
9C.2.3 EVALUACIÓN DE LA SEÑAL DE HIBRIDACIÓN MEDIANTE UN AMPERÍMETRO PORTÁTIL.....	410
9C.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	412

9C.4 CONCLUSIONES	415
--------------------------	------------

9C.5 BIBLIOGRAFÍA	416
--------------------------	------------

**CAPÍTULO 10. CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO EN UN FORMATO DE CAPTURA
DETECCIÓN DE DNA INMOVILIZADO SOBRE UNA SUPERFICIE GRAFITO-POLÍMERO Y
DETERMINACIÓN DE UN NUEVO DETERMINANTE DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS
EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

10.1 INTRODUCCIÓN	417
--------------------------	------------

10.2 EXPERIMENTAL	422
--------------------------	------------

10.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	422
--------------------------------------	-----

10.2.2 PREPARACIÓN DEL GENOSENSOR.....	423
--	-----

10.2.3 MODIFICACIÓN DEL GENOSENSOR: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN.....	424
--	-----

10.2.3.1 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con la sonda de captura.....	424
--	-----

10.2.3.2 Marcación enzimática posthibridación.....	426
--	-----

10.2.4 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES.....	427
--	-----

10.2.5 OPTIMIZACIÓN DE LOS GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI EN FORMATO DE CAPTURA.....	427
---	-----

10.2.5.1 Protocolo de modificación de los biosensores en formato de captura secuencial.....	428
---	-----

10.2.5.2 Protocolo de modificación de los biosensores en formato de captura en un paso.....	428
---	-----

10.2.5.3 Protocolo de preparación de los sensores blanco.....	429
---	-----

10.2.5.4 Evaluación de los biosensores.....	430
---	-----

10.2.5.5 Diseño del experimento en un formato de captura secuencial.....	430
--	-----

10.2.5.6 Diseño del experimento en un formato de captura en un paso.....	431
--	-----

10.2.5.7 Cantidad de analito en la solución de hibridación en un formato de captura en un paso. Diseño del experimento.....	432
--	-----

10.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	433
------------------------------------	------------

10.3.1 GENOSENSORES EN FORMATO DE CAPTURA SECUENCIAL.....	433
---	-----

10.3.2 GENOSENSORES EN FORMATO DE CAPTURA EN UN PASO.....	435
---	-----

10.3.3 CANTIDAD DE ANALITO EN LA SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN EN UN FORMATO DE CAPTURA EN UN PASO.....	438
--	-----

10.3.4 COMPARACIÓN DEL FORMATO DE RECONOCIMIENTO SIMPLE (EN EL CUAL SE INMOVILIZA EL ANALITO EN EL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI) Y DEL FORMATO DE CAPTURA EN UN PASO (ANALITO EN SOLUCIÓN).....	441
--	-----

10.3.5 COMPARACIÓN DEL FORMATO DE RECONOCIMIENTO DOBLE MEDIANTE UN GENOSENSOR DE MEMBRANAS RECAMBIABLES Y DEL FORMATO DE CAPTURA EN UN PASO MEDIANTE UN GENOSENSOR BASADO EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI.....	443
--	-----

10.4 CONCLUSIONES	446
--------------------------	------------

10.5 PERSPECTIVAS FUTURAS	448
----------------------------------	------------

10.6 BIBLIOGRAFÍA	450
--------------------------	------------

**CAPÍTULO 11. DETECCIÓN DE DNA INMOVILIZADO SOBRE UNA SUPERFICIE GRAFITO-POLÍMERO MEDIANTE UN NUEVO SISTEMA DE MARCACIÓN ENZIMÁTICA PARA LA
DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA BASADA EN UNA REACCIÓN INMUNOLÓGICA**

11.1 INTRODUCCIÓN	453
--------------------------	------------

11.2 EXPERIMENTAL	455
11.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	455
11.2.2 MODIFICACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN.....	456
11.2.2.1 Inmovilización de poli(dA) en un composite grafito-epoxi.....	457
11.2.2.2 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el analito.....	457
11.2.2.3 Marcación enzimática posthibridación.....	458
11.2.3 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES.....	460
11.2.4 PREPARACIÓN DE LOS GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI CON UN NUEVO SISTEMA DE MARCACIÓN ENZIMÁTICA BASADA EN UNA REACCIÓN INMUNOLÓGICA.....	460
11.2.4.1 Protocolo de preparación de los genosensores.....	461
11.2.4.2 Protocolo de preparación de los sensores blanco.....	461
11.2.4.3 Evaluación de los genosensores.....	462
11.2.4.4 Diseño del experimento. Variación de las cantidades de antiDIG-HRP.....	463
11.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	464
11.3.1 VARIACIÓN DE LAS CANTIDADES DE ANTIDIG-HRP.....	464
11.3.2 COMPARACIÓN DE LOS GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI Y DE LOS GENOSENSORES DE MEMBRANAS RECAMBIABLES CON UN NUEVO SISTEMA DE MARCACIÓN BASADA EN UNA REACCIÓN INMUNOLÓGICA.....	466
11.3.3 COMPARACIÓN DE LOS SISTEMAS DE MARCACIÓN ENZIMÁTICA BASADOS EN UNA REACCIÓN INMUNOLÓGICA Y EN LA REACCIÓN BIOTINA-ESTREPTAVIDINA.....	468
11.4 CONCLUSIONES	471
11.5 PERSPECTIVAS FUTURAS	472
11.6 BIBLIOGRAFÍA	474
CAPÍTULO 12. DETERMINACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SP MEDIANTE PCR Y DETECCIÓN DEL AMPLICÓN POR INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN SOBRE LA SUPERFICIE GRAFITO-EPOXI DE UN GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO	
OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DESHIBRIDIZANTE DEL ANALITO	
12.1 INTRODUCCIÓN	475
12.2 EXPERIMENTAL	478
12.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS.....	478
12.2.2 PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA GÉNICA IS200 MEDIANTE PCR.....	479
12.2.3 MODIFICACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI: HIBRIDACIÓN Y MARCACIÓN.....	480
12.2.3.1 Inmovilización de amplicón en un composite grafito-epoxi.....	480
12.2.3.2 Tratamiento deshibridizante del amplicón inmovilizado en el composite grafito-epoxi.....	481
12.2.3.3 Hibridación del transductor grafito-epoxi modificado con el amplicón.....	482
12.2.3.4 Marcación enzimática posthibridación.....	483
12.2.4 EVALUACIÓN DE LOS GENOSENSORES.....	484
12.2.5 PREPARACIÓN DE LOS GENOSENSORES BASADOS EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI PARA LA DETECCIÓN DEL AMPLICÓN IS200.....	484
12.2.5.1 Protocolo de preparación de los genosensores.....	485
12.2.5.2 Protocolo de preparación de los sensores blanco.....	486
12.2.5.3 Evaluación de los genosensores.....	486
12.2.5.4 Eficacia del tratamiento deshibridizante. Diseño del experimento.....	487
12.2.5.5 Diseño del experimento de detección del amplicón IS200.....	488
12.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	489
12.3.1 EFICACIA DEL TRATAMIENTO DESHIBRIDIZANTE.....	489
12.3.2 PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA GÉNICA IS200 MEDIANTE PCR.....	491
12.3.3 GENOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DEL AMPLICÓN IS200.....	491

12.4 CONCLUSIONES 494

12.5 BIBLIOGRAFÍA 496

**RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES.
PERSPECTIVAS FUTURAS DEL PRESENTE TRABAJO 499**

GLOSARIO 505

ABREVIATURAS

§	apartado	NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
A	adenina	pb	pares de bases
antiDIG-HRP	anticuerpo antidigoxigenina conjugado con peroxidasa	PBP	proteína aceptora de penicilina
APTES	3-aminopropiltrietoxisilano	PBS	solución de fosfato sódico y NaCl, pH 7.2
BAC	cromosomas artificiales bacterianos	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
bpy	bipiridina	PGH	Proyecto Genoma Humano
BSA	seroalbúmina bovina	phen	1,10-fenantrolina
C	citosa	PM	peso molecular
C	concentración	PNA	ácido nucleico peptídico
CDI	N-ciclohexil-N'-[2-(N-metilmorfolin)-etil]-carbodiimida-4-toluen sulfonato	p/p	relación peso/peso
cDNA	DNA complementario	p/v	relación peso/volumen
CPSA	del inglés constant current chronopotentiometric stripping analysis	RFLP	fragmentos de restricción de longitud variable
DFC	diseño factorial completo	RNA	ácido ribonucleico
DIG	digoxigenina	rRNA	RNA ribosomal
DNA	ácido desoxirribonucleico	SDS	dodecilsulfato de sodio
dmphen	dimetil-1,10-fenantrolina	SNP	polimorfismo de nucleótidos simples
dsDNA	doble hebra de ácido desoxirribonucleico	SPH	secuenciación por hibridación
E	potencial electroquímico	S/R	cociente entre el valor medio de los genosensores y el valor medio de la señal de sus correspondientes blancos
EB	bromuro de etidio	SSC	solución de citrato sódico y NaCl, pH 7
EDC	1-[3-(dimetilamino)-propil]-3-etilcarbodiimida	ssDNA	hebra simple de ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	T	timina
G	guanina	TAAB	tetrabenzo-[b,f,j,n][1,5,9,13]-tetra-azaciclohexadecina
Gb	gigabases	T _m	temperatura de fusión (del DNA)
HRP	peroxidasa de rábano picante	tppz	tetra-2-piridil-1,4-pirazina
I	intensidad de corriente	tRNA	RNA de transferencia
MCH	mercaptohexanol	U	uracilo
mRNA	RNA mensajero	VNTR	número variable de repeticiones en tandem
n	número de experiencias	v/v	relación volumen/volumen
nA	nanoamperio		

INTRODUCCIÓN

1.1 LA MOLÉCULA DE DNA

En el año 1866 Gregor Mendel explicó cuantitativamente las leyes de la herencia ^{1,2} y describió su unidad funcional, el *gen* *, justificando así la observación de que las características de un individuo se transmitieran a su descendencia siguiendo unas pautas determinadas, mediante reglas estadísticas confiables ^{3,4}.

En su trabajo se hablaba de factores hereditarios por lo que hoy en día se conoce con el nombre de genes, y a cada una de las variantes de un mismo gen las denominó *alelos* *.

A finales del siglo XIX y principios del XX, la observación microscópica de los *cromosomas* * durante la división celular y su conexión con ciertos hechos hereditarios sugirió que las bases moleculares de la herencia se encontraban en el núcleo celular. Así, se enunció la teoría cromosómica de la herencia, que establece que ^{3,4}:

- 1) Los genes se encuentran situados en los cromosomas.
- 2) Los genes se encuentran dispuestos linealmente sobre los cromosomas, en posiciones determinadas en los mismos (*loci* *).
- 3) Entre la recombinación de los genes y el intercambio de los segmentos de cromosomas hay una estrecha relación.

* Los vocablos que aparecen con un asterisco se definen en un glosario al final de la tesis

El grupo completo de instrucciones codificadas necesarias para producir un organismo vivo y para programar sus actividades para toda su vida se denomina genoma (Figura 1.1).

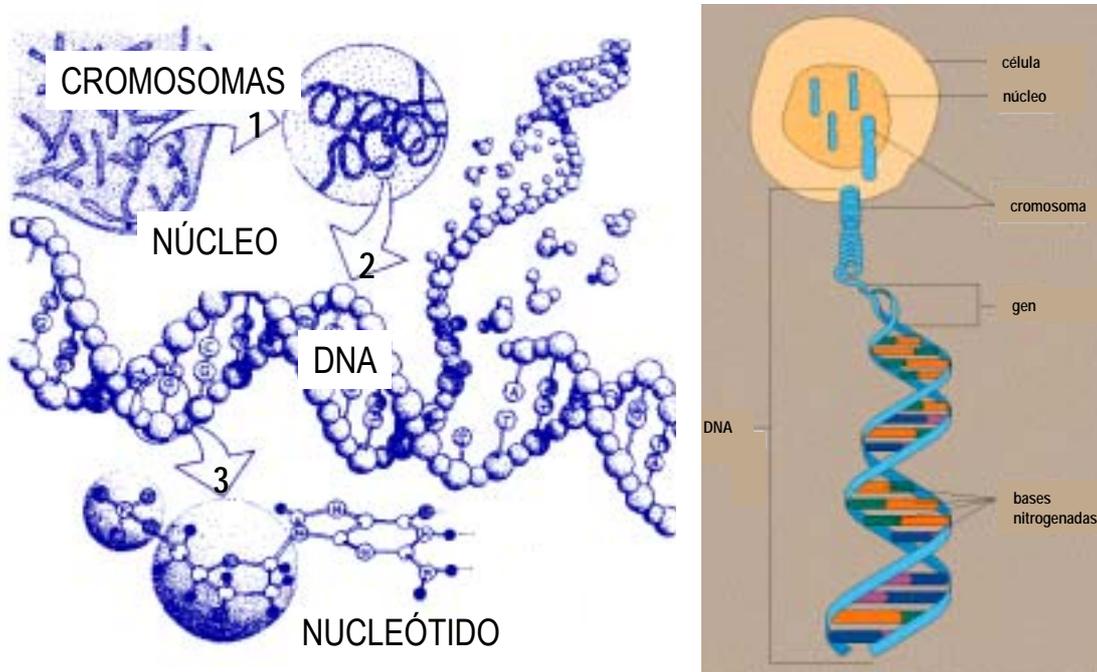


Figura 1.1. El genoma humano a cuatro niveles. Excepto los gametos (células reproductivas) y los eritrocitos maduros, cada célula del cuerpo humano contiene 23 pares de cromosomas, siendo cada uno de ellos un paquete de DNA enrollado y comprimido (1, 2). Cada hebra de DNA consiste en unidades repetitivas de nucleótidos (3).

Luego de numerosos estudios ha quedado claro que “la molécula de la herencia”, constituyente fundamental de los cromosomas, es el DNA (ácido desoxirribonucleico) ³⁻⁵.

El DNA posee numerosas características para suponer este hecho:

- Como otros polímeros, la cadena de DNA puede ser muy larga. Cada cromosoma humano, por ejemplo, contiene una sola molécula de DNA que puede ser, si se desenrollara, de una longitud de unos 12 cm y tener una masa equivalente a 150 billones de átomos de hidrógeno. Esta molécula tan larga tiene, por lo tanto, una capacidad inmensa de información.

- Posee unidades variables (las bases nitrogenadas), que se encuentran en una localización determinada en la secuencia de la cadena. Este último hecho es muy importante ya que la información se secuencia según la ubicación de las unidades en la cadena. Si estas unidades fuesen idénticas, el mensaje sería el mismo y existiría muy poca información. La existencia de unidades diferentes posibilita que se formen “palabras” que codifican información.

- Es suficientemente estable, por lo que la información que contiene se conserva y transmite de manera segura.

- La información codificada en el DNA se utiliza en la construcción de *proteínas* * que contienen una secuencia específica de *aminoácidos* *. Esto es muy importante ya que la secuencia de aminoácidos en una proteína determina su estructura y, por lo tanto, su función biológica. Las

proteínas realizan “el trabajo de la vida” por lo que su estructura debe ser correctamente especificada para que sean eficientes en este trabajo.

- Es capaz de duplicarse para que dos células hijas tenga toda la información contenida en la célula madre.

1.1.1 LA MOLÉCULA DE DNA DESDE EL PUNTO DE VISTA ESTRUCTURAL

El DNA es un largo polímero no ramificado. Las unidades monoméricas se conocen como *nucleótidos* *, y el polímero se denomina *polinucleótido* *. Los componentes moleculares del polímero son ³⁻⁵:

- azúcar de 5 átomos de carbono: 2-desoxirribosa
- bases nitrogenadas: purinas (adenina y guanina) y pirimidinas (timina y citosina)
- grupo monohidrógeno fosfato.

El polímero lineal monocatenario (polinucleótido), está formado por un esqueleto de unidades repetitivas de moléculas de 2-desoxirribosa que se encuentran unidas entre sí mediante enlaces fosfodiéster. Este enlace une el grupo –OH en posición 5' de una molécula de azúcar con el –OH en posición 3' de otra molécula.

Es importante destacar que, según se observa en la **Figura 1.2**, los carbonos anoméricos (hemiacetales) de las moléculas de desoxirribosa no están directamente involucrados en el esqueleto del polímero y que, por lo tanto, quedan disponibles para servir de sitios de unión para las bases nitrogenadas.

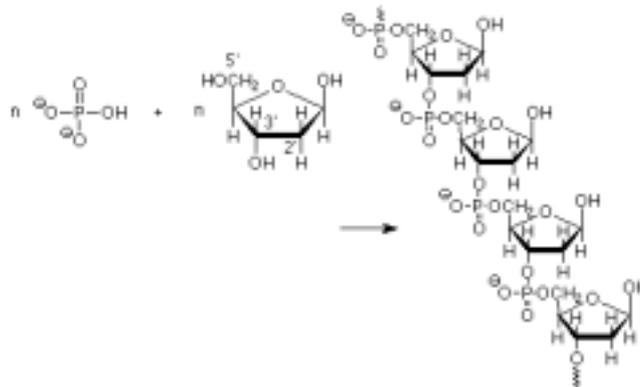


Figura 1.2. Esqueleto del polímero compuesto por unidades repetitivas de fosfato y 2-desoxirribosa

En el DNA, las cuatro bases que se unen a estos sitios son (**Figura 1.3**):

- A (adenina)
- G (guanina)
- C (citosina)
- T (timina)

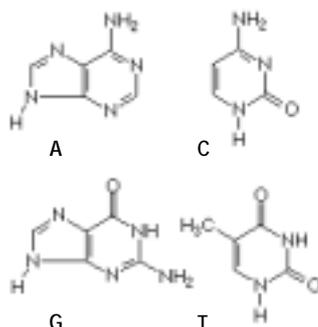


Figura 1.3. Bases nitrogenadas que componen el DNA

La unión de las bases nitrogenadas al esqueleto fosfato-azúcar se realiza mediante un átomo específico de N de la base al C anomérico de la desoxirribosa, perdiéndose en la reacción un átomo de H de las bases y un grupo -OH del azúcar, en forma de agua.

El compuesto que se forma de esta manera entre una molécula de desoxirribosa y una base nitrogenada se denomina *nucleósido* * y, si además se esterifica el grupo -OH en posición 5' de la desoxirribosa con un fosfato, se genera un nucleótido (Figura 1.4)

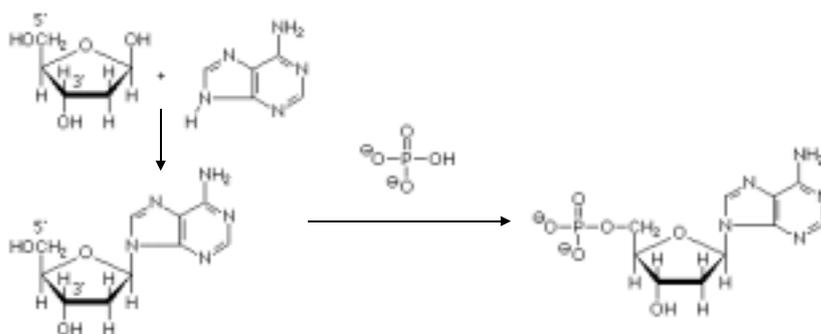


Figura 1.4. Formación de nucleósidos y nucleótidos. En la figura se ejemplifica la unión de la adenina con la 2-desoxirribosa para dar desoxiadenosina (un nucleósido). La unión del nucleósido con un fosfato genera desoxiadenosina 5-monofosfato (dAMP, un nucleótido).

Si se unen dos nucleótidos mediante un enlace fosfodiéster entre el fosfato de ubicación 5' con el -OH en 3' de la desoxirribosa de otro nucleótido, se obtiene un dinucleótido (Figura 1.5).

Este proceso puede continuar ya que un dinucleótido tiene un grupo -OH en el extremo 3' capaz de unirse a un nuevo nucleótido por el fosfato de ubicación 5' del azúcar, generando un trinucleótido, y así sucesivamente hasta formarse un polímero de n unidades: un polinucleótido, como se observa en la Figura 1.6.

Debido a que cualquiera de las 4 bases nitrogenadas puede unirse a cualquier ubicación en el esqueleto repetitivo de fosfato y desoxirribosa del polímero, la estructura tiene así la variabilidad necesaria para codificar información genética.

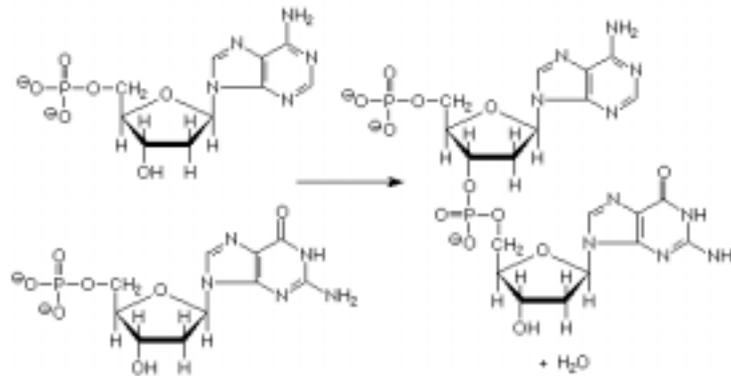


Figura 1.5. Formación de un dinucleótido a partir de dos nucleótidos

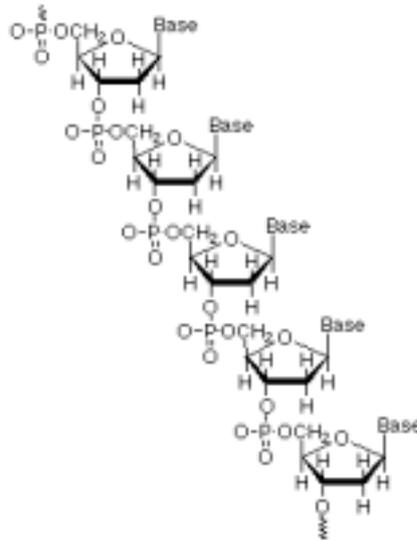


Figura 1.6. Polinucleótido

Es importante destacar algunos hechos que se derivan de la estructura molecular del polímero (polinucleótido monocatenario) ³⁻⁵:

- La cadena tiene una dirección (denominada polaridad) con un extremo 5' (en donde existe un grupo fosfato) y un extremo 3' (en donde se encuentra un grupo –OH de una molécula de 2-desoxirribosa). Esta polaridad tiene una importancia funcional y biológica, ya que la síntesis enzimática del DNA ocurre en el sentido 5' al 3'. Esto quiere decir que todo nuevo nucleótido que se quiera anexas lo hace en el extremo 3' del polímero.

- Los átomos de O de los grupos fosfato del esqueleto son polares y a pH fisiológico se encuentran con una carga neta negativa.

- Las bases nitrogenadas son hidrofóbicas.

En condiciones fisiológicas –excepto en algunos momentos particulares como son el de replicación (§ 1.1.3.1) y transcripción (§ 1.1.3.2)– el DNA no se encuentra en forma monocatenaria.

En el DNA siempre se cumple que el % de A es aproximadamente igual que el de T, y similarmente ocurre con los % de G y C. Esto hizo pensar que estas moléculas debían estar relacionadas.

Estos hechos lo explica el modelo de la *doble hélice* * desarrollado por Watson y Crick ⁶ (1962, premio Nobel de Medicina y Fisiología).

Mediante análisis de rayos X se vio que el DNA en estado puro tiene una conformación particular, en la que dos cadenas de polímeros de polinucleótidos se disponen como una doble hebra (dsDNA) y en forma de espiral. El esqueleto de pentosas y fosfato –de naturaleza hidrofílica– se encuentra dispuesto hacia el medio externo polar, mientras que las bases nitrogenadas –de naturaleza hidrofóbica– se encuentran hacia el interior. Estas últimas permiten que las dos cadenas simples de polinucleótidos se encuentren unidas entre sí por establecimiento de fuerzas termodinámicamente débiles entre las bases nitrogenadas de una cadena y de la otra y entre los pares de bases sucesivos.

Las fuerzas que unen ambas hebras son *puentes de hidrógeno* * y se establecen con una alta especificidad.

La especificidad de esta unión deviene de dos factores:

- tamaño de las bases nitrogenadas (factor estérico) y
- capacidad de las mismas para formar puentes de hidrógeno.

Las bases nitrogenadas T y A pueden unirse entre sí por dos puentes de hidrógenos mientras que G y C pueden unirse de manera similar pero mediante el establecimiento de tres puentes de hidrógeno. En este tipo de apareamiento, una base de dos anillos –purina, tal como A o G– se une a otra de un anillo –pirimidina, tal como C o T–. Este tipo de unión se dice que es *complementaria* *.

Las bases púricas A y G son las más grandes del DNA, porque poseen 2 anillos. Las bases pirimidínicas C y T son más pequeñas porque poseen 1 anillo.

El tamaño de las bases nitrogenadas –es decir, el número de anillos– es importante porque una unión entre dos bases púricas podría provocar que los dos polímeros de DNA que forman el espiral se separen y que la molécula de DNA sea menos estable.

También es importante la capacidad de formar puentes de hidrógeno, ya que estructuralmente una base pirimidínica con capacidad de formar tres puentes de hidrógeno sólo y únicamente puede unirse con una base púrica de igual capacidad; es decir, la citosina únicamente puede aparearse con la guanina (Figura 1.7).

C con G	}	se denominan bases complementarias
A con T		

Además de la formación de puentes de hidrógeno, la doble hebra de DNA se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas entre pares de bases sucesivas. Las interacciones hidrofóbicas no contribuyen en la especificidad de la unión, pero sin embargo son cuantitativamente más importantes en la estabilización de la doble hebra que los puentes de hidrógeno, desde el punto de vista termodinámico.

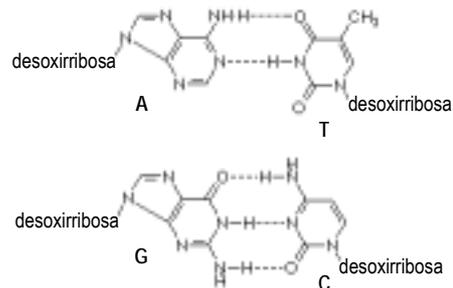


Figura 1.7. Establecimiento de puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas complementarias

Una vez descrito el modelo de la doble hélice de DNA por Watson y Crick, se esclareció rápidamente la forma en que el mensaje genético se transmite a una célula hija, al igual que el mecanismo de transcripción de dicho mensaje a una proteína, que es la molécula biológicamente operante y que actúa en función de lo que se encuentra codificado en el DNA.

Es importante destacar algunos hechos que se derivan de la estructura de doble hélice ³⁻⁵ (Figura 1.8).

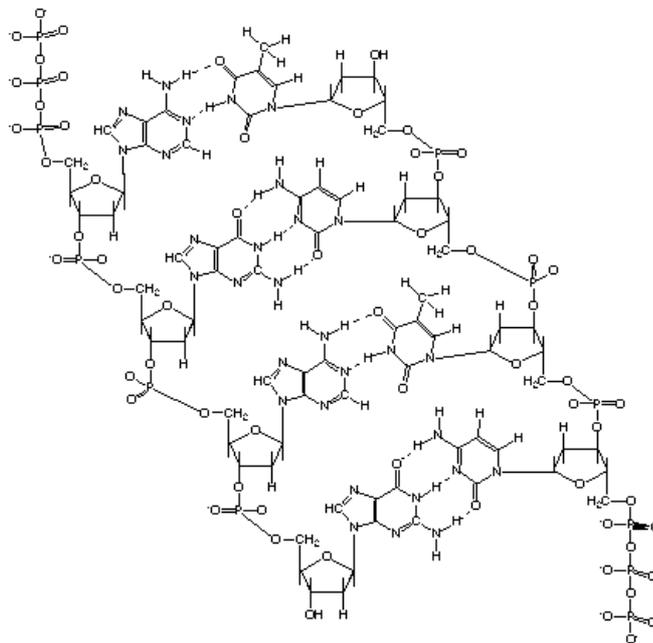


Figura 1.8. Formación de la doble hélice de DNA entre dos hebras simples que poseen bases complementarias

- Las dos cadenas de DNA son complementarias, ya que su unión –que se denomina *hibridación**– ocurre de manera específica debido a la complementariedad de A con T y de C con G.

- Las dos cadenas de DNA se extienden en direcciones opuestas: son antiparalelas. Esto quiere decir que en un extremo de la doble hélice habrá un extremo 3' de una cadena y un 5' de la cadena complementaria.
- Las dos cadenas de DNA forman una espiral helicoidal dextrógira de aproximadamente 10 pares de nucleótidos por vuelta de la hélice (1 vuelta de hélice = 35.7 Å), que se enrosca alrededor del un eje. Se generan así surcos principales y secundarios (Figura 1.9).

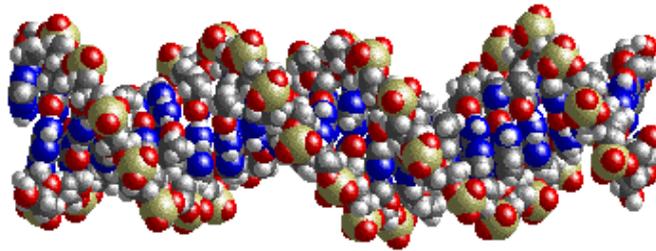


Figura 1.9. Modelo de la doble hélice de DNA de Watson y Crick. En la figura se muestran los surcos mayores y menores, y la disposición hacia el exterior del esqueleto fosfato y hacia el interior de las bases nitrogenadas.

- El esqueleto de fosfato y pentosas de las dos hebras de DNA se enrosca en la espiral hacia fuera como las barandas de una escalera, mientras que las bases nitrogenadas se encuentran en el interior y se disponen como los peldaños de la misma. Esto se explica porque el esqueleto es hidrofílico y las bases nitrogenadas son hidrofóbicas, siendo esta disposición la más favorable termodinámicamente, teniendo en cuenta las características polares del medio externo biológico.
- Debido a los tamaños de las bases nitrogenadas y su asociación complementaria, la doble hélice de DNA tiene en toda su longitud el mismo diámetro.

1.1.2 LA MOLÉCULA DE DNA DESDE EL PUNTO DE VISTA ANALÍTICO

La detección de una secuencia de bases específica en ácidos nucleicos de humanos, virus y bacterias ha generado mucho interés en determinación de causas de enfermedades genéticas, contaminación de alimentos por organismos y en investigaciones forenses y medioambientales. Los organismos patógenos responsables de enfermedades (bacterias, virus), pueden detectarse por su secuencia única de ácidos nucleicos.

Las técnicas convencionales de análisis de una secuencia genética específica se basan fundamentalmente en *metodologías de secuenciación* * ⁷ y en *metodologías de hibridación* * de la molécula de DNA ⁸. Las mutaciones responsables de numerosas enfermedades hereditarias son ahora conocidas gracias a las técnicas de secuenciación del DNA pero, debido a su simplicidad, las técnicas de hibridación son comúnmente más utilizadas en laboratorios de diagnóstico.

En las técnicas que se basan en la hibridación del DNA, la secuencia de interés o analito (en inglés *target*) es identificada por una *sonda de DNA* * cuya secuencia es complementaria, es decir, capaz de formar una doble cadena –*dúplex* * o *híbrido* *– con el analito. Esta reacción de hibridación

ocurre con gran afinidad y especificidad, es decir, en presencia de DNA no complementarios, tal como sucede *in vivo*. En la mayoría de los formatos, las sondas de DNA se encuentran marcadas, y esa marca será la responsable de dar la señal analítica cuantificar el evento de hibridación⁹⁻³⁰.

Una revolución en el diseño de sondas de DNA marcadas lo constituyen los *beacons*³¹⁻³³. Estas sondas de DNA están diseñadas de tal manera que cuando se encuentran como ssDNA tienen forma de horquilla, debido a que en sus dos extremos (5' y 3') poseen de 5 a 7 bases nitrogenadas que son complementarias entre sí. En el centro poseen un lazo, usualmente de 15 a 30 pb, cuya secuencia es complementaria al analito que se investiga³⁴. Además, en el extremo 5' están funcionalizadas con una molécula fluorescente, y en el extremo 3', con una molécula "apagadora" (Figura 1.10, A). Cuando el *beacon* se encuentra como ssDNA –es decir, en forma de horquilla–, no emite fluorescencia, ya que la molécula "apagadora" está cerca de la molécula fluorescente. Pero cuando el *beacon* encuentra su secuencia complementaria –el analito–, la horquilla se abre y se alejan entonces la molécula fluorescente de la apagadora emitiéndose fluorescencia³⁵ (Figura 1.10, B).

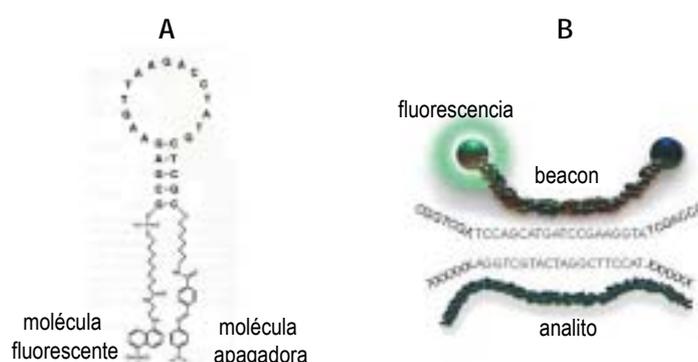


Figura 1.10. Estructura molecular (A) y fundamento de la utilización (B) de los beacons.

Se ha reportado también *beacons* biotinilados para su inmovilización en superficies^{36,37}. Asimismo, se ha reportado la utilización de *beacons* en genosensores ópticos^{37,38}. Los *beacons* pueden ser utilizados en técnicas de hibridación homogénea –en solución– (§ 1.2) y en PCR cuantitativa (§ 1.2.2)^{39,40}.

Se ha reportado también la construcción de "sondas inteligentes", cuyo funcionamiento es similar a la de los *beacons*, pero que en este caso sólo requieren la marcación fluorescente en uno de los extremos⁴¹. El fluoróforo es mitigado en presencia de moléculas de guanosina, y cuando la estructura de horquilla se abre por hibridación con la secuencia complementaria, la fluorescencia aparece.

Los iones y las moléculas interactúan con el DNA de tres maneras¹⁰⁸. La primera consiste en la unión electrostática a lo largo del exterior de la doble hélice del DNA mediante las cargas negativas de los grupos fosfatos del mismo. Esta interacción es inespecífica, y puede ocurrir tanto en dsDNA como en ssDNA. La segunda es la unión hidrofóbica con los bordes de las bases nitrogenadas que quedan más expuestas en los surcos mayores y menores de la doble hebra. La tercera y más específica es la intercalación, que consiste en la incorporación de moléculas orgánicas con sistemas

de anillos aromáticos planares –denominadas intercaladores– entre los pares de bases nitrogenadas. Numerosas metodologías de análisis de DNA se basan en la interacción del dsDNA con moléculas usualmente capaces de generar señal analítica ^{8,42}. Son compuestos orgánicos intercalantes bromuro de etidio ⁴³⁻⁴⁸, naranja de acridina ^{43,49,50}, daunomicina ^{43,51-55}, hidrazinas ^{51,56}, antraminas ^{49,50,51,56}, antraciclina, tetraciclina ⁴³, fenotiazinas ^{51,57} y azul de metileno ^{58,59}, azul Nilo ⁶⁰, vinblastina ⁴³, Hoechst 33258 ^{43,61-63} y 33342 ⁴³, YOYO y Picogreen ⁶⁴, ToPro-3 ⁶⁵, TOMEHE ⁶⁶, bencil ⁶⁷ y metil ⁶⁸ viologen, minociclina ⁴³, yoduro de propidio ⁴³ y derivados del naftaleno ⁶⁹⁻⁷¹. Algunos complejos orgánicos metálicos –tales como $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ ^{51,56,72-85}, $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ ^{56,80,84,86-91}, $\text{Co}(\text{tppz})_2^{3+}$ ⁸⁴, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ⁸⁶, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ^{92,93}, $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ ^{43,94,95}, $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$ ^{43,80,86}, $\text{Fe}(\text{bpy})_3^{2+}$ ^{80,86}, $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ ^{86,96}, $\text{Cu}(\text{TAAB})_2^{2+}$ ⁹⁶, $\text{Os}(\text{bpy})_3^{3+}$ ^{91,97-99}, $\text{Os}(\text{phen})_3^{2+}$ ⁹⁹, $\text{Os}(5,6\text{-dmphen})_3^{2+}$ ⁹⁹, $\text{Os}(4,7\text{-dmphen})_3^{2+}$ ⁹⁹ – se unen al dsDNA (y también al ssDNA) fundamentalmente mediante interacciones electrostáticas, aunque en algunos casos también se unen al dsDNA mediante intercalación e interacciones hidrofóbicas con los surcos mayores y menores ⁸⁶.

El DNA puede resultar antigénico en pacientes con enfermedades autoinmunes. Así, se pueden producir anticuerpos anti-DNA en animales, para posteriormente marcar, por ejemplo, con una enzima como la HRP ¹⁰⁰ o la ureasa ¹⁰¹, o inmovilizar en un soporte sólido. La reacción del DNA con el anticuerpo anti-DNA puede ser útil para la detección de la cantidad de DNA total en muestras, y por lo tanto, para una estimación de la contaminación bacteriana o vírica ^{100,101}.

Las bases nitrogenadas son los blancos de ataques de numerosos agentes que producen daño en el DNA, tales como radiaciones UV y ionizantes, sustancias y procesos metabólicos oxidantes, colorantes fotoexcitantes, antibióticos, asbestos, entre otros ¹⁰². La oxidación y alquilación electrofílica han sido el objeto de numerosos estudios en toxicología, debido a que se suponen causantes de cáncer.

La base nitrogenada guanina principalmente es la que lleva a cabo la mayoría de las reacciones, incluidas oxidaciones, alquilaciones, hidroxilaciones radicalarias, reacciones con complejos metálicos y con oxígeno singlete. En presencia de cationes divalentes, ciertas secuencias cortas de oligonucleótidos ricos en guanina se pueden unir a sitios específicos de dsDNA formando hélices triples. Este tipo de formación puede inhibir la replicación (§ 1.1.3.1) y la iniciación de la transcripción del DNA (§ 1.1.3.2), pudiendo resultar en la inhibición específica de la síntesis de proteínas asociadas a enfermedades. Es obvio entonces el poder terapéutico de estos oligonucleótidos capaces de formar hélices triples ¹⁰³.

Las propiedades electroquímicas del DNA fueron descubiertas hace 40 años ¹⁰⁴. La mayor reactividad de la G respecto a los otros nucleótidos puede deberse a su potencial de oxidación, que es 1.34 V (contra electrodo normal de hidrógeno), mientras que la A se oxida a 1.79 V. Las bases pirimidínicas lo hacen a potenciales aún mayores ⁹³. La reducción de las bases nitrogenadas ocurre a potenciales muy bajos que pueden ser estudiados únicamente con electrodos de mercurio ¹⁰⁵⁻¹¹⁵. Los procesos oxidativos del DNA, sin embargo, pueden estudiarse con electrodos sólidos –tales como grafito, oro, platino, plata, cobre– por lo que pueden ser analíticamente más importantes ¹⁰⁸.

La oxidación de la guanina genera, *in vivo*, 8-oxo-guanina ¹¹⁶, y los efectos de esta sustitución en la estructura y reparación del DNA ha sido muy estudiada. Es importante destacar que el papel de la guanina en el cáncer puede entenderse por sus propiedades redox ⁹³.

La oxidación de la guanina puede servir, entonces, como método de detección del DNA mediante procedimientos electroquímicos, sin necesidad de un marcador externo ^{49-51,54,56,73,117-121}. Las pentosas han sido menos utilizadas ^{122,123}. Por el contrario, el esqueleto fosfato del DNA es eléctricamente inactivo ¹⁰⁵, aunque debido a su naturaleza polianiónica, se ha utilizado en medidas de cargas de compensación de marcadores redox catiónicos ¹²⁴ y en la repulsión iónica de marcadores redox aniónicos ^{125,126}.

Se especula sobre la conductividad del DNA, es decir, su capacidad de mediar en la transferencia de cargas ⁵⁹. Se han realizado numerosos experimentos al respecto ¹²⁷⁻¹³⁰ aunque aún quedan muchas preguntas por responder acerca de esta propiedad ¹⁰⁸.

Por otro lado, se ha reportado la relativa nucleofilicidad del N7 de los residuos de guanina, hecho que ha facilitado la inmovilización de DNA sobre superficies sólidas ^{90,91}. La mayoría de las derivatizaciones e inmovilizaciones de moléculas de DNA se llevan a cabo a través del fosfato en posición 5' ^{15,18,27,47,131-137}. Es posible la introducción de moléculas que sean mejores grupos salientes en los extremos 5' (principalmente) y 3' para posteriores reacciones, y la incorporación de grupos tales como -HS ^{59,62,63,69,71,99,124,126,134,138-142}, -NH₂ ^{18,20,22,23,27,29,132,137,143-145}, pirrol ^{146,147}, ferrocenil ^{148,149} o moléculas pequeñas como la biotina ^{14,22-26,28,30,53,143,146,150-160}, la fluoresceína ^{18,22,23,26,161} y la digoxigenina ¹⁶²⁻¹⁶⁸. La síntesis de DNA sobre soportes sólidos utiliza también la posibilidad de funcionalizar dicha molécula ⁸. Se puede inmovilizar el -OH en posición 3' del primer nucleótido y llevar a cabo la síntesis en sentido 3'→5', o bien a la inversa ⁸.

1.1.3 LA MOLÉCULA DE DNA DESDE EL PUNTO DE VISTA BIOLÓGICO Y FUNCIONAL

La molécula de DNA debe cumplir tres funciones biológicas fundamentales ³⁻⁵:

- Debe duplicarse antes de la división celular de manera de que cada célula hija reciba la misma información genética cualitativa y cuantitativa. A este proceso se lo denomina *replicación* * (§ 1.1.3.1) del DNA.

- Como la información genética debe estar en un medio seguro (el núcleo celular), para poder ser operante en el medio donde ocurren la mayoría de las reacciones metabólicas (citoplasma celular), es conveniente que transfiera su información a otro tipo de molécula que pueda salir al exterior. Esta molécula se denomina RNA (ácido ribonucleico) y, a este proceso de transferencia de información del DNA al RNA, se lo denomina *transcripción* * (§ 1.1.3.2) del DNA.

- Como las moléculas realmente funcionales en los seres vivos son las proteínas, la información codificada en el RNA debe transferirse a su forma operativa, la proteína. A este proceso se lo denomina *traducción* * (§ 1.1.3.3).

En las siguientes secciones se explicaran brevemente en qué consiste cada uno de estos procesos.

1.1.3.1 Replicación del DNA

Un gen contiene información biológica que debe copiarse exactamente y transmitirse desde cada célula a todas sus células hijas. Como cada hebra contiene una secuencia de nucleótidos que es exactamente complementaria a la secuencia de nucleótidos de la otra hebra debe notarse que, en

realidad, ambas hebras contienen la misma información genética que se encuentra, por tanto, duplicada. Dicho de otra manera, si se considera una secuencia como una palabra, dos secuencias complementarias serían dos palabras distintas que quieren decir lo mismo –sinónimos–. Si se denomina a las dos hebras A y A', la hebra A puede servir de molde o patrón para producir una nueva hebra A'; de la misma forma, la hebra A' puede utilizarse para producir una hebra A. Así, la información genética puede ser copiada mediante un proceso en el cual la hebra A se separa de la hebra A' permitiendo que cada una de ambas hebras sirva de patrón para la producción de una nueva doble hebra idéntica que la anterior (Figura 1.11).

Aunque el principio en que se basa la replicación genética es elegante y simple, el mecanismo real con la que se realiza esta copia en la célula es complicado, interviniendo un complejo de proteínas que forman una “maquinaria de replicación”. La reacción fundamental se basa en la adición de un desoxirribonucleótido al extremo 3' de una cadena de DNA, catalizada por una *enzima* *, la *DNA polimerasa* *. Cada nucleótido añadido a la cadena es, en realidad, un desoxirribonucleótido trifosfato; la separación del pirofosfato de este nucleótido activado y su hidrólisis posterior proporcionan la energía necesaria para la reacción de replicación del DNA, convirtiéndola de forma efectiva en una reacción irreversible.

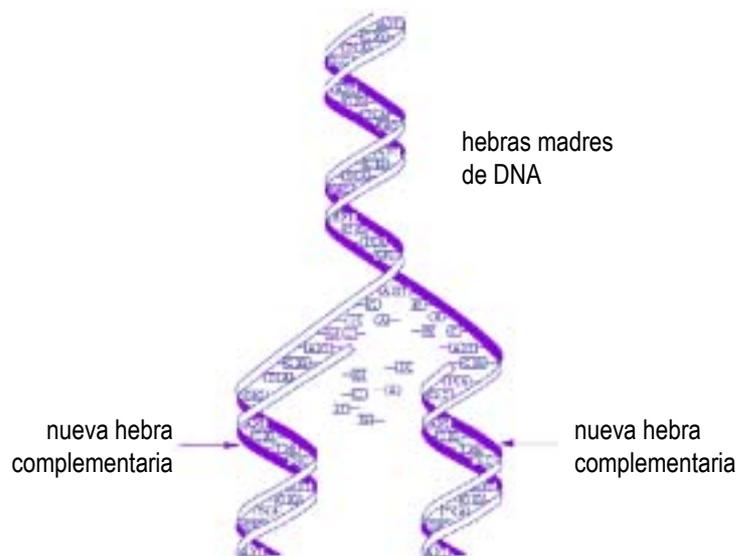


Figura 1.11. *Replicación semiconservativa del DNA.* En la figura se observa que a partir de una doble hebra de DNA se obtienen dos copias idénticas a la original. Cada una de estas dobles hebras hijas posee una hebra proveniente del molde original, mientras que la hebra complementaria ha sido sintetizada de novo.

La replicación de una hélice de DNA empieza por la separación local de sus dos hebras de DNA complementarias. Cada hebra actúa luego como patrón para la formación de una nueva molécula de DNA, mediante la adición secuencial de desoxirribonucleótidos trifosfatos, generándose así una hebra hija de DNA que tiene una secuencia complementaria a la de la hebra patrón. La información genética se duplica en su totalidad, es decir, se llegan a formar dos dobles hélices completas de DNA, cada una de las cuales es idéntica en cuanto a la secuencia de nucleótidos a la

hélice de DNA madre que sirvió de patrón. Debido a que al acabar el proceso cada doble hélice de DNA hija está formada por una cadena original y otra recién sintetizada, se dice que el mecanismo de replicación es semiconservativo (Figura 1.11).

Una de las características más impresionantes de la replicación del DNA es su exactitud. Se utilizan diversos mecanismos correctores para eliminar nucleótidos situados incorrectamente. Sin embargo, puede ocurrir que la maquinaria de replicación salte o añada algunos nucleótidos, o coloque una base diferente en lugar de la que correspondería. Cada uno de los cambios de este tipo en la secuencia de DNA constituye un error genético llamado *mutación* *, que será copiado en todas las generaciones futuras de células, ya que las secuencias equivocadas se copiarán tan fielmente como las correctas. Como los genes se expresan en proteínas, una mutación puede provocar, por ejemplo, que se sintetice una enzima inactiva o con problemas funcionales. Las consecuencias de un error de este tipo pueden ser muy importantes, ya que el cambio de un nucleótido puede tener grandes efectos sobre la célula. Por el contrario, una mutación también puede proporcionar una ventaja de algún tipo, ya sea una mejor adaptación al medio o una mejora fisiológica. Este es uno de los principales mecanismos de la evolución, mediante el cual han aparecido nuevas especies y grupos taxonómicos en el curso de la historia natural del planeta.

1.1.3.2 Transcripción del DNA

La molécula de DNA es relativamente inerte desde el punto de vista químico. La información que contiene se expresa indirectamente a través de otras moléculas: el DNA dirige la síntesis de RNA específicos, y así de moléculas de proteína que, a su vez, determinan las propiedades físicas y químicas de la célula (Figura 1.12).

Tanto el DNA como las proteínas, están compuestos por una secuencia lineal de subunidades y se ha demostrado que los nucleótidos del DNA están dispuestos en un orden que corresponde al orden de los aminoácidos de la proteína que especifican. Resulta evidente que la secuencia de DNA contiene una especificación codificada de la secuencia proteica. La pregunta central de la biología molecular pasó a ser entonces cómo una célula traduce una secuencia de nucleótidos del DNA a una secuencia de aminoácidos de una proteína.

La síntesis de proteínas implica copiar regiones específicas del DNA –los genes– en otro tipo de polinucleótido química y funcionalmente diferente: el RNA. Al igual que el DNA, el RNA está compuesto por una secuencia lineal de nucleótidos, pero presenta dos diferencias químicas respecto al DNA:

- el esqueleto de azúcar y fosfato del RNA contiene ribosa en lugar de 2-desoxirribosa;
- la base T está substituida por uracilo (U), una base muy estrechamente relacionada que también se aparea con A.

El RNA contiene toda la información de la secuencia del DNA de la que ha sido copiada, y mantiene las propiedades del DNA de apareamiento de bases. Las moléculas de RNA se sintetizan a través de un proceso conocido como transcripción del DNA, que en muchos aspectos se parece al de replicación del DNA, ya que una de las dos hebras de DNA actúa como patrón sobre la que se sintetiza la molécula de RNA mediante adiciones consecutivas de ribonucleótidos.

La transcripción del DNA se diferencia de la replicación en varios puntos importantes:

- El RNA producido no permanece asociado al DNA. Inmediatamente detrás de la región en la que se añaden los ribonucleótidos, la hélice original de DNA se forma de nuevo y la molécula de RNA se separa. Por consiguiente, las moléculas de RNA tienen una sola hebra.

- Las moléculas de RNA son relativamente cortas en comparación con las de DNA, ya que son copiadas a partir de una región limitada de DNA. Se transcriben únicamente uno o varios genes suficientes para producir una o varias proteínas.

- Las moléculas de RNA no sólo se encuentran en el núcleo celular.

- Existen varios tipos de moléculas en los que se puede encontrar RNA, con funciones biológicas diferentes. A los transcritos de RNA que dirigen la síntesis de proteínas, se las llama moléculas de RNA mensajero (mRNA), mientras que otros transcritos de RNA actúan como RNA de transferencia (tRNA) o bien forman los componentes de RNA de los ribosomas (rRNA) (Figura 1.12).

La cantidad de RNA sintetizado a partir de una región determinada de DNA está controlada por proteínas reguladoras de la actividad génica, que se unen a lugares específicos del DNA cerca de las secuencias codificantes de un gen. En cualquier célula, en cualquier momento dado, algunos genes se están utilizando para sintetizar RNA en grandes cantidades –por ejemplo, frente a una infección bacteriana, se están sintetizando en los *linfocitos B* * grandes cantidades de inmunoglobulinas–, mientras que otros genes no se transcriben en absoluto.

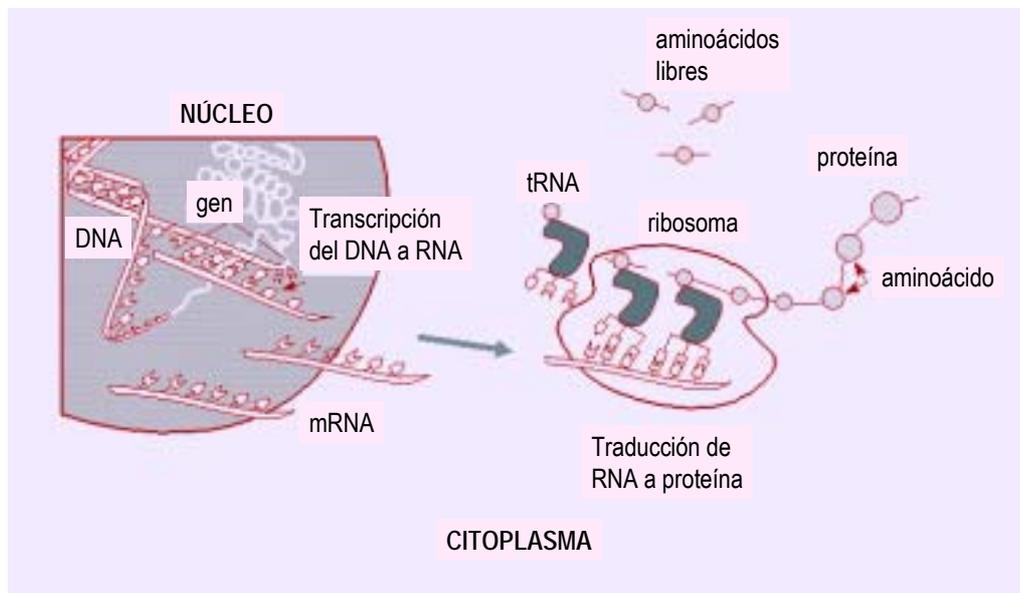


Figura 1.12. Mecanismo de transcripción y traducción del DNA. Para más detalles, véase el texto.

En las células, sin embargo, se descubrió que la mayoría de los genes *eucarióticos* * presentan secuencias codificantes –llamadas *exones* *– interrumpidas por secuencias no codificantes –llamadas *intrones* *– (véase Figura 1.13).

Para producir una proteína primero se transcribe todo el gen, incluyendo tanto sus intrones como sus exones, generando una molécula muy larga de mRNA (el transcrito primario). Antes de que la molécula de RNA abandone el núcleo, un complejo de enzimas procesadoras de RNA eliminan

todas las secuencias de intrones produciendo así una molécula de RNA mucho más corta (Figura 1.13).

Después de que esta maduración de RNA –llamada maduración por corte y empalme del RNA (del inglés *RNA splicing*)– haya concluido, la molécula de RNA se desplaza hacia el citoplasma constituyendo ahora una molécula de mRNA que dirige la síntesis de una molécula de proteína determinada en su secuencia (Figura 1.13).

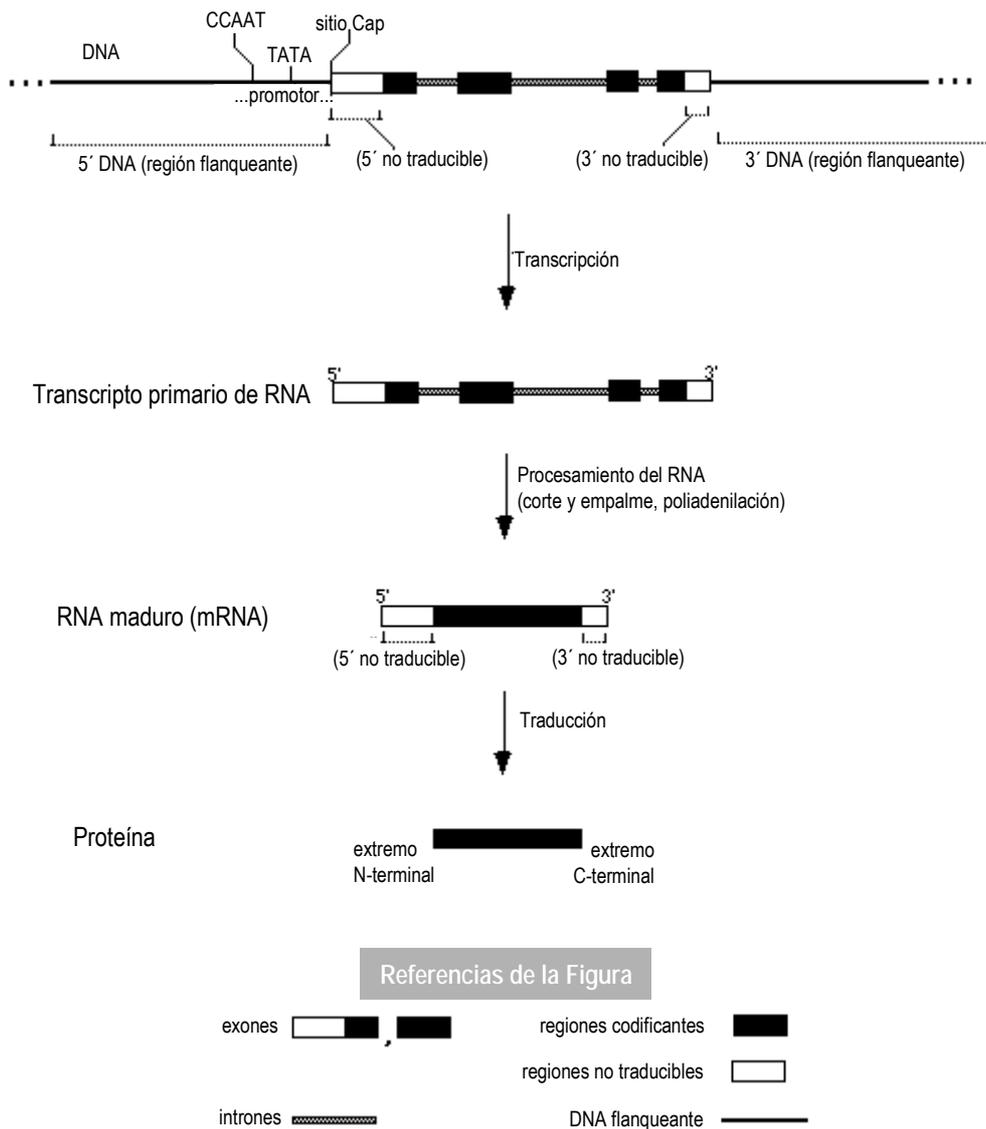


Figura 1.13. Mecanismo de maduración del RNA. Para más detalle, véase el texto.

1.1.3.3 Traducción

Las reglas a través de las que se traduce la secuencia nucleotídica en la secuencia de aminoácidos de una proteína, el denominado *código genético* *, fueron descifradas a principios de 1960. Se demostró que la secuencia de nucleótidos de la molécula de mRNA que actúa como intermediario era leída en orden consecutivo y en grupos de tres. Cada triplete de nucleótidos, denominado *codón* *, determina un aminoácido (véase *Figura 1.12*). Por ejemplo, el codón GAG (guanina-adenina-guanina) traduce a ácido glutámico, mientras que AUG codifica la metionina.

Puesto que el RNA es un polímero lineal de cuatro nucleótidos diferentes, existen $4^3 = 64$ posibilidades de tripletes para formar otros tantos codones posibles. Habitualmente, en las proteínas tan sólo se encuentran 20 aminoácidos diferentes, de modo que la mayoría de aminoácidos deben ser especificados por varios codones. A este fenómeno se lo denomina *código genético degenerado* *. El código ha sido altamente conservado a través de la evolución: con pocas excepciones, es igual en organismos tan diversos como las bacterias, las plantas y el hombre.

La traducción de un mRNA a proteína depende de una molécula adaptadora que reconoce un aminoácido y un grupo de tres nucleótidos (*Figura 1.12*). Estos adaptadores son un grupo de pequeñas moléculas de RNA conocidas como RNA de transferencia (o tRNA), cada una de las cuales tiene alrededor de 80 nucleótidos de longitud. En la molécula de tRNA (que poseen una hebra), los pares de bases complementarias se forman entre residuos de nucleótidos de la misma cadena, lo cual hace que la molécula de tRNA se pliegue de una manera característica (como un cruce en trébol), que es importante en su función de adaptador. En la molécula existen dos grupos de residuos de nucleótidos desapareados, que son especialmente importantes para la función en la síntesis de proteínas: uno de los grupos forma el anticodón, cuyas bases pueden aparearse con las de un triplete complementario de una molécula de mRNA (el codón), mientras que en el extremo 3' de la molécula existe una secuencia CCA que está unida de forma covalente a un aminoácido.

Finalmente, el mRNA es traducido a una proteína a través de un complejo conjunto de reacciones que tienen lugar en el ribosoma, que es un complejo de más de 50 proteínas diferentes asociadas a varias moléculas de RNA ribosomal (rRNA) (*Figura 1.12*). Cada ribosoma funciona como una gran maquinaria sintetizadora de proteínas en la que también intervienen las moléculas de tRNA y las moléculas de mRNA (que poseen codificada la información genética). El ribosoma se fija primero en un punto específico de la molécula de mRNA (codón de iniciación), que establece la pauta de lectura y determina el extremo amino terminal de la proteína. Luego, a medida que el ribosoma se desplaza a lo largo de la molécula de mRNA, va traduciendo, codón a codón, la secuencia de nucleótidos a una secuencia de aminoácidos, utilizando moléculas de tRNA para añadir aminoácidos al extremo por el que la cadena polipeptídica está creciendo. Cuando un ribosoma llega al final del mensaje, tanto él como el extremo carboxilo de la proteína recién sintetizada, se liberan del extremo 3' de la molécula de mRNA al citoplasma. Los ribosomas funcionan con una eficacia notable: en 1 segundo, un solo ribosoma bacteriano añade aproximadamente unos 20 aminoácidos a una cadena polipeptídica en formación.

1.1.4 PROYECTO GENOMA HUMANO

En la historia de la biología y de la medicina habrá un antes y un después del 12 de febrero del año 2001. Los científicos de los proyectos público y privado del genoma humano presentaron este día “el libro más grande de la historia”: el mapa “casi” completo del genoma humano.

El primer borrador del llamado “libro de la vida” fue presentado en cinco ruedas de prensa en Tokio, Londres, París, Berlín y Washington, coincidiendo con su publicación en las revistas *Science*¹⁶⁹ y *Nature*¹⁷⁰, y siete meses después de que fuera anunciada la lectura completa del genoma humano. El 26 de junio de 2000, el presidente de Estados Unidos y el primer ministro de Gran Bretaña realizaron al mundo el anuncio político de la secuenciación completa del genoma humano. Pero encontrar los genes, es decir, las unidades de sentido en aquella secuencia de 3 000 millones de letras resultó un proceso más complejo de lo previsto. Y el resultado ha sido una sorpresa. El genoma humano contiene poco más de 30 000 genes o regiones activas y vastas regiones desérticas y repetitivas. Además, gran parte de su material genético procede de virus y bacterias. Son muchos menos genes de los esperados para el animal más complejo del planeta: el hombre.

Después de unos diez años de trabajo y de una inversión de 3 000 millones de dólares, el consorcio internacional público Proyecto Genoma Humano (PGH) –constituido mayoritariamente por científicos norteamericanos y británicos y dirigido por Eric Lander– y su rival en la investigación, la empresa privada estadounidense Celera Genomics –dirigida por Craig Venter– entregaron por separado su versión completa a las dos principales revistas científicas, *Nature* y *Science*, respectivamente, tan rivales como los autores de este hito. Ambas secuencias coinciden en su mayor parte.

Los resultados obtenidos son sorprendentes e indicativos de un funcionamiento muy complejo. Los científicos han creído durante varios años que el genoma del hombre tenía, por lo menos, 80 000 genes. En muchas ocasiones se había llegado a hablar de hasta 150 000 genes. Sin ir más lejos, el mismo Craig Venter había publicado no hace muchos años una corrección del número de genes (que por ese entonces se pensaba que era de 120 000 a 150 000 genes). Venter y su equipo de investigadores, después de haber analizado sus primeros resultados de los datos de secuenciación, se inclinaron entonces por reducir a unos 80 000 el número de genes, pero dicha cifra deberá borrarse de los libros de texto.

Mientras que los datos descubiertos por el Consorcio público están a disposición de todo aquel que quiera consultarlo en Internet^{171,172}, Celera ha puesto restricciones a sus datos en espera de obtener beneficios económicos en un futuro. La ventaja económica que obtendría Celera vendrá en gran medida de la genómica comparativa, ya que la empresa tiene secuenciados también los genomas de muchos otros organismos, cuyo conocimiento va a ser imprescindible en este campo.

El verdadero desafío de la biología humana, más allá de averiguar cómo los genes orquestan y mantienen el mecanismo de la vida, será el de descifrar como la mente ha llegado a organizar el pensamiento lo suficientemente bien como para investigar incluso nuestra propia existencia.

Debido a la importancia que ha tenido el PGH en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la investigación de DNA, en las secciones siguientes se tratará brevemente los resultados obtenidos con el PGH.

1.1.4.1 Métodos de secuenciación utilizados

El método de secuenciación utilizado por Celera se basa en la desintegración del genoma en un conjunto aleatorio de piezas con una longitud de 2 000, 10 000 y 50 000 pb y en su clonación ¹⁶⁹. El sistema se ha bautizado como *shotgun* o “cañón de genes”, que el pasado año permitió a Celera completar la secuencia del genoma de la mosca del vinagre con una precisión del 99.99 %.

La empresa Celera Genomics utilizó muestras de DNA de tres mujeres y dos hombres (un afroamericano, un chino asiático, un hispano mexicano y dos caucasianos).

Por su parte, el consorcio público ha basado su trabajo en la duplicación de partes mayores de código humano, que luego se pueden encajar en el mapa del genoma en la región apropiada. El término cromosomas artificiales bacterianos (BAC) se refiere a las estructuras similares a los cromosomas que se construyen mediante ingeniería genética para colocar los pedazos de DNA clonados.

Varias copias del genoma se cortan en segmentos de aproximadamente 150 000 pb por digestión parcial con *endonucleasas de restricción* * específicas. Estos largos segmentos de restricción se colocan en los BACs y se insertan en las bacterias, de manera que su información se copia cada vez que la bacteria se divide. El genoma de estos clones se purifica, y cada clon se digiere completamente con endonucleasas de restricción, elegidas de manera de producir un patrón característico de fragmentos pequeños de cada clon. La comparación de los patrones revela el solapamiento entre los clones, que permite alinearlos en orden. El resultado es un mapa físico. Cada clon individual de los BACs es cortado en pequeños fragmentos y clonado. Estos subclones más pequeños son luego secuenciados y ordenados.

1.1.4.2 Resultados del Proyecto Genoma Humano

Sólo el 1.4 % del genoma humano codifica para proteínas

El borrador del genoma analiza la secuencia del 90 % de la eucromatina (que se tiñe débilmente, y que es rica en genes) y que ha sido determinada con un 99.9 % de fiabilidad. Las regiones heterocromáticas del genoma se han ignorado deliberadamente, porque están mucho más condensadas y confunden a las máquinas secuenciadoras. Además, no es muy probable que contengan instrucciones importantes. Se tardará años en organizar la secuencia completa, cotejar la verificación de los resultados y rellenar las lagunas. Sólo entonces estará completo el genoma y no se hablará de borrador. Hasta ahora se ha secuenciado cada par de bases una media de cuatro veces.

El tamaño estimado de todo el genoma es de 3.2 Gb. De esto, aproximadamente 2.95 Gb corresponde a eucromatina. De ello, sólo 1.1 %-1.4 % se corresponde con secuencias que codifican proteínas constituyendo los denominados exones. Este porcentaje representa sólo el 5 % del 28 % de la secuencia que se transcribe a RNA, con lo que una tercera parte del patrimonio genético está dedicada a la codificación de proteínas humanas. Por tanto, los genes codificantes no aparecen agrupados a lo largo de la secuencia, sino que están desparramados a lo largo de ella, y separado por otras regiones genéticas que no se expresan, es decir, son mudas, constituyendo los denominados intrones. La función de los intrones es de actuar como controladores de las regiones que sí se traducen luego en proteínas. Estos intrones silentes constituyen casi un 30 % de todo el genoma.

El número de bases del genoma humano completo es de 3300 millones de pb y mide desarrollado dos metros de longitud. De ellos, sólo 2.5 cm aportan la información genética necesaria para la supervivencia.

Si todo el DNA del cuerpo humano se desenrollara, se haría 600 veces el trayecto entre la Tierra y el Sol. La información llenaría una pila de libros de 61 metros de altura o 200 guías telefónicas de 500 páginas cada una.

El número de genes humanos es de aproximadamente 30 000

Los científicos que han examinado este primer bosquejo han quedado muy sorprendidos, ya que el número de genes oscila entre 30 000 y 40 000 genes (según el Consorcio Público Internacional)¹⁷⁰, y entre 26 000 y 34 000 (según la compañía privada estadounidense Celera)¹⁶⁹. A pesar de la complejidad de la estructura y el comportamiento humano, el número de genes es comparable al existente en genomas mucho más pequeños. La *Drosophila*, polular mosca de la fruta, contiene unos 13 000 genes. El gusano *C. elegans*, unos 18 000, y la primera secuencia completa de una planta superior, la *Arabidopsis*, o la planta de la mostaza, unos 26 000. La secuencia del genoma del ratón revela que entre estos mamíferos y el hombre hay apenas 300 genes de diferencia. Esto implica que el número de los genes humanos superarían apenas en número a animales inferiores o a plantas. Cuando se complete el genoma del chimpancé es factible que se averigüe que únicamente un puñado de genes y proteínas son las que han permitido a la especie elegida el poder hablar, razonar, reflexionar y elegir su destino libremente.

Los genes humanos, que son menos numerosos de los que se esperaba, se encuentran muy separados entre sí. Como media, existen 12 genes por millón de pb de DNA humano, en comparación con los 117 de la mosca del vinagre, los 197 del gusano y los 221 de la planta *Arabidopsis*. Encontrar auténticos genes entre el amalgama de DNA sin sentido ha resultado una dura prueba para los programas informáticos actuales.

Esta claro que no existe una correlación entre la complejidad de un organismo y la cantidad de genes que tiene. Los científicos aún no tienen respuestas convincentes para explicar cómo de genes similares en número y composición pueden formarse organismos aparentemente tan distintos como un gusano invertebrado, una mosca y un ser humano, pese a que todos evolucionaron de un organismo unicelular ancestral.

Se desconoce aún la función de un 40 % de los genes identificados.

La presunción de que el ser humano, un animal inteligente y el más complejo de todo el reino animal, tenía que tener forzosamente un número elevado de genes, ha quedado hecha añicos. La influencia ambiental podría ser mucho mayor de la estimada hasta el momento.

El DNA parásito constituye más de la mitad de todo el genoma humano

Los científicos han analizado el resto del genoma humano sin aparente función biológica, llamado DNA basura o parásito. Uno de los hallazgos más importante es la abundancia de unos elementos, los retrotransposones. Se trata de componentes genéticos que recuerdan a los retrovirus, familia a la que pertenece el virus del HIV, y que tienen la capacidad de saltar de un sitio a otro del genoma creando copias de sí mismos, aunque la mayoría de los que tenemos están defectuosos, ya que han perdido su movilidad con el transcurso del tiempo. El DNA parásito proviene de la transcripción reversa del RNA. Estos elementos de DNA parásito constituye más de la mitad de todo el genoma humano, junto con otros fragmentos de secuencias repetidas. Es evidente que este

material ha sido más importante en la historia evolutiva de nuestra especie de lo que se creía ¹⁷³. Además, debido a su abundancia, su presencia sugiere que el genoma no es un sistema fijo, sino algo muy dinámico que cambia.

El concepto de DNA basura –es decir, de largas secuencias que aparentemente no sirven para nada ya que no codifican para proteínas como los genes– también ha de ser desterrado a la luz de la abundancia de estos transposones, ya que algunos de ellos pudieron cumplir una función muy importante a la hora de construir genes funcionales en el genoma.

Una de las funciones del DNA parásito que guarda un cierto parecido con los genes víricos resulta profundamente paradójica ya que, según los nuevos resultados, permite al cuerpo humano generar un número enorme de receptores inmunológicos que permiten reconocer muchos virus y bacterias extraños, y parece ser que se debe a un par de transposones que aparecieron en el genoma hace muchos millones de años.

Sólo 94 proteínas codificadas son específicas de animales vertebrados

De las 1278 familias de proteínas codificadas por el genoma, tan sólo unas 94 son específicas de los animales vertebrados. El resto son proteínas habituales en los mal llamados animales inferiores, propios de las levaduras y bacterias. Las reglas sagradas que permiten la vida, como el metabolismo, la transcripción del DNA en RNA que luego son traducidos a proteínas, o la habilidad que tiene el DNA para replicarse, están fijadas y preservadas en la evolución.

La diferencia entre los gusanos y las personas radica más en la enorme complejidad de las proteínas que generan nuestro cuerpo que en el número de genes. Hay muchos menos genes humanos de los esperados, pero estos son mucho más complejos de lo que se pensaba. Un número pequeño puede codificar para un número grande de proteínas, ya que un solo gen puede codificar para más de una proteína.

Los científicos han tenido que abandonar una de sus ideas más arraigadas: que la complejidad en la escala animal se basa en el número de genes.

Los genes humanos están altamente fragmentados

Otro motivo por el que resulta difícil detectar los genes humanos es que, en comparación con los genes de otras criaturas, se encuentran muy fragmentados.

Aparentemente no importa la cantidad de genes que se tengan, sino como se usan. La fragmentación de los genes humanos hace posible que se construyan muchas proteínas distintas a partir de los mismos genes, mediante la combinación de las instrucciones de formas diversas. Según parece, como mínimo el 35 % de todos los genes humanos se pueden leer de muchas formas. De esta manera, el genoma humano podría codificar cinco veces más proteínas que el genoma menos flexible de la mosca del vinagre o del gusano.

Se certifica la teoría de la evolución de Darwin

Los primeros análisis del genoma del hombre también están sirviendo para certificar la hipótesis de Darwin del evolucionismo. Tenemos 220 genes que se parecen mucho a los de las bacterias. Se cree que esos genes se han transferido directamente a los humanos por las bacterias, y las proteínas que codifican parecen estar implicadas en el metabolismo de los antibióticos y de los agentes neurológicamente activos. Este hallazgo rompe las ideas preconcebidas sobre las barreras

existentes entre especies, ya que existen genes que saltan entre organismos tan diversos como una bacteria y un ser humano.

Dos seres humanos son idénticos en un 99.9 %

Los resultados ponen dudas sobre la corriente ideológica del determinismo biológico, expresado en corrientes racistas y xenófobas, ya que todos los seres humanos de la Tierra son genéticamente idénticos en un 99.9 %. La idea de que las características de la personalidad están estrechamente ligadas al genoma se puede considerar falsa, ya que no hay suficientes genes para pensar que existe un único segmento de DNA que justifique la homosexualidad, el alcoholismo o la agresión. Los hombres no son prisioneros de sus genes, y las circunstancias de la vida de cada individuo son cruciales en la personalidad.

La diferencia entre cualquier persona del planeta estriba en un 0.1 % de bases genéticas. Eso significa que existen 3 millones de diferencias genéticas a lo largo del genoma entre una persona y otra.

El mapa genético contiene 1.42 millones de nucleótidos diferentes (bases químicas) en la doble hebra, lo que se describe como polimorfismos (SNP, en inglés *single nucleotide polymorphisms*), que se corresponde con un número igual de variaciones en la otra hebra enfrentada ¹⁷⁴. La mayoría de las diferencias entre la gente se explica por estos SNPs. Estos 1.4 millones de diferencias entre el genoma de dos individuos distintos presenta como desafío establecer la importancia en la susceptibilidad a sufrir ciertas enfermedades, y cómo estas “escasas” diferencias se traducen en una personalidad concreta.

La mayoría de las empresas farmacéuticas confían en que será el estudio de los SNPs lo que las conducirá a una nueva forma de tratar los pacientes de manera individual, ya que de estas pequeñas variaciones genéticas depende que una persona sea sensible o no a un determinado fármaco.

Lo que se llama raza refleja unas pocas características determinadas por una minúscula fracción de nuestros genes. Esos pocos genes, responsables del color de la piel o de la forma de los ojos, no dan ninguna indicación sobre el resto de la composición genética del individuo. Así, se puede dar a menudo el caso de que dos personas de la misma raza, y que se parecen superficialmente, están menos relacionados entre sí genéticamente de lo que pueden estarlo dos personas de razas distintas, y que pueden parecer muy diferentes superficialmente.

Se han revelado mutaciones que determinan enfermedades y genes que están relacionados con el envejecimiento y con el cáncer

Se han conocido casi 1 000 mutaciones que determinan la forma en que caeremos enfermos y en que período de la vida ocurrirá ¹⁷⁵. Este estudio consistió en identificar cada uno de los genes causantes de enfermedades genéticas. De esta lista, se hizo un análisis para cada una de las proteínas codificadas por estos genes y, de forma paralela, se estudió las características de esas enfermedades, como la edad de inicio de los síntomas, las formas de herencia, la frecuencia en la población y el impacto en la longevidad del paciente. Cabe destacar que los primeros 423 genes se extrajeron de bancos genéticos previos, y el resto, hasta contabilizar unos 1000 genes, fueron deducidos del borrador que presenta la revista Nature. De estos 1000 genes se conoce la función, la enfermedad que producen, y la ubicación que tienen en los cromosomas. De estas enfermedades, en función del momento en que la célula elabora las proteínas anómalas, la patología va a manifestarse

ya durante la etapa fetal y en los primeros nueve meses de vida (143 genes identificados), durante el primer año (234 genes identificados), en los años que siguen hasta la adolescencia (247 genes identificados), la edad adulta (225 genes identificados), o la época que discurre tras pasada la cincuentena (18 genes identificados).

Además, se cree que el desgaste de los telómeros está relacionado con el envejecimiento y con el cáncer ¹⁷⁶. Los telómeros son los extremos de los cromosomas humanos, y su secuenciación no fue incluida en el primer borrador del genoma presentado por tener propiedades únicas que los hacen especialmente difíciles de analizar. Suponen menos del 1 % de la secuencia, pero se cree que su desgaste está relacionado con el envejecimiento y con el cáncer. Cuando la maquinaria celular que los mantiene se daña, la célula no se divide correctamente y puede surgir el cáncer. Los telómeros también contienen genes, algunos conocidos y otros por descifrar. Los telómeros encierran aún muchas incógnitas por descubrir.

La secuencia genética permitirá a los expertos localizar, en uno o dos años, el 90 % de los genes implicados en tumores humanos, mediante la comparación base a base de las secuencias genéticas derivadas de las células cancerosas con las de las células sanas.

Todos los tipos de cáncer están causados, en última instancia, por una anomalía en la secuencia genética. Estas mutaciones, causadas en su mayoría por agentes externos, terminan por convertir a una célula y sus hijas en cancerosas ¹⁷⁷. Con el borrador del genoma humano se conocen entre 130 y 150 genes anómalos que están implicados en producir uno o varios tipos de cáncer, pero no su posición.

A partir de ahora se requiere la secuenciación de los tumores, ya que se dispone de la secuencia normal. El nuevo mapa genético permitirá promover avances médicos tales como diversas pruebas diagnósticas y terapias dirigidas a los fragmentos genéticos que contienen las mutaciones que degeneran en cáncer.

El cromosoma Y es más sencillo que el cromosoma X

El cromosoma Y, que define el sexo masculino, es más pequeño y mucho más simple que su homólogo femenino, el cromosoma X. Además, está plagado de genes silenciosos, secuencias repetidas y DNA basura, por lo que es mayoritariamente no funcional ¹⁷⁸.

El cromosoma Y contiene muchos menos genes que su homólogo femenino, aunque sus genes son de gran interés y tienen importantes funciones, ya que codifican para el desarrollo de los testículos y tienen gran importancia en la fertilidad masculina. El cromosoma Y quizás tenga una docena de genes frente a los 2 000 del cromosoma X.

Un hecho curioso es que el 95 % del cromosoma Y no se recombina durante la meiosis. La historia evolutiva del cromosoma Y refleja una dependencia del cromosoma X, que pudo comenzar hace 300 millones de años, cuando aún no había mamíferos en la Tierra y no había determinación genética del sexo. Una mutación en uno de estos dos cromosomas hizo que a lo largo del tiempo disminuyera el intercambio genético entre los dos cromosomas. Como resultado, el Y se fue diferenciando de su homólogo X y, al quedar restringida su capacidad de intercambio genético, los genes masculinos acumularían mutaciones, como si de un vertedero se tratara, que les pondrían en un callejón sin salida, condenándolos al silencio. Se cree que entre un 10 % y un 25 % de la infertilidad masculina se debe a defectos del cromosoma Y. El cromosoma Y ha quedado restringido a

genes esenciales y poco más que para determinar el sexo. La función de estos genes podría ser asumida por otros cromosomas. ¿Desaparecerá el símbolo genético de la masculinidad?

Se presenta el primer mapa físico de todos los cromosomas humanos

El consorcio público presenta por primera vez una geografía muy detallada de todos los cromosomas, incluyendo los cromosomas 1, 6, 9, 10, 13, 20 y X¹⁷⁹, el cromosoma Y¹⁷⁸, el cromosoma 12¹⁸⁰, el cromosoma 14¹⁸¹ y las regiones teloméricas¹⁷⁶.

El método utilizado (BAC), se basa en trocear el DNA humano en fragmentos de entre 100 000 y 200 000 bases de largo, marcar estos fragmentos para su identificación y armar un puzzle de 3 000 millones de bases de las que está compuesto el genoma humano mediante su ensamblaje en las posiciones en los cromosomas¹⁸².

Se ha desvelado algunos genes que predisponen a las toxicomanías y adicciones

La secuencia del genoma humano permitirá entender la biología que predispone a caer en toxicomanías y adicciones al alcohol o al tabaco, mediante la identificación de los genes que contribuyen al riesgo individual de adicción, y aquellos sobre los cuales las drogas causan adicción¹⁸³.

Aunque la adicción implica factores psicológicos y sociales, también depende de un proceso biológico: los efectos de la exposición repetida a una droga en un cerebro vulnerable.

Existen tres factores claves en la adicción: la tolerancia, por la cual una persona es cada vez menos sensible a la acción de una droga, la sensibilidad a esa droga, y la dependencia, por la que la exposición a las drogas genera el síndrome de abstinencia.

Los receptores cerebrales, que son las puertas de entrada en las que actúan las drogas son, en esencia, proteínas y, como tales, están codificadas por genes.

Se conocen los genes implicados en el ciclo circadiano

Se desvelan entre 8 y 10 genes clave en el funcionamiento del ciclo circadiano (reloj biológico humano)¹⁸⁴. Los problemas en el funcionamiento de este reloj biológico (ubicado en la parte anterior del hipotálamo, denominada núcleo supraquiasmático) son los que contribuyen a desórdenes en el sueño, insomnio y multitud de alteraciones psiquiátricas. Los genes candidatos del funcionamiento del reloj biológico se localizan en los cromosomas 17, 12, 4, 11 y 22.

Estos genes codifican proteínas que participan en complicados ciclos moleculares de retroalimentación, que a su vez afectan a otras proteínas en un engranaje biológico todavía desconocido.

1.1.4.3 Consecuencias del proyecto genoma humano

La secuenciación del genoma humano traerá como consecuencias cambios determinantes para la salud y la medicina. En un futuro, este primer borrador será más comprendido. Podremos saber cómo están organizados los diferentes tipos de secuencias, el número exacto de genes que poseemos y que proteínas codifican, sabremos que mutaciones o cambios de la secuencia están implicados en la mayoría de las enfermedades, descubriremos en qué momento, en qué tejidos y en qué órganos se expresan los distintos genes. Sabremos con mayor detalle como funcionan y cómo se regulan los genes. Profundizaremos más en nuestra historia evolutiva y nuestros orígenes. Muchas de sus consecuencias llevan a definir prioridades y a poner límites éticos mediante la legislación.

Algunas de las consecuencias directas del proyecto genoma humano son:

- Diagnóstico prenatal y preimplantatorio. Permitirá seleccionar embriones sanos o con determinadas características para su posterior implantación por fecundación *in vitro*.
- Tratamiento contra el cáncer. Del conocimiento de los genes tumorales dependerá el futuro tratamiento del cáncer. Mediante la utilización de oncochips (§ 1.3.1.2), se conocerá el perfil genético de cada tumor y permitirá saber su pronóstico y que tratamiento es el más adecuado.
- Desarrollo de la farmacogenética. Los seres humanos no responden igual a los fármacos. En un futuro, antes de recetar un producto contra una enfermedad, se averiguará el genotipo del enfermo para recomendar el medicamento que mejor convenga a un paciente en particular.
- Medicina predictiva. A pesar de que la mayoría de las enfermedades comunes no son estrictamente hereditarias, cuando se profundice en el genoma se irá conociendo genes de susceptibilidad a patologías, que permitirán tomar medidas preventivas gracias al diagnóstico precoz.
- Fisiopatología molecular. Aparecerá como una nueva disciplina fundamental en la Medicina, y consiste en el conocimiento de cómo actúan los genes en las enfermedades.
- Terapias génicas. Se sustituirá un gen defectuoso por el gen sano.
- Clonación terapéutica. Se introducirán genes normales en embriones clónicos y a partir de ellos se diferenciarán tejidos u órganos sanos para trasplantes.
- Desarrollo de tecnología diagnóstica y de chips de DNA ¹⁸⁵. Los chips de DNA (§ 1.3.1) pueden diseñarse de muchas formas, pero el ideal consistirá en una placa de 180 X 180 celdas minúsculas con un trozo de cada gen humano en cada celdilla. El médico podrá utilizarlo para conocer los cientos o miles de variaciones en la actividad de sus genes.

1.2 TÉCNICAS CLÁSICAS DE ANÁLISIS DE DNA

En esta sección se explicarán brevemente las metodologías clásicas de análisis por hibridación del DNA. Se describirán las técnicas clásicas de biología molecular y sus principales herramientas: *dot (slot) blot* * (§ 1.2.3.2); *dot blot reverso* * (§ 1.2.3.3); utilización de *enzimas de restricción* *, *electroforesis* * y *southern blot* * (§ 1.2.3.1); técnicas de amplificación como la *reacción en cadena de la polimerasa (PCR)* * (§ 1.2.2).

Las técnicas de análisis clásicas de DNA pueden clasificarse y sistematizarse de diferentes maneras, aunque cabe destacar que determinados pasos están interrelacionados y pueden combinarse en función del problema analítico que se tenga ¹⁰.

Básicamente, hay tres tipos de metodologías de hibridación entre un gen (secuencia analítica de interés) y la sonda (su secuencia complementaria) en función de la localización de las partes intervinientes en la reacción de hibridación. Las tres técnicas generales que se utilizan son:

- 1) Hibridación en solución u homogénea ¹⁰: cuando tanto la sonda como la secuencia a analizar se encuentran en solución y, por lo tanto, la reacción de hibridación ocurre en este medio.
- 2) Hibridación *in situ* ¹⁰: cuando la secuencia analítica de interés está en una célula o tejido ^{162,163} (preparación citológica)

- 3) Hibridación en *membranas o filtros*⁹⁻¹³: cuando una de las secuencias (que puede ser la sonda o el gen a investigar, según el formato del análisis) se encuentra inmovilizada en un soporte sólido (membrana)

En esta sección, se van a describir con mayor amplitud las hibridaciones en membranas, aunque se explicará brevemente la hibridación *in situ* y la hibridación homogénea .

Debido a que la hibridación *in situ* aporta datos que no pueden conocerse con las otras dos metodologías, su importancia ha ido en aumento, convirtiéndose en una herramienta importante en biología celular y molecular. La principal diferencia entre las hibridaciones convencionales (en solución o en membranas) y la hibridación *in situ*¹⁰, consiste en que en las primeras se aíslan los ácidos nucleicos de una población de células y, por lo tanto, se promedia la información de cada célula individual respecto a la contribución total de la población celular, mientras que en la segunda se estudia la información molecular de cada célula individual en un tejido o en una población de células¹⁶³. Los principales usos son: evidenciar el grado de expresión de genes particulares^{162,163}; detectar infecciones víricas o bacterianas en un tejido –por ejemplo, la detección vírica en un tejido cerebral con esclerosis múltiple¹⁴ –; localizar genes particulares en determinados cromosomas; pruebas clínicas de aneuploidía celular (por ejemplo, del cromosoma Y); determinación del sexo en embriones¹⁸⁶, entre otras.

La hibridación en solución u homogénea ha cobrado relevancia desde la aparición de los *beacons* moleculares (§ 1.1.2). Las características especiales de estas sondas las hacen idóneas para poder realizar hibridaciones sin necesidad de inmovilizar el DNA en un soporte³⁹. En este principio se basa la cuantificación durante la PCR^{39,40} (§ 1.2.2).

Antes de desarrollar cada una de las metodologías de análisis de hibridación en membrana, se describirán el tipo y el tratamiento de muestras para un análisis genético.

1.2.1 MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO. PREPARACIÓN

Existe una amplia gama de fuentes de DNA para análisis genético.

Entre ellas se puede citar¹⁰⁻¹³:

- *Tejidos frescos* (sangre entera, células epiteliales bucales, folículos pilosos, células de líquido amniótico y de vellosidades coriónicas, fibroblastos de cultivo tisular).
- *Muestras secas* (manchas de sangre y semen, pulpa dental y médula ósea).
- *Muestras pretatadas* (autopsias humanas, tejido de vísceras, tacos de biopsias, carne congelada de animales).

Los pasos a seguir frente a una muestra biológica que va a ser analizada son⁹:

- Toma de muestra
- Etiquetado
- Conservación
- Extracción del DNA

Para las metodologías de análisis de hibridación en membrana (a diferencia de las hibridaciones *in situ*), es necesario extraer el DNA para su análisis. El objetivo principal de la extracción del DNA consiste en la recuperación de ácidos nucleicos de alto peso molecular en ausencia de proteínas e inhibidores de las enzimas de restricción.

Si se parte de sangre entera (una de las muestras más frecuentes), se debe considerar que el DNA se encuentra sólo en las células nucleadas del tejido sanguíneo (glóbulos blancos o leucocitos). Los pasos a seguir para la extracción son:

- Hemólisis en medio hipotónico. En estas condiciones los eritrocitos (no nucleados) son *lisados* * y eliminados con el plasma.
- Lavado de los glóbulos blancos (linfocitos, neutrófilos, basófilos y monocitos)
- Lisado de los leucocitos: en solución con SDS (detergente que ayuda a romper membranas celulares) y EDTA (quelante de cationes divalentes que inhibe las *DNAasas* * liberadas durante la lisis celular, que pueden degradar el DNA a nucleótidos) y *proteasas* * (que degradan las proteínas).
- Separación del DNA de proteínas y demás restos celulares por extracción orgánica (con fenol) o no orgánica (con NaCl o LiCl). Adición de cloroformo para eliminar restos de fenol, en caso de extracción orgánica.
- Precipitación alcohólica del DNA de la solución acuosa salina de cationes monovalentes.
- Cuantificación y verificación del DNA: se resuspende el DNA y se cuantifica por espectroscopía UV a 260 y 280. Se verifica su grado de fragmentación mediante electroforesis en gel de agarosa.

Si la muestra de la que se parte es un tejido (músculo, hígado) o una mancha seca (sangre o esperma), las células son lisadas y las proteínas degradadas por acción de *Proteinasa K* *. La desproteínización y precipitación del DNA se lleva a cabo de igual manera que en sangre entera.

Antes de proceder a un análisis genético, es necesario tener en cuenta la cantidad de muestra que se dispone, o dicho de otra manera, la cantidad de DNA presente en la muestra, ya que si éste es escaso, los límites de detección de las metodologías serían insuficientes para un análisis confiable.

Dependiendo del tipo de muestra en cuanto a la cantidad de material genético que contiene, es necesario tener en cuenta que la sangre entera posee cantidad de DNA suficiente como para poder ser detectadas con estas metodologías. Otras muestras como epitelio bucal, bulbos de pelo, vellosidades coriónicas, células de líquido amniótico, saliva o manchas secas de esperma o sangre, requieren un paso previo de amplificación del DNA mediante PCR. Las células del líquido amniótico (procedentes de una amnioscintesis), pueden cultivarse y así amplificarse mediante cultivo celular, y los fibroblastos derivados del cultivo pueden ser analizados por estas metodologías 9. El proceso de amplificación mediante cultivo celular difiere respecto a la PCR principalmente en que todo el genoma se reproduce, además de que es un proceso que tarda como mínimo dos semanas, mientras que la reacción en cadena de la polimerasa requiere sólo unas horas y sólo amplifica la región de interés. En la siguiente sección se explicará brevemente la técnica de amplificación de DNA más utilizada: PCR.

1.2.2 AMPLIFICACIÓN DEL DNA. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En 1983, Kary Mullis (Premio Nobel de Química, 1993) ideó una metodología para duplicar hebras de DNA de manera artificial, que ha cambiado el curso de biología molecular ^{187,188,189}. El concepto de la amplificación de DNA por PCR es muy simple, pero su impacto ha sido extraordinario por ser una metodología rápida, económica, y un medio sencillo para la obtención de microgramos de DNA a partir de cantidades indetectables por los métodos utilizados hasta el momento.

Gracias a la PCR, las cantidades ínfimas (y antes insuficientes) de DNA dejaron de ser una limitación para procedimientos de diagnóstico e investigación del DNA.

La PCR es una técnica de síntesis enzimática (*in vitro*) de secuencias definidas de DNA por la extensión simultánea de *cebadores* * (en inglés, *primers*) complementarios a las hebras de DNA de la muestra. La reacción utiliza dos *oligonucleótidos* * (cebadores), que se hibridan a las cadenas complementarias de DNA de manera que flanquean la secuencia de DNA que se desea amplificar. La elongación de los cebadores es catalizada por una enzima llamada *Taq DNA polimerasa* *, cuya principal peculiaridad es ser estable al calor. Se aísla de una bacteria termófila (*Thermus aquaticum*). En general, la DNA polimerasa lleva a cabo la síntesis de una cadena complementaria de DNA en la dirección 5'→3' usando una hebra simple de molde, pero comenzando su polimerización desde una región de doble hebra, en donde se ha hibridado el cebador complementario a esa región. Esta es la reacción de extensión del cebador.

La PCR utiliza el mismo principio, pero emplea dos cebadores, uno complementario a una de las hebras del DNA, y el otro, complementario a la otra hebra de DNA, que han sido separadas de su estructura de doble hélice por calor. Los cebadores se seleccionan de manera tal que la polimerización a partir de cada cebador se dirige hacia el sentido donde se encuentra el otro, es decir, los cebadores deben hibridarse en la posición 5' de cada una de las hebras de DNA flanqueando la región a amplificar. El resultado es la síntesis *de novo* de la región de DNA flanqueada por los dos cebadores.

La PCR es, entonces, una metodología analítica que se realiza por repetición de un ciclo que involucra tres pasos:

- la separación de las dos hebras complementarias de DNA analito que sirve de molde;
- la hibridación de los cebadores;
- la extensión de los mismos por la *Taq DNA polimerasa*.

Los pasos de cada ciclo se consiguen simplemente variando la temperatura de la mezcla de reacción. Esto resulta en la acumulación del fragmento específico de DNA que se desea amplificar, flanqueada por los dos cebadores.

Debido a que el producto generado por extensión de los cebadores sintetizado durante un ciclo determinado puede servir como DNA analito en el próximo ciclo, el número de copias de la secuencia de interés aproximadamente se dobla durante cada ciclo. Por lo tanto, 20 ciclos de PCR rinden cerca de 1 millón de copias (2^{20}) del DNA analito.

Una vez obtenido el DNA de la muestra que se desea analizar, cada ciclo consta de los siguientes pasos (Figura 1.14):

1- Calentamiento a 95 °C

Permite que las dos hebras complementarias de DNA que sirven de molde, se separen (o se deshidribden).

Deshibridación inicial: es importante que el DNA de la muestra se separe completamente en la primera deshibridación, y debido a su longitud, es conveniente que la primera vez se mantengan los 95 °C durante unos cinco minutos. Si al comienzo de la PCR el DNA se separa sólo parcialmente, tiene tendencia a rehibridarse en el paso posterior dificultándose, por lo tanto, la reacción de cada hebra con los cebadores.

Deshibridación durante los ciclos de PCR: Es suficiente mantener esta temperatura durante 20 a 30 segundos.

2- Enfriamiento a 37 °C

Aproximadamente a esta temperatura, los cebadores se unen a las hebras complementarias de DNA flanqueando la secuencia que se desea amplificar. Para la mayoría de los propósitos, la temperatura de hibridación de los cebadores debe optimizarse empíricamente, ya que es el factor más crítico en cuanto a la especificidad de la reacción. Además, es una temperatura de compromiso. Si la temperatura es demasiado alta, la tendencia es a la deshibridación y no a la hibridación, pero si la misma existe, es muy específica a alta temperaturas. Por otro lado, si la temperatura es demasiado baja, existe hibridación inespecífica.

3- Calentamiento a 72 °C

Es la temperatura óptima de acción de la Taq DNA polimerasa para la elongación de los cebadores, mediante la incorporación específica de monómeros de desoxirribonucleótidos complementarios al extremo del cebador generándose, entonces, dos copias idénticas del DNA analito. En cuanto al tiempo que esta temperatura debe mantenerse, normalmente 20 segundos son suficientes para hebras de longitud habitual. La Taq polimerasa puede adicionar 60 bases/seg a 72 °C.

Cada ciclo (pasos 1, 2 y 3) puede repetirse tantas veces como DNA se quiera obtener, existiendo un número de ciclos óptimos para la reacción (25 a 35 ciclos).

4- Extensión final

Usualmente, luego del último ciclo, los tubos de reacción se mantienen a 72 °C de 5 a 15 minutos, con el objeto de que se completen productos con extensiones parciales.

Los requerimientos de la reacción son muy simples:

- DNA muestra
- cebadores
- desoxirribonucleótidos trifosfatos: dan la energía y el sustrato para la reacción
- DNA polimerasa termorresistente
- solución amortiguadora que contenga Mg: catión necesario para que la enzima funcione.

Tanto los cebadores como desoxirribonucleótidos trifosfatos se encuentran en franco exceso. El equipamiento necesario para la reacción es un termociclador, que permite obtener las temperaturas

deseadas rápidamente, de manera reproducible y precisa. La velocidad de calentamiento/enfriamiento de estos equipos es de 1 a 2 °C por segundo.

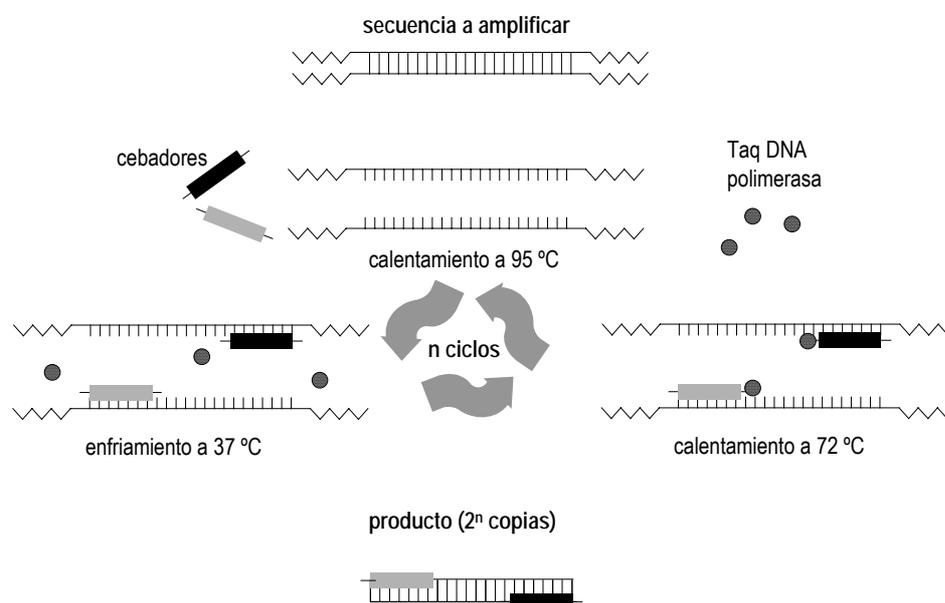


Figura 1.14. *Reacción en cadena de la polimerasa.* En la figura se observan los tres pasos de la amplificación. *Calentamiento a 95 °C:* permite la separación de las dos hebras complementarias de DNA analito que sirve de molde. *Enfriamiento a 37 °C:* permite la hibridación de los cebadores. *Calentamiento a 72 °C:* permite la extensión de los cebadores por la Taq polimerasa. En cada ciclo (constituído por estos tres pasos), se duplica el número de copias.

Además del uso de la PCR para amplificar secuencias de DNA de interés analítico, otra aplicación importante consiste en utilizarla para producir marcación de secuencias de interés ^{10,14,165,167,168}. Estas secuencias pueden ser tanto sondas sintéticas (que al mismo tiempo se consigue marcar y amplificar), como muestras reales. En este último caso, se consiguen copias marcadas idénticas a la secuencia analítica de la muestra, que se incorporarán al sistema de detección.

La introducción de marcas durante la reacción de amplificación de la PCR se puede producir mediante la incorporación en la reacción de dos tipos de reactivos marcados diferentes: o bien, los cebadores (Figura 1.15, A), o bien los nucleótidos (Figura 1.15, B).

Las marcas así introducidas pueden ser radiactivas (P^{32}) o no radioactivas. La marcación no radioactiva de los cebadores puede realizarse con biotina ²⁸, con digoxigenina, o con una amplia gama de moléculas fluorescentes ^{22,23}, o bien directamente con enzimas (peroxidasa o fosfatasa alcalina). La marcación de los nucleótidos suele realizarse con biotina o con digoxigenina.

Cuando se usa marcación mediante incorporación de desoxirribonucleótidos trifosfato, normalmente se utiliza dUTP marcado. El dUTP marcado reemplazaría los sitios ocupados por dTTP durante la síntesis y el producto de la amplificación llevaría incorporada la marca.

Un avance importante en la PCR lo constituye la posibilidad de cuantificación del producto amplificado. Esto ha sido posible mediante la utilización de *beacons* moleculares ^{39,40} (§ 1.1.2) como cebadores. La estructura particular de los *beacons* hace posible que la hibridación entre el cebador y el analito genere fluorescencia. Así, cuanto mayor sea la intensidad de la fluorescencia, mayor

cantidad de cebadores se encuentran formando dúplex, es decir, hay mayor cantidad de producto amplificado.

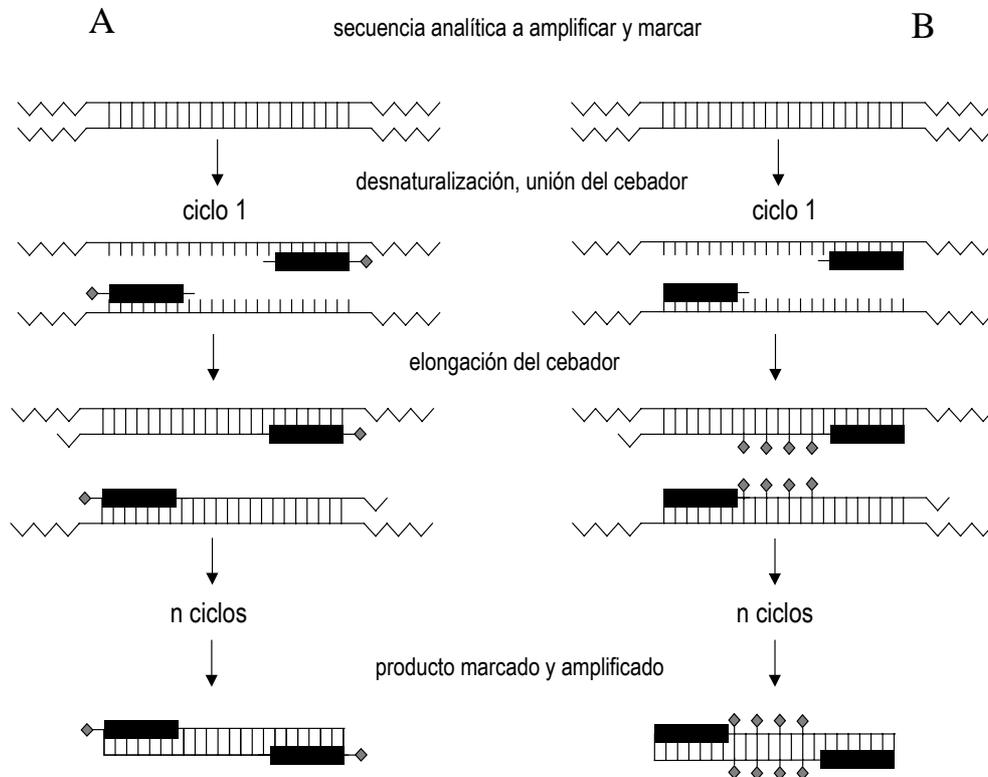


Figura 1.15. *Marcaje de secuencias de DNA mediante PCR. A) utilizando cebadores marcados. B) utilizando desoxirribonucleótidos trifosfato marcados*

1.2.3 PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS EN MEMBRANA

En el Cuadro 1.1 se resume las distintas metodologías de análisis en membranas. En función del problema analítico y el tipo de información que se desee obtener, se elige una u otra técnica. Cabe destacar que para este tipo de análisis se parte de DNA de las muestras extraído y purificado, según se explicara en § 1.2.1.

1.2.3.1 Southern blot

Esta metodología se divide en varios pasos ^{9-14,16,17,131,133,190-192}:

- 1) Corte específico de DNA en fragmentos mediante enzimas de restricción. Cuando se trabaja con DNA de una muestra biológica es necesario, antes de realizar la electroforesis, cortar el DNA en fragmentos de distintos pesos moleculares, hecho que va a hacer posible su posterior identificación. Para este fin, se utilizan enzimas de restricción, que reconocen determinada secuencia de nucleótidos y escinden al DNA en estas secuencias específicas, generándose *fragmentos de restricción**.

- 2) Separación de los fragmentos de restricción por su PM mediante electroforesis en gel. La electroforesis se basa en la migración de especies en un soporte mediante la aplicación de un campo eléctrico. Este soporte hace que se discriminen las especies por su PM. Cada fragmento migra diferentes distancias generando un *patrón de bandas* *. Los geles que se utilizan son normalmente de agarosa o de poliacrilamida.
- 3) Transferencia del gel a membranas de nylon o nitrocelulosa (*Transferencia de Southern* *). Los geles son difíciles de manejar debido a su débil consistencia, por lo que para trabajar es conveniente hacerlo en membranas físicamente resistentes (nylon o nitrocelulosa). Las *bandas de DNA* * previamente separadas se transfieren a estas membranas mediante capilaridad, respetándose el patrón de migración electroforético generado en el gel.



Cuadro 1.1. Metodologías clásicas de análisis de DNA en membrana

Posteriormente, se procede a la hibridación de la membrana de nitrocelulosa o nylon (§ 1.2.4) y a la posterior detección de las bandas obtenidas, lo que se denomina *mapa de restricción* *.

La metodología de Southern blot tiene numerosas aplicaciones. Por ejemplo, se utiliza en casos de pruebas de identidad. Estas pruebas tienen gran importancia en resolución de casos forenses y en filiación *.

Este concepto fue establecido en 1980 debido a la observación de *locus* * de DNA altamente *polimórficos* * caracterizados por *fragmentos de restricción de longitud variable (RFLP)* *. El concepto de polimorfismo se refiere a diferentes formas (alelos) de un locus determinado en una población. Un locus se considera polimórfico si el alelo más común se presenta en ese locus con una frecuencia de menos del 99 % en una población determinada. Los RFLP se generan al actuar enzimas de restricción en determinados sitios de la molécula de DNA, denominados *sitios de restricción* *.

Los fragmentos de restricción son la base para diferenciar una persona de otra debido a que los sitios de restricción varían entre dos individuos distintos. Esto es el fundamento de las pruebas de identificación, y se debe a que:

- algunos sitios de restricción son polimórficos.
- los sitios de escisión flanquean *secuencias repetidas en tandem* *, y el número de repeticiones varía de un individuo a otro (*número variable de repeticiones en tandem (VNTR)* *)
- inserciones o deleciones de nucleótidos que han ocurrido en sitios de restricción fijos.

Resumiendo y para concluir, si se trata con enzimas de restricción muestras procedentes de individuos distintos, los fragmentos generados serán diferentes en cuanto a su longitud y, por lo tanto, tendrán patrones de banda electroforéticas diferentes, hecho que permitirá diferenciarlos. Cada persona posee un mapa de restricción característico, que permite identificarla.

1.2.3.2 Dot (slot)-blot

En el dot-blot ¹⁹³ y slot-blot directamente se aplica la muestra de DNA en una membrana de nylon o nitrocelulosa. Aquí no interesa analizar un patrón electroforético sino investigar una secuencia en particular ^{9,14,15,28,194}, por lo que no es necesario la separación del DNA en fragmentos por electroforesis. La diferencia entre una y otra técnica es que, para el caso del slot-blot, se utiliza una máquina que realiza vacío para inmovilizar varias muestras simultáneamente y en un patrón determinado ^{195,196}, y en el dot-blot directamente se aplica mediante una pipeta una alícuota del DNA a analizar.

Sea cual fuere el método de aplicación del DNA en el soporte sólido, posteriormente se procede a la hibridación de la membrana de nitrocelulosa o nylon con la sonda (marcada) de secuencia complementaria a la que es objeto de estudio (que está inmovilizada en la membrana); posteriormente se detecta la marca de la sonda (§ 1.2.4) mediante una metodología apropiada.

1.2.3.3 Dot blot reverso

En el dot blot reverso, se aplica en la membrana la sonda (en este caso no marcada) y se procede a la hibridación con la muestra (que está en solución) ⁹. En este formato es necesario que la señal analítica provenga de la muestra, por lo que el analito se marca durante un procedimiento de amplificación por PCR (§ 1.2.2) usando en la amplificación mononucleótidos o cebadores marcados que se anexan en copias exactas de la muestra, generando réplicas del analito marcadas.

1.2.4 HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN

Sea cual fuere el fragmento que está en fase sólida, según los formatos vistos [dot-blot (§ 1.2.3.2) y dot-blot reverso (§ 1.2.3.3)], o que provengan de una separación electroforética [southern blot (§ 1.2.3.1)] o no, la presencia de estas secuencias de DNA debe evidenciarse mediante otra secuencia (complementaria) marcada que daría la señal analítica, luego de la reacción de hibridación (reconocimiento específico) entre ambas.

Tradicionalmente, la mayoría de las técnicas utilizaban sondas de ácido nucleico marcadas con radioisótopos de alta energía que eran detectadas por *métodos autoradiográficos* * con una alta sensibilidad.

Aunque siguen siendo técnicas muy utilizadas en numerosos laboratorios, la tendencia actual es sustituirlas por métodos no radioactivos.

Esto se debe a que las sondas radioactivas (marcadas con P^{32}) tienen una vida media corta, el trabajo con este tipo de material requiere laboratorios especializados debido a la peligrosidad que conlleva y existen problemas con los desechos de este tipo de ensayos.

Las estrategias de marcaje no isotópico en general pueden dividirse en dos categorías 10:

- marcaje primario o directo
- marcaje compuesto

1.2.4.1 Marcaje primario o directo

El marcador se une directamente de manera covalente a la sonda de ácido nucleico (Figura 1.16). Este marcador es capaz de dar la señal analítica por diferentes técnicas: colorimetría o espectroscopía (si el marcador es una enzima), quimioluminiscencia (si el marcador puede dar una señal quimioluminiscente) y fluorescencia (si el marcador posee propiedades fluorescentes) 10.

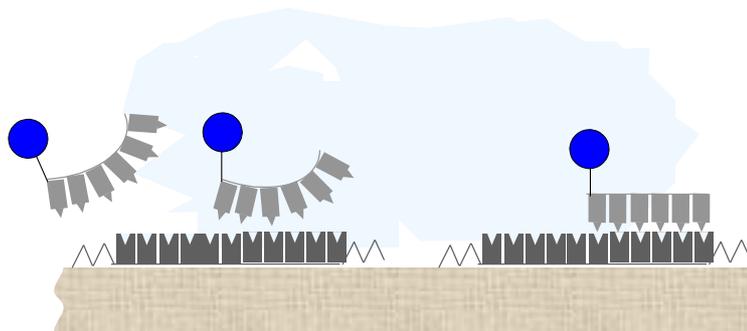


Figura 1.16. Marcaje primario o directo. El analito inmovilizado se hibrida con una sonda de DNA que se encuentra marcada con una especie capaz de dar una señal analítica.

Los compuestos más usados como marcadores directos son:

- Enzimas: Fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, peroxidasa.
- Compuestos quimioluminiscentes: luminol e isoluminol
- Compuestos fluorescentes: fluoresceína, rodamina, bromuro de etidio, rojo Texas.

1.2.4.2 Marcaje compuesto

Este tipo de marcaje es más versátil y más utilizado por los laboratorios fabricantes de *kits* clínicos 10 pero requiere un reconocimiento secundario luego de la hibridación, es decir, una incubación adicional (Figura 1.17).

El marcaje de las sondas de manera compuesta se basa en la funcionalización covalente de las mismas con una molécula pequeña que no dan señal analítica *per se*. Posteriormente esta

pequeña molécula es reconocida por otra molécula que da la señal analítica, mediante una reacción de reconocimiento biológico de gran afinidad y especificidad (Tabla 1.1). Estas reacciones de reconocimiento son básicamente de dos tipos:

- Complejación: sistema biotina/estreptavidina (o avidina) conjugada con una enzima o un fluoróforo (Figura 1.17).
- Reconocimiento inmunológico: Sistema hapteno/antígeno (biotina, digoxigenina, glucosil, sondas sulfonadas, proteínas A y G) // antihapteno/anticuerpo conjugado con una enzima o un fluoróforo.

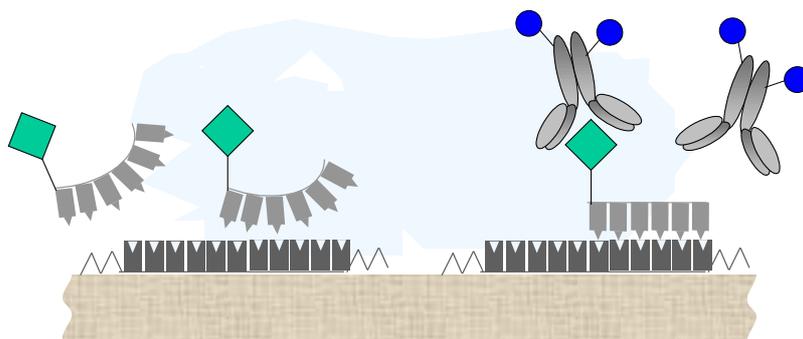


Figura 1.17. *Marcaje compuesto: la sonda de DNA se encuentra funcionalizada con una especie que en un segundo paso de incubación es capaz de unirse de manera selectiva a una molécula que dará la señal analítica. En este caso se ejemplifica el reconocimiento inmunológico de una sonda funcionalizada con digoxigenina con el anticuerpo antidigoxigenina-enzima.*

1.2.4.3 Formatos analíticos de hibridación

Para concluir, se puede decir que hay dos tipos de formatos clásicos de hibridación: sonda inmovilizada y analito inmovilizado. Pueden incluirse además el formato de captura o *sandwich* y el formato competitivo. Se tratarán brevemente cada uno de ellos.

- Analito inmovilizado (Figura 1.16 y Figura 1.17)
 - La sonda de reconocimiento se encuentra en solución
 - La sonda está marcada (de manera directa o compuesta)
 - El analito se inmoviliza en la membrana
- Sonda inmovilizada (Figura 1.18)
 - El analito se encuentra en solución
 - El analito se ha marcado durante su amplificación por PCR (§ 1.2.2)
 - La sonda de reconocimiento se encuentra inmovilizada en fase sólida
 - El sistema de marcaje normalmente es compuesto

Tabla 1.1: *Marcas compuestas en sistema de hibridación y detección de DNA*

Sonda de DNA funcionalizada con	Receptor específico	marcado con
biotina	antibiotina	coloide de oro
biotina	avidina o estreptavidina	fosfatasa alcalina β-galactosidasa ferritina fluoresceína peroxidasa
digoxigenina	antidigoxigenina	fosfatasa alcalina peroxidasa
bromuro de etidio	antietidio-DNA	β-galactosidasa
glucosil	concalvina A	fosfatasa ácida glucosa oxidasa
IgG	antiespecies IgG	peroxidasa
sondas sulfonadas	antisulfona	enzimas varias
proteína A	IgG	peroxidasa
proteína G	IgG	peroxidasa

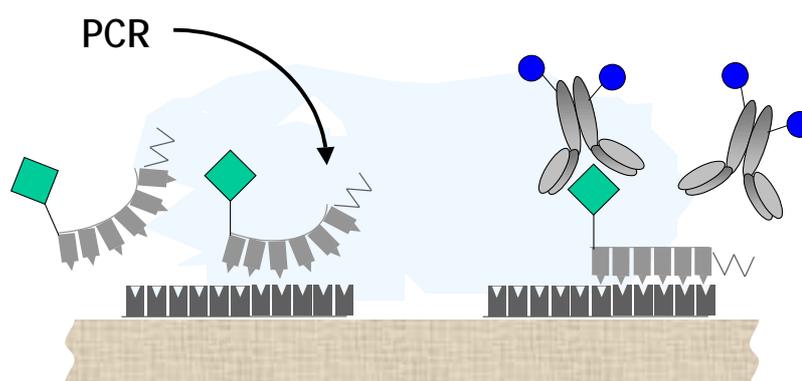


Figura 1.18. Formato analítico en el cual la sonda de reconocimiento está inmovilizada y el analito funcionalizado proviene de la PCR (§ 1.2.2).

• Formato de captura o *sandwich*^{24,25,153} (Figura 1.19)

- Una sonda de captura se encuentra inmovilizada en fase sólida;
- El analito se encuentra en solución, y se inmoviliza mediante hibridación con la sonda de captura, que reconoce una secuencia aleadaña al gen que se desea investigar;
- La secuencia de interés se reconoce mediante una sonda marcada (de manera directa o compuesta);
- El reconocimiento del analito es doble.

• Formato competitivo (Figura 1.20)

Existen diversas formas de diseñar un formato competitivo. Un ejemplo es el que se presenta en la Figura 1.20. En este caso particular:

- La sonda sintética de secuencia idéntica a la del analito se encuentra inmovilizada en la membrana;
- El analito se encuentra en solución;
- La sonda marcada posee una secuencia complementaria a la del analito y a la de la sonda inmovilizada en la membrana;
- El analito compite con la sonda inmovilizada en la membrana por la hibridación con la sonda marcada (de manera directa o compuesta) de secuencia complementaria;
- La señal es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

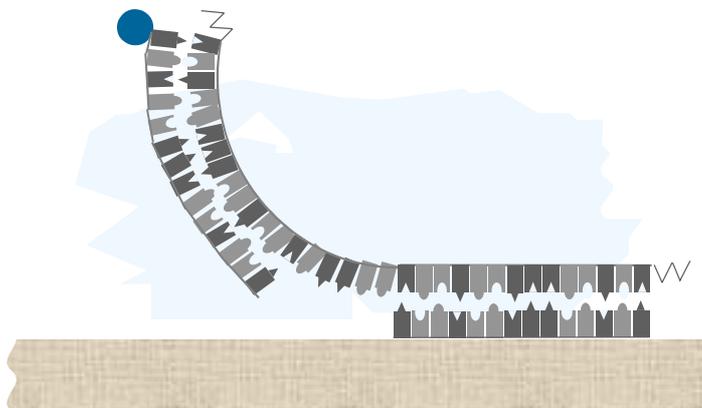


Figura 1.19. Formato analítico de captura o sandwich: en la membrana se inmoviliza una sonda de captura del analito, que posteriormente se hibrida con una sonda marcada, en este caso, con una marca directa.

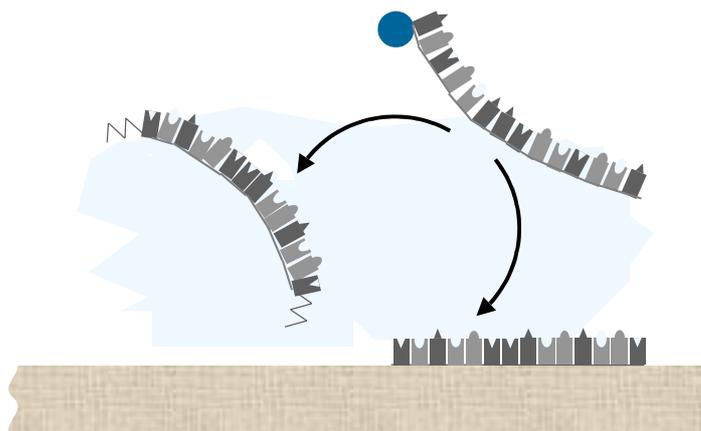


Figura 1.20. Formato analítico competitivo: el analito y una sonda inmovilizada en el soporte sólido, que tienen igual secuencia, compiten en este caso por una sonda (con una marca directa) de secuencia complementaria.

1.3 NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE DNA

El diagnóstico del DNA se ha convertido en un área importante en biología molecular y estudios biotecnológicos. La determinación de secuencias de DNA de humanos, microorganismos y plantas tiene cada día mayor relevancia en otras numerosas áreas de interés ¹⁹⁷. Los métodos convencionales para el análisis de DNA se basan, fundamentalmente, en la secuenciación o en la hibridación ¹⁹⁸. Sin embargo, éstas metodologías clásicas se ven obsoletas frente a la creciente demanda de mayor información, en menor tiempo, y a menor coste.

Dentro de este contexto, y debido a la consecución del Proyecto Genoma Humano (§ 1.1.4), los chips de DNA se han convertido en una alternativa necesaria a los métodos clásicos de análisis de DNA. Es por eso que esta tecnología de creciente interés se tratará en § 1.3.1. Asimismo, los laboratorios en un chip –que surgieron como consecuencia inmediata a los chips de DNA y que se presentan como una tecnología emergente–, serán tratados en § 1.3.2.

Sin embargo, la utilización de este tipo de tecnología para el análisis de DNA requiere personal cualificado para poder obtener resultados analíticos de confianza. La necesidad de análisis de DNA en áreas cada vez más diversas (además del campo biomédico) llevó a buscar como meta la construcción de dispositivos cuya utilización no requiera la supervisión profesional, cuyo manejo sea sencillo y cuyo coste sea menor. Esta conjugación ha tenido como resultado numerosos trabajos de investigación dirigidos al desarrollo de genosensores como alternativa de análisis ⁸. Los genosensores son también una nueva metodología de análisis de DNA, pero serán tratados más adelante (véase § 1.4).

1.3.1 CHIPS DE DNA

Pocas áreas científicas se han desarrollado tanto últimamente como el diagnóstico del DNA. Con la finalización del Proyecto Genoma Humano nos encontramos en el comienzo de una gran revolución en el análisis genético ^{199, 200}. La información obtenida con este proyecto abre las puertas a nuevas posibilidades analíticas. Para continuar con estos avances y explotar estos conocimientos, los dispositivos de análisis futuros deben reunir ciertas características tales como alto rendimiento, rapidez, simplicidad y bajo coste. Los chips de DNA cubren la mayoría de estas demandas, y han sido tratados en numerosos *reviews* ²⁰¹⁻²⁰⁶. Actualmente, más de 100 compañías ofrecen chips de DNA ²⁰⁷.

1.3.1.1 Principios teóricos

Un chip (o matriz de DNA) es simplemente un medio de llevar a cabo un amplio número de experimentos de análisis de DNA en paralelo y en miniatura. Los experimentos que anteriormente se llevaban a cabo en días o años, pueden ser realizados mediante un chip de DNA en unas pocas horas y quizá en un futuro, en segundos. Los chips de DNA permiten analizar miles de genes simultáneamente, y hacen posible el análisis con equipamiento portátil para medidas de campo.

En esencia, esta tecnología implica en inmovilizar (por deposición manual ¹⁵¹ o robótica ²⁰⁸ o por síntesis *in situ* ²⁰⁹⁻²¹²) una serie de sondas de DNA de secuencias diferentes y conocidas, en sitios determinados (de 10 a 100 μm) sobre una superficie pequeña (típicamente superficies de vidrio, silicio o plástico de 1-2 cm^2), con lo que se genera una alta densidad de sitios de reacción por unidad de

superficie (10^6 sitios/cm²). El DNA o RNA analito se marca usualmente con moléculas fluorescentes. Posteriormente, el chip se expone al DNA o al RNA de la muestra. En los distintos sitios de la superficie donde las bases del DNA analito encuentren su contraparte en las distintas sondas, habrá hibridación. El chip es luego escaneado mediante alguna de las diversas tecnologías disponibles, y la imagen obtenida es interpretada. La imagen final consiste en manchas de diferentes intensidades que están relacionadas con el grado de hibridación entre la sonda marcada y el DNA analito. La clave para conocer el resultado es saber la ubicación concreta de las sondas y su correspondiente secuencia. El número exacto de sondas inmovilizadas varía de acuerdo con la aplicación del chip.

Los distintos chips de DNA varían en el tipo de polinucleótido inmovilizado, en los métodos de inmovilización, en la formación de los ácidos nucleicos (*in situ* o *ex situ*), en la hibridación y en la lectura del chip hibridado. Las sondas pueden inmovilizarse sobre el chip por métodos químicos o físicos. Los distintos métodos de detección varían desde radioquímicos ²¹³ a electroquímicos (lo cual minimiza en gran medida la instrumentación y permite dispositivos detectores más pequeños y robustos), pero el método más ampliamente utilizado consiste en la marcación fluorescente del DNA analito.

La tecnología de los chips de DNA implica la integración de diferentes disciplinas tales como biología molecular, tecnologías avanzadas de microfabricación, química de superficie, química analítica, software, robótica y automatización. Pero, fundamentalmente, los chips genéticos son el resultado de los logros conseguidos por dos campos: la biología molecular y la tecnología de microfabricación.

Biología Molecular

Este área ha sido especialmente impulsada por el Proyecto Genoma Humano. En sus comienzos, en los principios de los 90, se pensaba que su culminación tardaría al menos 20 años. Casi tan pronto como se había iniciado, la fecha de culminación del proyecto se modificó al 2005, luego al 2003. Gracias a los avances en las metodologías de análisis, computarización y telecomunicaciones, el fin del proyecto se adelantó finalmente tres años. El Proyecto Genoma Humano ha contribuido en el desarrollo de los chips de DNA creando un mercado para la genómica. La genómica es la ciencia que se encarga de descubrir, localizar y caracterizar los genes en un organismo. Los adelantos en biología molecular han impulsado el desarrollo de pruebas clínicas de laboratorio y terapias génicas. Los avances más importantes incluyen la PCR y la síntesis de oligonucleótidos. También ha sido esencial en el desarrollo de los chips de DNA la creación de los secuenciadores génicos, que son máquinas automatizadas para la identificación de secuencias génicas.

Tecnologías de microfabricación

El segundo avance tecnológico que hizo posible la producción de los chips de DNA es la mejora en las técnicas de fabricación a escala micro y nano ²¹⁴. Inicialmente desarrolladas para su uso en la fabricación de chips de ordenadores, estas técnicas son ahora explotadas en una variedad de otras disciplinas, tales como en la fabricación de los chips de DNA.

Estos logros han hecho posible la inmovilización de moléculas orgánicas sobre una superficie inorgánica. Estas técnicas varían de un fabricante a otro. Los chips de DNA de alta densidad requieren usualmente la deposición física (tecnología de deposición de microchorro) de volúmenes del orden de picolitros en zonas determinadas de la superficie del chip. Es esencial activar la superficie

para la unión covalente de los oligonucleótidos a la misma. Sin embargo, otras técnicas se asemejan más a las utilizadas en la fabricación de chips microelectrónicos, haciendo uso de procesos fotolitográficos y de micromecanización.

1.3.1.2 Aplicaciones de los chips de DNA

Las aplicaciones de los chips de DNA son innumerables ²¹⁵. Entre las más importantes se pueden citar:

- Expresión génica: permite el estudio de los numerosos genes que participan en enfermedades y su comportamiento (aumento o disminución de su expresión).
- Secuenciación génica: permite la determinación de la secuencia de cualquier gen de interés.
- Farmacogenómica: estudia el efecto de ciertos fármacos mediante el perfil genético de los pacientes; este tipo de chips son utilizados en el descubrimiento de nuevos fármacos y en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes tratados con ellos ²¹⁶.
- Identificación de SNPs. Algunos SNPs tienen significación clínica, por lo que este tipo de chip se convertirá en la base de medicina farmacogenómica.
- Toxicogenómica: permite el análisis del efecto que un determinado compuesto tiene, por ejemplo, en el aumento de la expresión de genes asociados con toxicidad.
- Medicina forense: identificación de individuos mediante su perfil genético particular
- Identificación de armas biológicas: para prevenir, neutralizar y revertir los efectos de un agente biológico utilizado con fines bélicos.
- Industria alimentaria: identificación de agentes causantes de intoxicaciones alimentarias, entre otras aplicaciones.

1.3.1.3 Tipos de chips de DNA

Es difícil de establecer una taxonomía completa, aunque hay dos tipos básicos de chips de DNA. Los primeros y más antiguos son los chips secuenciadores ^{217,218}. En estos tipos de chips se inmovilizan segmentos de DNA de 20 *mer* *. Estos chips están diseñados de tal manera que cubre todas las posibilidades de combinación de bases, en un esquema que se denomina secuenciación por hibridación (SPH). La muestra se introduce en el chip y se hibrida con aquellas sondas donde encuentra secuencias complementarias.

La segunda variedad son los chips de expresión génica ^{219,220}. Estos están diseñados para determinar el grado de expresión de una secuencia genética midiendo la cantidad de mRNA que está produciendo un gen en concreto. Estos chips presentan un grupo específico de pares de bases. Los resultados se obtienen determinando el grado de cambio cuando se compara con una referencia o control, mediante hibridación competitiva ²²¹. Este tipo de chip es útil en diagnóstico y tratamiento de enfermedades vinculadas a la expresión de genes, como es el caso de ciertos casos de cáncer (Synteni, Fremont, CA y Incyte, Palo Alto, CA).

En las siguientes secciones se han seleccionado algunos ejemplos de las principales compañías.

Affymetrix (Santa Clara, CA)

El primer chip de DNA desarrollado es el GeneChip. El sistema comercial completo consiste en cuatro partes integradas. Un chip de DNA de un solo uso, una estación de fluidos para introducir la muestra, un escáner para leer los datos y el software.

El chip de DNA consiste en un arreglo de oligonucleótidos de secuencias conocidas en una superficie de silicio. Una estrategia de química combinatoria fotolitográfica y de síntesis de DNA en fase sólida posibilita la síntesis *in situ*^{209,222,223} de un gran número de sondas de DNA en ubicaciones específicas del chip, mediante la elongación de la cadena base a base, tal como se explica en la Figura 1.21.

La intensidad de la fluorescencia capturada por el escáner es utilizada por el *software* –que reconoce la localización de todas las sondas y sus correspondientes secuencias– para dar el resultado de la muestra.

El actual método de fabricación a gran escala permite sintetizar 300 000 polinucleótidos en un área de 1.28 x 1.28 cm, aunque existen prototipos que exceden un millón de sondas por chip.

La compañía ofrece GeneChips de expresión genética²²⁴ y de secuenciación²⁰⁹, y para aplicaciones tan diversas como la detección de cáncer de mama, virus del HIV y el gene p53 (un gen supresor de tumores que varía en varias formas de cáncer), o para distintos patógenos bacterianos.

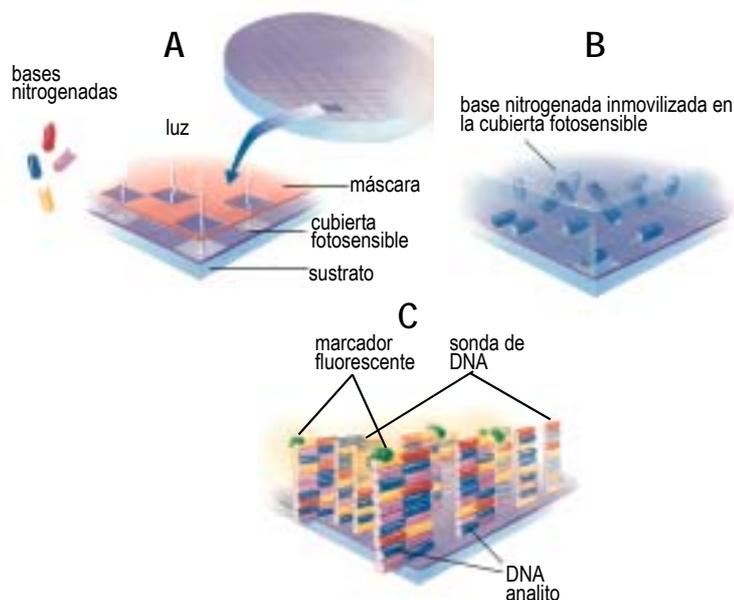


Figura 1.21. Estrategia fotolitográfica utilizada por Affymetrix para la construcción de chips de DNA. El proceso consiste en la activación por la luz de una cubierta fotosensible sólo en los sitios que lo permite una máscara (A). Un tipo de base nitrogenada (hidroxidesoxinucleósidos con un grupo protector fotolábil) se inmoviliza entonces en los sitios activados de la cubierta (B). Este proceso de inmovilización de las bases nitrogenadas continúa, modificando el patrón de la máscara y activando diferentes sitios y acoplado diferentes bases, de manera de conseguir la construcción de distintas sondas de DNA con una secuencia diferente. El chip es puesto en contacto con el analito, que se hibrida en aquellos sitios donde encuentra bases complementarias, y su secuencia es revelada mediante el patrón de fluorescencia obtenido (C), y mediante un software apropiado.

Hyseq Inc. (Sunnyvale, CA)

El chip producido por Hyseq (en colaboración con Perkin Elmer), se basa en el concepto de secuenciación por hibridación (SPH). La metodología SPH se lleva a cabo en un chip que contiene inmovilizados las 1024 combinaciones posibles de secuencias de oligonucleótidos de una longitud de 5 mer, que actúan como sondas de captura. El chip se incuba con el DNA analito, con un set de sondas marcadas de 5 mer (que tienen también las 1024 combinaciones posibles), y con la enzima ligasa. Cuando la sonda de captura se hibrida con la secuencia complementaria del DNA analito y cuando una sonda marcada se hibrida con la secuencia inmediata del DNA analito adyacente a la sonda de captura (Figura 1.22), ocurre la unión covalente entre las sondas de captura y la sonda marcada mediante la enzima ligasa. Un paso de lavado a altas temperaturas elimina las sondas marcadas que no se han unido de manera covalente a las sondas de captura y al DNA analito. Las secuencias de las sondas se diseñan de tal manera que presentan regiones superpuestas, según la estrategia de SPH (Figura 1.22). La secuencia del DNA analito se ensambla mediante un *software* apropiado.

Debido a que el chip contiene todos los posibles oligonucleótidos de 5 mer, se puede secuenciar cualquier gen. La principal ventaja de este chip que incluye 1024 pentámeros en combinación con 1024 sondas marcadas en solución es que tiene la potencialidad de generar todas las combinaciones (1048754) de 10 mer, sin la necesidad de sintetizar o inmovilizar 1 millón de sondas.

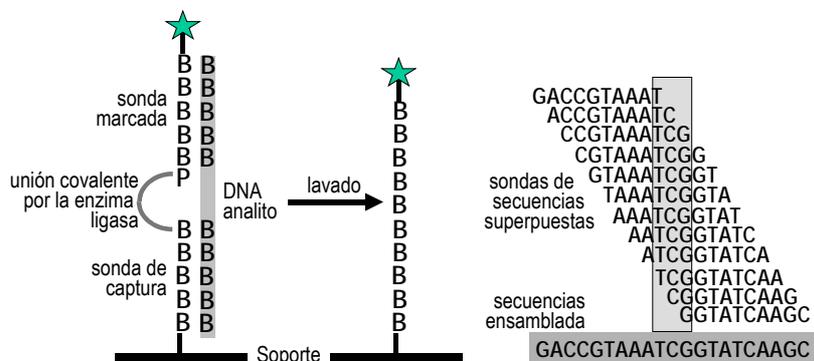


Figura 1.22. Estrategia de SPH utilizada en los chips secuenciadores comercializados por Hyseq.

Clinical Micro Sensors (CMS) (Pasadena, CA)

CMS en colaboración con Motorola está desarrollando instrumentos pequeños, de bajo coste y operados por baterías, que se basan en la detección electroquímica de la hibridación del DNA analito, para su aplicación en medidas de campo (Figura 1.23). La detección electroquímica es ideal para la simplificación del equipamiento respecto a las detecciones ópticas.

La esencia de esta tecnología se basa en la oxidación-reducción reversible y continua del DNA analito que se ha hibridado con una sonda marcada con un dador electrónico (un complejo organometálico basado en ferroceno). Los microchips tienen numerosas áreas electroactivas de oro (microelectrodos), en las que se inmovilizan sondas de captura a través de "cables moleculares" de fenilacetileno. Las sondas de captura se hibridan con el analito, y éste con una sonda marcada con el

complejo organometálico (denominadas AMBER, del inglés *amperometric bioelectronic reporter*). Los “cables moleculares” mantienen el contacto eléctrico entre las sondas marcadas con el AMBER y la superficie de oro. La generación de la señal depende entonces de la hibridación con la sonda marcada. Cuando se aplica un voltaje, la marca de ferroceno libera electrones que viajan a través de la doble hebra, y se transmiten a través de los cables moleculares a los microelectrodos de oro.

La empresa pretende integrar la preparación de la muestra (lisis de las células, deshibridación y fragmentación) al sistema (laboratorio en un chip, § 1.3.2). Las aplicaciones de este dispositivo serán muy variadas, tales como diagnóstico clínico, alimentación, investigación biomédica, farmacogenómica y detección de armas biológicas, entre otras.



Figura 1.23. Prototipo de chip de DNA portátil y operado por baterías diseñado por CMS

Incyte Pharmaceuticals Inc (Synteni) (Palo Alto, CA)

El objeto de los chips elaborados por esta compañía es la investigación de la expresión génica de las células mediante la monitorización del mRNA del núcleo celular a través de una hibridación competitiva de “dos colores”.

El ejemplo que se muestra en la Figura 1.24 es un experimento de expresión génica comparativa. La muestra inicial consiste en dos grupos de células. Estos grupos pueden ser, por ejemplo, tejidos enfermos y sanos, muestras bajo tratamiento médico o sin terapéutica, o muestras sometidas a diferentes condiciones a lo largo del tiempo.

En la primera parte del experimento, el mRNA se extrae de las células. Posteriormente, se realiza la transcripción reversa de las moléculas de RNA a una molécula más estable (a su DNA complementario, cDNA). El cDNA de cada grupo de células es luego marcado, típicamente con dos cromóforos fluorescentes distintos. El cDNA resultante se hibrida con el chip, mediante un mecanismo de competición.

El chip hibridado es luego lavado y escaneado. La posición y la intensidad de las manchas otorgan la información (obtenida por un *software* apropiado ²²⁵) de la expresión génica de una población de células en estudio con relación a una muestra control. Este es el fundamento de la expresión génica comparativa.

Los datos de expresión génica comparativa sirven para:

- Identificar y valorar los genes clave para el desarrollo de nuevos medicamentos.

- Comprender el comportamiento y las interacciones de los genes en células enfermas y sanas.
- Valorar la eficacia o la toxicidad de compuestos antes de comenzar un tratamiento clínico.

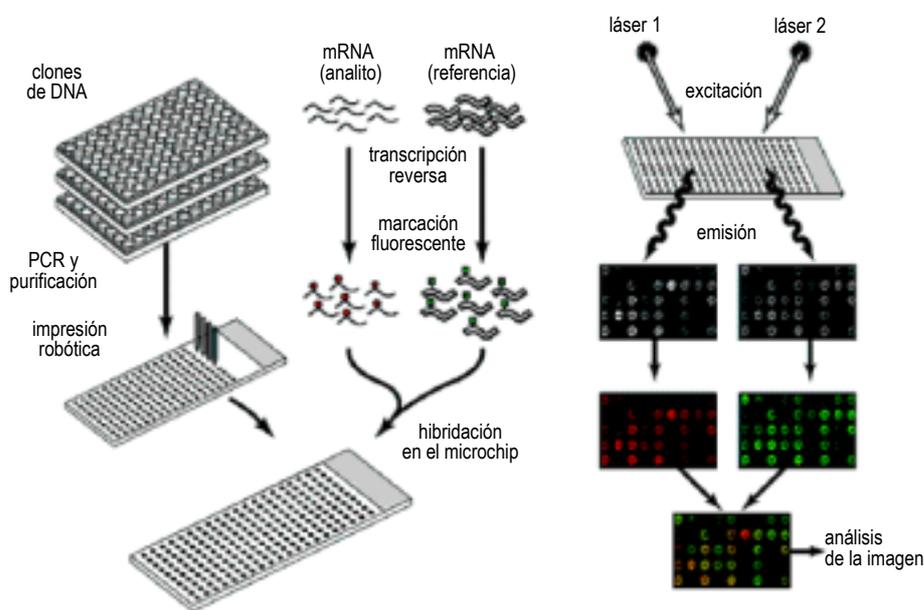


Figura 1.24. Esquema de la estrategia seguida por Incyte (Synteni) para la monitorización de la expresión génica (véase texto). El chip de DNA se prepara por impresión robótica sobre un soporte de vidrio de hasta 10 000 sondas de DNA de 500 a 5 000 pb.

1.3.1.4 Retos futuros

Mientras que las compañías de chips de DNA se preparan para sacar sus productos al mercado, los mayores desafíos –aún por solucionarse– son del orden tecnológico y regulatorio.

El avance tecnológico implicará el aumento de la densidad del chip, mediante deposición robótica o microlitografía, y de su sensibilidad y fiabilidad. Otro gran reto consiste en la integración de los sistemas (*lab-on-a-chip*). Además, se debe conseguir el aumento del grado de producción para alcanzar las demandas esperadas. Actualmente, unos pocos fabricantes están produciendo chips en escala piloto. Finalmente, otro desafío tecnológico implica mejorar los parámetros de fabricación orientados a conseguir un precio comercialmente aceptable por unidad. En el orden regulatorio, se deberá asegurar que los procesos de fabricación cumplan con los sistemas y estándares de calidad.

1.3.2 LABORATORIOS EN UN CHIP

La tecnología de microfluidos utilizada en la fabricación de los laboratorios en un chip (en inglés *lab-on-a-chip*) representa una revolución en la experimentación en el laboratorio y otorga conjuntamente los beneficios de la miniaturización, integración y automatización en un sistema de análisis.

El objetivo de numerosos microsistemas que se están diseñando en la actualidad es el de realizar un único dispositivo que permita la integración de todos o varios de los procesos implicados en el análisis del DNA, tales como toma de muestra, pretratamiento y extracción del DNA, amplificación, separación o hibridación y detección. Son los denominados laboratorios en un chip, o sistemas microfluídicos ^{201,206}. El material se transporta dentro de estos dispositivos a través de microcanales de entre 5 y 200 μm de ancho y de microestructuras en las cuales se llevan a cabo reacciones, separaciones y análisis que usualmente se realizan con grandes instrumentos analíticos.

La construcción de estos microlaboratorios se realiza mediante tecnologías avanzadas de microfabricación y utilizan procesos comunes al desarrollo de circuitos microelectrónicos.

El análisis mediante un laboratorio en un chip otorga numerosas ventajas. La manipulación a la que se ven sometidos muestras y reactivos cuando un análisis se realiza en sucesivos pasos se ve disminuida, y así existe menor riesgo de contaminaciones. La reducción del tamaño de estos dispositivos implica un menor consumo de reactivos y de muestra. Además, en un futuro, la fabricación de estos sistemas de microfluidos será más económica respecto al equipamiento de análisis tradicional. Este tipo de laboratorios en un chip conlleva un aumento considerable en el rendimiento de los procesos de análisis, y este mayor rendimiento se traduce en una mayor rapidez en un análisis. Así, la mejora en la difusión térmica que se observa en estos dispositivos implica el enfriamiento y el calentamiento más efectivo de los materiales y de los fluidos. Por ejemplo, en las separaciones electroforéticas mediante estos microsistemas pueden utilizarse gradientes mayores de voltaje sin que se observe el efecto Joule, consiguiendo así una mejora en velocidad y eficiencia respecto a los métodos electroforéticos tradicionales. El flujo en estos sistemas es laminar, debido a las reducidas dimensiones de los canales y a la velocidad del caudal en los mismos. Como resultado, se evita el aumento del ancho de las bandas y de la presión debido a turbulencias. En los laboratorios en un chip es posible el transporte de materiales sin la utilización de válvulas mediante sistemas de transporte electrocinéticos (migración electroósmica y electroforética). Además, este tipo de sistemas se pueden construir en paralelo de manera muy sencilla, permitiendo el análisis simultáneo de numerosas muestras. La miniaturización de la instrumentación analítica permite el transporte del equipamiento fuera del laboratorio, para medidas de campo.

Se han desarrollado microchips para la realización de PCR ²²⁶⁻²³⁰, para el análisis electroforético del DNA ²³¹⁻²³⁹, y para la amplificación por PCR con análisis electroforético posterior ²⁴⁰⁻²⁴⁴.

Como ya se dijera, el objetivo de la mayoría de los diseños de microsistemas es el de integrar en un chip varios o todos los procesos involucrados en el análisis de DNA. Los microsistemas más completos son los que incluyen amplificación por PCR y detección electroforética ²⁴⁰⁻²⁴⁷.

Por citar un ejemplo, se ha fabricado un laboratorio en un chip que posibilita el transporte de muestras del orden de nanolitros a través de una red de microcanales, la mezcla de los reactivos con la muestra, la preparación de la muestra, la digestión del DNA con enzimas de restricción, la amplificación por PCR y la separación electroforética del DNA ²⁴⁸.

Algunos sistemas comerciales se encuentran en fase inicial de desarrollo, mientras que otros ya se encuentran en fase de experimentación y comercialización.

Caliper Technology Corporation –en colaboración con Agilent Technologies– ya comercializa un instrumento que utiliza chips (LabChip™) de un sólo uso para el análisis total en 90 segundos del tamaño y concentración de DNA, mediante su rápida separación en fragmentos. Con la misma finalidad, Aclara Biosciences Inc. –en colaboración con PE Biosystems– ha desarrollado un sistema de microfluidos (LabCard™) que utiliza en este caso chips de plástico (Figura 1.25).

Nanogen Inc (San Diego, CA) ha desarrollado las bases para un sistema de análisis completo basado en un chip de DNA (véase § 1.3.1), mediante un proceso de preparación electrónica de la muestra, que incluye separación celular, transporte de la muestra, hibridación y desnaturalización del DNA, mediante el control de campos eléctricos²⁴⁹. La utilidad de este sistema ha sido probado en la separación de *E. coli* de células humanas sanguíneas mediante dielectroforesis. Las células fueron dirigidas a sitios específicos de microelectrodos mediante una corriente AC y luego fueron lisadas²⁵⁰.

Los exámenes posteriores se llevaron a cabo por una hibridación incrementada electrónicamente en un chip separado, de la misma casa comercial²⁵¹, pero el objetivo final es el de realizar todo el sistema completo en un único chip.

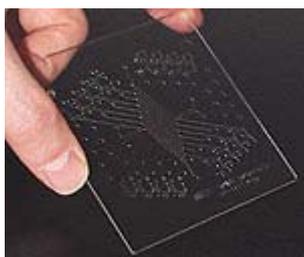


Figura 1.25. Tarjeta plástica rígida de un sólo uso fabricada por Aclara Biosciences Inc. (LabCard™).

Siguiendo con la idea de la miniaturización de sistemas para la construcción de laboratorios en un chip, existen otras aportaciones interesantes para el desarrollo de microsistemas integrados. Así, en cuanto al tratamiento previo de la muestra, se ha descrito un sistema de cultivo de células en un chip²⁵², y un cartucho microfluídico para la preparación de esporas para su posterior análisis por PCR²⁵³.

También se ha descrito el acoplamiento de la tecnología de los chips con la espectroscopía de masa para la identificación de una muestra y la elucidación de su estructura²⁵⁴. Otros autores describen la construcción de una microcelda para la detección voltamétrica *on-line*²⁵⁵, y su acoplamiento a una técnica de preconcentración en una micromembrana líquida soportada²⁵⁶. También se ha descrito la construcción de un agitador magnético hidrodinámico diminuto²⁵⁷.

Entre las aplicaciones, se ha descrito la detección de la viabilidad de *Cryptosporidium parvum* utilizando liposomas modificados con DNA en un chip microfluídico²⁵⁸.

1.4 LOS GENOSENSORES: UNA NUEVA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE DNA

Ya se ha comentado la importancia que ha tenido el desarrollo de los chips de DNA en la consecución del PGH. Sin embargo, las mismas características que los hacen herramientas insustituibles cuando se quiere investigar miles de genes simultáneamente los condiciona en problemas analíticos más concretos.

La necesidad de análisis de DNA en áreas cada vez más diversas –tales como la industria– con dispositivos cuya utilización no requiera la supervisión profesional, cuyo manejo sea sencillo y cuyo coste sea menor facilitó el desarrollo de los genosensores. Los requerimientos de mayor versatilidad, llevó a complementar las ventajas que ofrecen los sensores químicos y los biosensores con la gran especificidad que ofrecen los métodos clásicos de análisis de DNA. Esta conjugación multidisciplinar ha tenido como resultado numerosos trabajos de investigación dirigidos al desarrollo de genosensores como alternativa de análisis ⁸. Respecto a las técnicas clásicas de análisis de DNA la principal ventaja de los genosensores es su capacidad de: generar directamente una señal medible, en un período corto de tiempo; simplificar el procedimiento de análisis reduciendo el número de etapas; desarrollar los ensayos en condiciones diferentes a las del laboratorio; su posible regeneración y la posibilidad de miniaturización de la instrumentación asociada.

Se puede decir que un genosensor es un sensor químico con DNA como elemento de reconocimiento, o lo que es lo mismo, un biosensor de DNA. Es por eso que, antes de comenzar a desarrollar el tema de genosensores en sí (§ 1.4.4), se explicará brevemente la configuración de un sensor químico (§ 1.4.1) y de un biosensor (§ 1.4.3) y se mencionarán los principales transductores utilizados para la construcción de sensores químicos y genosensores, haciendo énfasis en la transducción amperométrica (§ 1.4.2), que es la metodología utilizada en el presente trabajo.

1.4.1 LOS SENSORES QUÍMICOS

Un sensor químico es un dispositivo que transforma información química a una señal analíticamente útil ²⁵⁹ y es capaz de dar la concentración de un componente específico de una muestra. Un sensor se caracteriza por sus dimensiones reducidas, robustez, facilidad de utilizar y capacidad de suministrar información analítica fiable de manera continua.

Los sensores químicos usualmente contienen dos componentes básicos conectados en serie: un sistema de reconocimiento molecular –el receptor–, y un transductor físico-químico ²⁵⁹⁻²⁶¹. El receptor es capaz de reconocer selectivamente un determinado analito. Fruto de este reconocimiento se produce una señal primaria de tipo eléctrico, óptico, térmico o másico. El transductor es el responsable de transformar dicha señal en otra de tipo eléctrico, la cual es más fácilmente cuantificable, medible y manipulable. La señal eléctrica producida aporta información analítica sobre la muestra, el proceso o el sistema que se está investigando ²⁶².

Los sensores químicos también se denominan quimiosensores si el elemento de reconocimiento es de naturaleza sintética y biosensores si el sistema de reconocimiento utiliza un mecanismo bioquímico ²⁵⁹.

En la actualidad se encuentra en desarrollo un nuevo tipo de reconocimiento: el biomimético²⁶³. Se basa en la tecnología de grabado molecular sobre polímeros sintéticos altamente estables, los cuales poseen propiedades de reconocimiento molecular selectivo. Este reconocimiento se fundamenta en que los sitios de la matriz polimérica son complementarios al analito en forma y grupos funcionales.

Los sensores químicos se pueden clasificar en función de la propiedad física que mida el transductor^{261,264,265}. Así, se pueden clasificar en:

- *Sensores basados en transductores ópticos*²⁶⁶: dispositivos basados en fibras ópticas^{265,267}, resonancia de plasmones superficiales^{265,267-269} y sensores de onda evanescente²⁶⁷.

- *Sensores basados en transductores piezoeléctricos*^{265,267,268,270-272}: dispositivos basados en onda acústica de volumen y dispositivos basados en onda acústica superficial.

- *Sensores basados en transductores electroquímicos y eléctricos*²⁵⁹: sensores amperométricos^{273,274}, sensores potenciométricos^{265,275}, conductimétricos o impedimétricos²⁶⁵ y de carga iónica o efecto de campo (ISFET)²⁶⁵. Los sensores electroquímicos más ampliamente utilizados se basan en la amperometría y en la potenciometría. Las dos técnicas se diferencian en que, en el caso de los sensores amperométricos, se debe aplicar un potencial externo que provoque la reacción que tiene lugar en el electrodo, mientras que en los potenciométricos se provoca un equilibrio local en la superficie sensora, sin que sea necesario ninguna fuerza externa. En estos últimos se mide el potencial generado entre el electrodo y la solución denominado potencial de membrana en los electrodos selectivos a iones.

En el próximo apartado, se desarrollarán con mayor detalle las técnicas que son utilizadas en este trabajo para realizar las mediciones analíticas: amperometría (§1.4.2) y voltamperometría cíclica (§1.4.2.1).

1.4.2 TÉCNICA AMPEROMÉTRICA

Los sensores amperométricos se basan en la medida de la intensidad de corriente resultante de la oxidación o reducción de la superficie electroactiva de un electrodo al que se lo ha sometido a un potencial constante^{259,265,276}. La elección adecuada de este potencial aporta cierta selectividad electroquímica, ya que produce descarga de unas u otras especies químicas. A menudo, esta selectividad es insuficiente, por lo cual se debe modificar la superficie de los electrodos (química o biológicamente), para aumentar la selectividad y la sensibilidad de la detección.

Para realizar medidas de señal amperométrica se utilizan sistemas de tres electrodos²⁵⁹. El electrodo de trabajo es aquel sobre el cual se mide el paso de corriente una vez se ha fijado una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar, actuando este último como un contraelectrodo para cerrar el circuito eléctrico. Se necesita también un potenciostato el cual, mediante el electrodo de referencia, mantiene constante el potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo. El electrodo de referencia acostumbra ser de Ag/AgCl, mientras que el de trabajo y auxiliar son de materiales conductores e inertes, como metales nobles, derivados de carbono y polímeros conductores.

La intensidad de corriente es una medida directa de la velocidad de la reacción electroquímica (velocidad de reducción u oxidación del analito en el electrodo) descrita por la ley de Faraday (en su forma diferencial) como:

$$I = nF \frac{dc}{dt}$$

donde dc/dt es la velocidad de oxidación o de reducción del analito, en mol/s, y n es el número de electrones por molécula implicados en la reacción. Como se deriva de la ecuación, la corriente es directamente proporcional a la velocidad de transformación del analito en la superficie del electrodo. Sin embargo, una vez que las moléculas en la superficie se han electrolizado, se transfieren nuevas moléculas desde la solución a la superficie del electrodo. Así, la corriente también depende de manera crítica de la velocidad del transporte de masa del analito desde la solución a la superficie del electrodo ²⁷⁷. Este último parámetro depende de la concentración del analito en la solución, del área del electrodo y de las condiciones de migración, convección y de difusión ²⁷⁸. La migración, que se debe al transporte del analito por un gradiente eléctrico, generalmente se elimina adicionando un electrolito soporte en la celda. La convección, que se debe al transporte del analito impulsada por un movimiento de la solución –por ejemplo, mediante agitación–, puede controlarse simplemente si no se aplica agitación a la solución o si se aplica una agitación constante. La difusión, que se debe al transporte del analito debido al gradiente de concentración del mismo, depende del tiempo, hecho que limita este tipo de experimentos.

Si la respuesta de los electrodos se mide en una solución estática, la corriente I decrece con el tiempo, según la ecuación descrita por Cottrell ²⁷⁷:

$$I = nFA \sqrt{\frac{D}{t\pi}} C$$

en donde C es la concentración de la especie electroactiva en la solución, A el área del electrodo y D el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en la solución. Debido a la dependencia del tiempo como se evidencia en la ecuación de Cottrell, en estas condiciones la corriente debería de disminuir hasta cero después de un período de tiempo, pero en realidad se obtienen intensidades de corrientes bajas ²⁷⁸.

Una posibilidad es utilizar técnicas hidrodinámicas en las cuales se fuerza la convección, por ejemplo, agitando la solución o utilizando un electrodo de trabajo de disco rotatorio. El transporte de masa en estos experimentos –que es más rápido– es una combinación de la convección y la difusión. De esta manera, se forma una capa de difusión estática en la superficie del electrodo de un grosor L que depende de la velocidad de agitación ²⁷⁹. Así se consigue que el transporte de masa a la superficie del electrodo nada más esté determinado por la difusión en esta capa. Se obtiene entonces un estado estacionario en un tiempo relativamente breve, en el que el transporte de masa es estable y el valor final de la intensidad depende de la concentración del analito. Esta relación puede expresarse mediante la ecuación:

$$I = nFA \frac{D}{L} C_s$$

donde C_s es la concentración del analito en solución. Esta ecuación puede simplificarse como:

$$I = KC_s$$

donde K es la constante que incluye la constante de Faraday, el área del electrodo y el coeficiente de difusión, entre otros. Para la utilización de esta ecuación se asume que la distribución del analito en la solución es uniforme hasta la capa de difusión, y que en la superficie del electrodo la concentración del analito es cero ²⁸⁰.

1.4.2.1 Caracterización de los transductores amperométricos. Voltamperometría cíclica.

La caracterización básica de las especies redox y de los transductores electroquímicos puede llevarse a cabo mediante la técnica electroquímica de voltamperometría cíclica ²⁸¹. Esta técnica permite conocer de manera rápida el comportamiento redox de las especies químicas en un amplio rango de potenciales ²⁸². La voltamperometría cíclica consiste en variar linealmente con el tiempo el potencial aplicado al electrodo de trabajo, realizando un barrido desde un potencial inicial hasta un potencial determinado, y seguidamente invertir la dirección de barrido en el sentido contrario hasta llegar al potencial de partida. Se consiguen así voltamperogramas cíclicos característicos para cada sistema redox. En los voltamperogramas se observa en la abscisa potenciales aplicados y en la ordenada la intensidad de corriente medida en el electrodo de trabajo. La corriente puede considerarse como la respuesta experimentada por el sistema de electrodos frente a los cambios de potencial aplicados externamente. Así la fuerza reductora u oxidante del electrodo se controla mediante el potencial aplicado: si el barrido se realiza hacia potenciales negativos se convierte en un reductor fuerte, mientras que si se realiza hacia potenciales positivos, se convierte en un fuerte oxidante ²⁸².

La información obtenida mediante voltamperometría cíclica es de carácter cualitativo, y pueden sacarse conclusiones respecto a parámetros como potenciales de oxidación y reducción, los aspectos cinéticos de transferencia electrónica sobre la superficie del transductor, la evaluación de la evolución de ésta respecto a una señal de excitación como es el potencial, y aspectos interfaciales como la adsorción de sustancias electroactivas.

1.4.2.2 Materiales utilizados como transductores amperométricos. Composites.

Una de las ventajas de la amperometría es que los materiales utilizados en su construcción son simples y accesibles. Su principal requerimiento es que sean materiales conductores. Pueden utilizarse materiales simples ²⁸³ (metales como platino y oro o derivados del grafito como carbono vitrificado o grafito pirolítico), o materiales compuestos (los denominados *composites*).

Un composite resulta de la combinación de diferentes componentes que confieren sus cualidades básicas, pero generando un material con características propias. Consisten en una dispersión de un material sólido conductor en una matriz polimérica de características aislantes.

Los composites conductores se pueden clasificar según la distribución de las partículas conductoras en el material aislante ^{284,285}:

- a) *composites ordenados*: presentan un cierto grado de ordenación de los componentes que lo forman;
- b) *composites aleatorios*: las partículas se encuentran distribuidas de manera aleatoria en el material. Se pueden a su vez clasificar en:
 - *dispersos*, si la distribución del conductor es totalmente aleatoria;
 - *consolidados*, si una de las fases predomina de forma aleatoria en algunas áreas de la matriz.

Se puede emplear una gran diversidad de materiales conductores (platino, oro, grafito), así como también una gran cantidad de polímeros. Su elección depende de la posterior aplicación del sensor.

Los primeros transductores electroquímicos basados en composites descritos en la bibliografía fueron los de pasta de carbono ^{286,287}. Están formados por partículas de polvo de grafito (fase conductora), y un líquido aislante viscoso (aceite mineral). Debido a inconvenientes de tipo físico-mecánico ²⁸⁴ (resistencia del material), se han desarrollado composites rígidos ²⁸⁸. Algunas ventajas de estos composites rígidos es su facilidad de mecanización y regeneración mediante un simple pulido.

En los laboratorios donde se ha realizado el presente trabajo se ha desarrollado este tipo de material y se lo ha aplicado al diseño de sensores potenciométricos y biosensores amperométricos en distintas conformaciones y para diferentes determinaciones analíticas ^{284,288-311}. Además, se ha incorporado en este tipo de matrices el material biológico (biocomposites, §1.4.3), con las ventajas que esto supone ³¹²⁻³¹⁹.

1.4.2.3 Ventajas y desventajas de la técnica amperométrica

La técnica amperométrica presenta numerosas ventajas que la hacen adecuada para su implementación en el campo de los genosensores. Entre ellas se puede citar ³²⁰:

- Relación directa entre la concentración y la intensidad de corriente (señal analítica): es la causa de la mayor sensibilidad de amperometría respecto a potenciometría, en la cual la señal analítica (potencial) depende del logaritmo de la concentración. En amperometría se consiguen, por lo general, mejores límites de detección.
- Se basa en reacciones que tienen lugar en la superficie del electrodo, por lo que no depende del volumen de la muestra o solución que se esté midiendo.
- Es una técnica analítica simple, robusta y económica.
- La señal analítica obtenida es fácilmente procesable.
- Rango dinámico amplio (de 4 o 5 décadas de concentración). Esto favorece su posibilidad de aplicación en control de procesos y de automatización.
- No es susceptible de interferencias de tipo físico (color, turbidez, viscosidad). Evita la necesidad de tratamiento de muestra.
- Los materiales que constituyen los transductores pueden ser simples y accesibles (tal como el grafito) (§ 1.4.2.2).

Estas son las causas por las que se ha optado por la amperometría como metodología analítica para la evaluación de genosensores.

Su principal desventaja es que todas las especies que tengan comportamiento redox similar al analito o a la molécula responsable de otorgar la información analítica (es decir, que se reduzcan u oxiden a potenciales similares), interferirán en las medidas. Este hecho puede solventarse utilizando mediadores químicos (§ 3.2.2.1) y selectivizando la membrana, mediante un reconocimiento bioespecífico, como puede ser una interacción DNA/DNA.

1.4.3 BIOSENSORES

Se define como biosensor al dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico de reconocimiento selectivo (o específico de clase) –denominado biorreceptor–, en íntimo contacto con un transductor capaz de detectar el evento de reconocimiento molecular entre el analito y la biomolécula y transformarlo en una señal analítica, usualmente eléctrica ^{262,321,322}.

Con la aparición de los biosensores a principios de los años 60, se generó una nueva dimensión en los sensores químicos en cuanto al reconocimiento molecular de un analito: el biorreconocimiento ³²³. Esto implica una selectividad similar a lo que ocurre *in vivo*, que es la máxima que se puede obtener ³²⁴.

La posibilidad de transformar este biorreconocimiento en una señal mensurable en el mismo dispositivo es otro concepto muy atractivo desde el punto de vista analítico.

El material biológico es el que otorga, por lo tanto, la selectividad del biosensor, mientras que el transductor es el que da la sensibilidad. De ahí la importancia de seleccionar un transductor adecuado.

Las etapas básicas de funcionamiento de un biosensor son las siguientes (Figura 1.26):

1. interacción específica del analito de la muestra con el material biológico inmovilizado sobre el transductor de manera directa o sobre un soporte en contacto íntimo;
2. detección, por parte del transductor, de la variación de alguna propiedad física o química del sistema, provocada por la reacción de reconocimiento selectivo;
3. procesamiento de la señal y obtención de resultados.

El material biológico que se puede utilizar es muy variado ³²¹: enzimas, células ³²⁵, tejidos, cofactores, orgánulos, receptores, anticuerpos, microorganismos, agentes inmunológicos, DNA. Los transductores más ampliamente utilizados son ópticos, electroquímicos y piezoeléctricos ³²¹.

Los biosensores más desarrollados en la bibliografía y de mayor aplicación en la industria son aquellos que utilizan como material biológico una enzima. Como ejemplo se puede citar los biosensores de glucosa oxidasa, que se venden en las farmacias para medir los niveles de glucosa en sangre en diabéticos ³²⁶ (Yellow Springs Instruments, Inc.; MediSense, Inc.) ³²⁷. Los más novedosos son los inmunosensores y genosensores, que aún se encuentran en fase de desarrollo para su aplicación masiva.

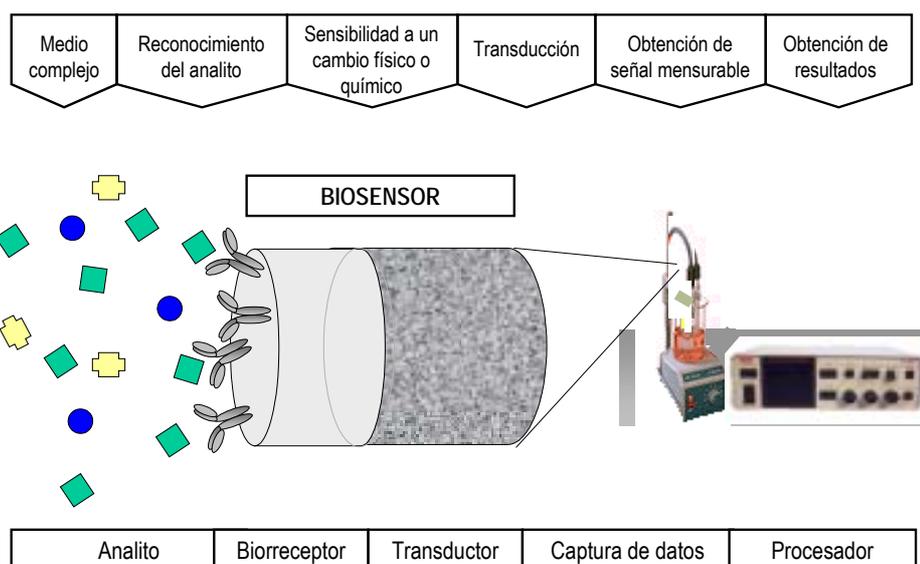


Figura 1.26. *Principio de funcionamiento de un biosensor*

El material biológico puede inmovilizarse sobre el transductor de las siguientes maneras

259,261,273:

- inmovilización superficial:
 - retención en una membrana inerte o retención física;
 - adsorción física sobre el transductor;
 - entrecruzamiento mediante agentes bifuncionales;
 - enlace covalente con un soporte funcionalizado;
 - atrapamiento en matrices poliméricas.
- inmovilización en una matriz: biocomposites.

1.4.4 BIOSENSORES DE DNA: LOS GENOSENSORES

Los genosensores (o biosensores de DNA) son dispositivos capaces de dar una señal analítica a partir del evento de hibridación⁸. Combinan un agente de reconocimiento biológico (en este caso una simple hebra DNA llamada sonda de DNA) que confiere selectividad, con un transductor, que confiere sensibilidad y que convierte el evento de reconocimiento en una señal electrónica amplificada. Como ya se comentara, un genosensor es un sensor químico con DNA como elemento de reconocimiento, o lo que es lo mismo, un biosensor de DNA⁸.

La principal ventaja de los genosensores respecto a las técnicas clásicas de análisis de DNA deviene de la proximidad entre el material biológico y el transductor, hecho que permite detectar cambios de manera más sensible en la interficie con el elemento de reconocimiento biológico. De esta manera se pueden realizar medidas no destructivas con poco material genético. Los genosensores se caracterizan por su rapidez en la obtención de resultados y por la simplificación del procedimiento de análisis reduciendo el número de etapas respecto a las metodologías clásicas.

Es factible desarrollar con este tipo de dispositivos los ensayos en condiciones diferentes a las del laboratorio; las posibilidades de regeneración y de miniaturización de la instrumentación asociada son otras características importantes.

Sin embargo, aún el desarrollo de genosensores está en etapa de investigación. Utilizan sondas sintéticas, y todavía no han sido aplicados a muestras reales, excepto unas pocas excepciones que ofrece el mercado a altos costos. Su transferencia a la industria está aun en proceso de evaluación, debido a la falta de relación entre el desarrollo científico y las expectativas comerciales.

1.4.4.1 Características principales de los genosensores

Hay dos propiedades básicas de estos dispositivos que los hacen interesantes en química analítica: la especificidad generada por el componente biológico que interacciona selectivamente con el analito y la sensibilidad determinada por el material biológico en íntimo contacto con el transductor.

Las características deseables en un genosensor son las siguientes:

- Precisión y sensibilidad
- Elevada especificidad; insensibilidad frente a interferencias de la matriz de la muestra
- Amplio intervalo dinámico de trabajo
- Tiempo de respuesta breve y rapidez en las medidas
- Independencia de la temperatura
- Capacidad de autocontrol y exactitud
- Ecológico
- Largo tiempo de uso o, en su defecto, dispositivo de un solo uso
- Bajo coste de producción
- No destructivo
- Detección directa de la hibridación, de manera que:
 - no requiera adición secuencial de reactivos
 - no requiera preparación de la muestra, que normalmente es compleja
- Posibilidad de uso en análisis en continuo, permitiendo monitorización ambiental, diagnóstico clínico y control de procesos bioindustriales y biofarmacéuticos.
- Reversibilidad de la reacción de hibridación o reutilización del dispositivo
- Físicamente robusto (en especial los electroquímicos), con posibilidad de miniaturización, de manera que sea viable:
 - diseñar un dispositivo compacto y portátil para medidas de campo
 - diagnóstico *in vivo*
 - medida de múltiples analitos en volúmenes pequeños de muestra

1.4.4.2 Ventajas y limitaciones de los genosensores

Las ventajas que supone la utilización de genosensores están principalmente relacionadas con la especificidad que el DNA confiere al análisis:

- A diferencia de los anticuerpos y las enzimas, las sondas de DNA se pueden obtener mediante síntesis química. Una sonda de DNA es un reactivo económico debido a que no requiere procedimientos de purificación complejos.

- Debido a la posibilidad de amplificación sintética (por PCR) de este tipo de material, se pueden obtener 1 millón de copias (marcadas o no) a partir de una sola secuencia original, en pocas horas (§ 1.2.2). Esto disminuye aún más los costes de los reactivos, incluyendo el de las sondas marcadas.

- Se puede realizar la síntesis controlada de oligonucleótidos de hasta 50 mer sobre superficies de variada naturaleza ^{46,223,328-330}.

- Los procedimientos de funcionalización y marcaje de moléculas de DNA son sencillos ¹⁰; el material genético modificado es económico respecto a otros reactivos biológicos, pudiéndose obtener por síntesis o mediante PCR ^{165,167,168}. Esto facilita la inmovilización covalente de DNA a soportes ^{14,15,20,27,30,47,131,132,135,137}.

- Al tener una naturaleza química diferente a las proteínas y otras moléculas de la sangre, su purificación respecto a componentes habituales de una muestra es relativamente sencilla. Esto implica menor posibilidad de interferencia en los ensayos.

- Es un material (a diferencia de las proteínas) muy resistente a los solventes orgánicos y a cambios de la fuerza iónica y de la temperatura. La conservación del DNA no constituye un problema. Se pueden esperar mayores tiempos de vida de un genosensor, respecto a un sensor enzimático o a un inmunosensor. Por este motivo estos últimos no han tenido la aceptación comercial que se esperaba durante su desarrollo ²⁶³.

- Los ensayos con DNA y, por lo tanto, los genosensores son de una elevada sensibilidad.

- El DNA, más aún si es sintético, presenta homogeneidad respecto a su estructura química y a sus propiedades, de manera que se pueden estandarizar procedimientos como la inmovilización, cuantificación, funcionalización y marcaje.

- La regeneración puede ser muy sencilla debido a que la reacción de hibridación, al estar basada en interacciones por puentes de hidrógeno, es reversible con la temperatura. Este hecho, sumado a la estabilidad térmica del DNA, hace que se pueda regenerar una superficie para posteriores análisis con sólo aumentar la temperatura a 95 °C.

- La mayoría de los problemas analíticos relacionados con el DNA no requieren una cuantificación exacta, sino más bien determinar si una secuencia génica está presente o no en una muestra.

Las limitaciones vienen dadas fundamentalmente por la dificultad en la detección del DNA en los genosensores:

- La detección (electroquímica, óptica, etc.) directa posterior a la hibridación puede ser difícil.

- Normalmente es necesario el marcaje de los materiales (sondas) (§ 1.2.4) para poder producir la señal de detección deseada.

- la tendencia que tiene el DNA a adsorberse inespecíficamente sobre las superficies hace que sean necesarios pasos de prehibridación y la utilización de agentes bloqueantes para evitar este fenómeno.

1.4.4.3 Clasificación de los genosensores

Los genosensores pueden clasificarse en función de la naturaleza del transductor:

- Genosensores basados en transductores ópticos: dispositivos basados en fibras ópticas 18,22,23,26,38,45-48,64-66,153,161,266,329, resonancia de plasmones superficiales 141,150,152,155,156,158,331-334 y espejo resonante 143.
- Genosensores basados en transductores piezoeléctricos (dispositivos de onda acústica, microbalanzas) 134,138-141,144,156,159,160,335-349
- Genosensores basados en transductores electroquímicos (véase § 1.4.5).

Los transductores ópticos (resonancia de plasmones superficiales, espejo resonante) son los únicos que han encontrado aplicación en muestras reales y que se comercializan. Su principal ventaja es que reconocen el evento de hibridación sin requerir marcadores externos. Sus costos son muy elevados (véase § 1.4.7).

Las posibilidades que ofrecen los dispositivos electroquímicos desde el punto de vista analítico y operacional hace que haya numerosa bibliografía referida al desarrollo de genosensores con este tipo de transducción. Sin embargo, aún no han encontrado aplicación a muestras reales, probablemente debido a que los sistemas de detección de la reacción de hibridación que se han investigado hasta el momento no son lo suficientemente adecuados.

En la sección siguiente, se tratará las variantes en inmovilización, transducción y detección que se encuentra en la bibliografía en lo referente a sensores electroquímicos, por ser la metodología que se ha adoptado en el presente trabajo.

1.4.5 GENOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

La posibilidad de desarrollar técnicas electroquímicas de análisis de DNA ha generado expectativas en biotecnología. Un significativo impacto en diagnóstico de estas técnicas puede deberse a su rapidez, sensibilidad, bajo costo, posibilidad de producción masiva y de hibridación en fase sólida ⁹³.

Cuando se piensa diseñar un genosensor, el primer factor a tener en cuenta es la inmovilización de la sonda de DNA sobre el transductor electroquímico.

La inmovilización ideal de DNA sobre una superficie es a través de un único punto de unión de la molécula a través del extremo 3' o 5'. De esta forma se obtiene mayor eficiencia en la reacción de hibridación, situación próxima a lo que ocurre en disolución, a diferencia en la inmovilización a través de sitios múltiples, que provoca que la cinética de la reacción de hibridación sea más lenta ^{20,25,27,55,131-133}. En el siguiente apartado se describirán las metodologías existentes de inmovilización de material genético sobre transductores electroquímicos.

1.4.5.1 Metodologías de inmovilización en genosensores electroquímicos

Las metodologías fundamentales de inmovilización de DNA son ³⁵⁰:

➡ Inmovilizaciones superficiales

- Adsorción
 - Adsorción a potencial controlado
 - Adsorción física

- Inmovilización por complejación
 - inmovilización covalente
 - atrapamiento en matrices poliméricas
- ➡ Inmovilizaciones en volumen: composites

La adsorción es el método más simple de inmovilización de ácidos nucleicos a superficies, debido a que no requiere reactivos especiales ni utilización de DNA funcionalizado ⁸.

Las principales desventajas de este método son: posibilidad de desorción del DNA de la superficie y pobres eficiencias de hibridación debido a que la adsorción ocurre en sitios múltiples de la cadena de DNA, lo que puede desfavorecer el apareamiento de bases complementarias.

La complejación mediante la interacción de avidina/estreptavidina-biotina ha encontrado numerosas aplicaciones en el campo del análisis de ácidos nucleicos ⁸.

Por numerosas razones es conveniente la unión covalente de uno de los extremos de la cadena de los ácidos nucleicos a una superficie mediante un brazo espaciador ⁸. Este tipo de unión confiere flexibilidad a la estructura de la sonda, de manera que la hibridación pueda llevarse a cabo sin que ésta se despegue de la superficie del sensor.

La investigación progresa hacia la funcionalización de superficies para proveer suficiente espacio, densidad y orientación adecuados de la sonda de DNA.

La principal desventaja de la inmovilización covalente es que se requieren sondas de DNA funcionalizadas y reactivos especiales para la inmovilización. Existen numerosos protocolos de inmovilización bien establecidos, por lo que en realidad el problema fundamental pasa por el desarrollo de nuevos materiales funcionalizados para su uso como transductores electroquímicos.

En los siguientes apartados se tratarán una a una las metodologías de inmovilización.

Adsorción electroquímica de DNA (a potencial controlado)

Esta inmovilización se basa en que, al ser el DNA un polianión, es más fácilmente absorbido si en la superficie del sensor se aplica un potencial positivo, habitualmente +0.5 V. Este potencial aumenta la estabilidad de la sonda inmovilizada, mediante atracción electrostática entre el esqueleto fosfato-azúcar cargado negativamente y la superficie cargada positivamente. Se supone que el DNA se une a la superficie de carbono cargada positivamente a través del esqueleto fosfato con las bases orientadas hacia la solución, quedando éstas disponibles para su hibridación con la hebra complementaria ¹⁰⁷.

Los transductores más utilizados para la adsorción a potencial controlado son electrodos de carbono, grafito o pasta de carbono ^{56,58,73,75-80,82,117,118} en conformación cilíndrica convencional, planares (screen-printed) ^{49-51,53,54,56,77-79,87,117} y en forma de lápiz cuya superficie es renovable ¹²⁰. Se ha demostrado que la adsorción electroquímica es más efectiva al calentar un sensor de pasta de carbono ¹¹⁹.

Se ha utilizado también transductores modificados con nafiión-óxido de rutenio para la adsorción de DNA a potencial controlado ¹²¹.

Mediante esta metodología de adsorción se puede inmovilizar la sonda (ssDNA) y también, en un paso posterior, su secuencia complementaria. La hibridación se realiza así de manera más rápida ^{51,53,75,83,117}.

Esta clase de esquemas de hibridación tiene problemas de adsorción inespecífica de analito no complementario sobre la superficie del transductor ⁷³.

Además, puede inmovilizarse a potencial controlado directamente dsDNA ^{51,56,118}. Este tipo de sensor puede utilizarse para la detección de pequeñas moléculas (drogas, carcinógenos, poluentes), que interactúan con dsDNA, comportándose el DNA como elemento de reconocimiento de un biosensor de afinidad ^{51,56}. Existen una variedad de pequeños analitos que interactúan con el DNA por intercalación o unión electrostática ^{51,56}.

Estos sensores se han usado para la detección de trazas de poluentes (hidrazinas, como dimetilhidrazina, o poluentes aromáticos aminados como antramina o bencidina), y drogas (fenotiazinas como prometacina y antibióticos como daunomicina) ^{51,56}.

Los métodos de transducción para este tipo de procedimientos de inmovilización se tratan en § 1.4.5.2.

De la misma forma que puede ser inmovilizado el DNA, también puede adsorberse sobre superficies de carbono a un potencial fijo el PNA (ácido nucleico peptídico) ^{56,72,74,76,107}. PNA es un mimico de DNA en el cual el esqueleto tradicional de fosfato y desoxirribosa es reemplazado por una cadena pseudopeptídica neutra que consiste en unidades repetitivas de *N*-(2-aminoetil)glicina unidas por enlace amida. Debido a su neutralidad y su espacio adecuado entre las bases, este análogo del DNA posee una afinidad más fuerte por su secuencia complementaria (comparado con la hebra normal de DNA). Este hecho implica una mejor discriminación de mutaciones simples y, por lo tanto, PNA se utiliza como elemento de reconocimiento para sensores de hibridación de DNA. Las principales ventajas que derivan de las características químicas de PNA respecto a DNA son sensibilidad y especificidad significativamente mayores, hibridaciones más rápidas, menor dependencia de la fuerza iónica y utilización de sondas más cortas (de 10-15 mer). Además, las nucleasas son incapaces de degradar este tipo de estructura por lo que DNA ofrece una mayor estabilidad biológica al dispositivo ^{56,72,76, 107}.

Adsorción física de DNA

Los métodos de adsorción física consisten en poner en contacto el DNA con el transductor, y dejar que el DNA se adsorba sobre el material mediante interacciones físicas. Esta adsorción puede ser más drástica, si se deja secar un volumen de solución de DNA, o menos drástica, si el transductor se deja en contacto con una solución de DNA en agitación, por un tiempo dado. Este tipo de inmovilización tiene una desventaja. La sonda de DNA se inmoviliza mediante múltiples sitios a lo largo del esqueleto fosfato, disminuyendo la reactividad para su posterior hibridación ⁶².

Los transductores en los que se ha inmovilizado DNA por este método son:

- transductores carbonáceos
 - carbono vitrificado ^{96,351,352}
 - grafito pirolítico ^{43,127,129}
- transductores modificados superficialmente con polímeros conductores (polipirrol electropolimerizado) ^{85,353,354}, composites porosos ^{97,98} y quitosán ^{355,356}
- transductor de oro ^{67,84,357} y de óxido de indio ⁹²
- transductor de mercurio ^{105,106,110,112,358}, Hg/Ag (amalgama de plata) ³⁵⁹, y película de mercurio ³⁶⁰.

Inmovilización por complejación

El sistema de complejación de la avidina o estreptavidina con la biotina se considera de gran utilidad en el campo del análisis de ácidos nucleicos.

La avidina (y la estreptavidina) son grandes proteínas tetraméricas (70 kD) que incorporan cuatro sitios de unión idénticos. La biotina es una molécula pequeña que se une con gran afinidad al sitio de unión con una constante de afinidad de $1 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}$. Este valor es casi cercano al de unión covalente. Sólo puede removerse en las más extremas condiciones. Debido a su fuerte interacción, la formación del complejo casi no se afecta con pH y temperaturas extremas, con solventes orgánicos y con agentes desnaturalizantes ³⁶¹.

La unión tetravalente de la estreptavidina con la biotina permite la construcción de sandwiches moleculares, donde la avidina unida a una superficie puede acoplarse con oligonucleótidos biotinilados. La estabilidad acuosa del complejo avidina-biotina convierte al sistema fácil de manejar; sin embargo, la presencia de esta capa de proteína puede promover la adsorción inespecífica y comprometer la sensibilidad y selectividad de este tipo de sensores.

Se ha descrito una sola inmovilización de sondas biotiniladas sobre transductores electroquímicos (grafito) modificado por avidina mediante adsorción de la proteína ⁵³. Sin embargo hay descritas otras muchas metodologías de inmovilización de avidina o estreptavidina sobre transductores electroquímicos con otras aplicaciones, pero que pueden ser extrapoladas al campo de los genosensores.

Una de estas estrategias implica la inmovilización de biotina sobre microelectrodos de carbono ³⁶². Los grupos carboxilos de la superficie del electrodo se activaron mediante una carbodiimida (EDC). Los electrodos modificados se trataron posteriormente con Jeffamina ED-600 (una diamina), que permitió unir un brazo espaciador hidrofílico mediante un enlace amida. Los electrodos se trataron entonces con NHS-biotina con el objeto de unir moléculas de biotina a los grupos amino de la Jeffamina. Los electrodos fueron entonces tratados con estreptavidina. Este protocolo fue utilizado para inmovilizar HRP biotinilada, pero puede extenderse a ssDNA-biotina para la construcción de un genosensor.

Se ha conseguido la derivatización de electrodos de carbono vitrificado con avidina/biotina utilizando SECM (del inglés *scanning electrochemical microscopy*). Esta técnica permite inmovilizar biotina en puntos concretos de la superficie del sensor ³⁶¹. Además, se han utilizado técnicas fotolitográficas para la inmovilización de fotobiotina sobre superficies de carbono vitrificado en sitios determinados por un patrón de interferencia en láser ³⁶³.

Asimismo, se ha sintetizado biotina funcionalizada con un grupo pirrol ^{364,365}. Esta funcionalización ha permitido la preparación de películas de poli(pirrol-biotina) mediante electropolimerización sobre superficies de platino ^{364,365} y de carbono vitrificado ^{365,366}. También se ha conseguido la copolimerización exitosa de complejos de Ru(II) funcionalizados con pirrol con el derivado de la biotina, por lo que se consiguió la elaboración de copolímeros con propiedades redox que exhiben sitios de complejación ³⁶⁴. La posterior unión de esta película con avidina permitiría la unión de una gran variedad de biomoléculas biotiniladas ^{364,365,366}.

Otro polímero que se ha logrado sintetizar es politiofeno biotinilado ³⁶⁷. Dicho polímero ha sido caracterizado electroquímicamente y ha mostrado respuesta a la adición de avidina.

Por otro lado, se ha conseguido funcionalizar electrodos de pasta de carbono mediante adsorción física de albúmina biotinilada ³⁶⁸.

Dentro de la química de complejación basada en la reacción biotina-estreptavidina, se han sintetizado conjugados de avidina-ferroceno ³⁶⁹. Estas moléculas combinan las propiedades únicas de unión a la biotina con las características redox del ferroceno. Se ha conseguido la inmovilización covalente del conjugado en electrodos de oro, que ha demostrado una excelente capacidad de unión a moléculas biotiniladas así como buenas propiedades de transferencia electrónica.

También hay descritas metodologías de inmovilización de sondas biotiniladas sobre otros transductores no electroquímicos modificados con avidina o estreptavidina. Así, se ha conseguido inmovilizar DNA sobre la superficie de distintos genosensores como: fibras ópticas ^{26,64,155,156}, espejo resonante ¹⁴³, resonancia de plasmones superficiales ^{150,152,155,156,158,331-334} y cristales piezoeléctricos ^{156,159,160,343,347,349}.

También, se ha conseguido inmovilizar por esta metodología ssDNA-biotina sobre la superficie de partículas magnéticas ¹⁵³ y agarosa ²⁵.

Inmovilización por unión covalente

Estas técnicas de inmovilización son las más elegantes y las que poseen mayor eficiencia de hibridación. Requieren normalmente derivatización de los transductores y reactivos inmovilizantes. Las sondas pueden estar modificadas químicamente o no, basándose en éste último caso en el grupo fosfato en posición 5' que puede activarse previamente con una carbodiimida.

- Inmovilizaciones covalentes sobre grafito

Grafito funcionalizado con grupos carboxílicos:

En una de las metodologías descritas se reporta la modificación de la superficie del transductor con grupos carboxílicos. Esto puede conseguirse por oxidación electroquímica de carbono vitrificado con HNO_3 y $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ^{89,90}, o bien por modificación de electrodos de pasta de grafito con ácido esteárico ^{88,91}. Estos grupos carboxílicos son activados posteriormente con una carbodiimida soluble (EDC) y NHS, de manera de que se forme un mejor grupo saliente (véase § 3.2.3). Luego de probar con diferentes secuencias, se llegó a la conclusión que esta inmovilización covalente del DNA es selectiva a través de residuos de guanina, debido a la nucleofilicidad del N7. Sólo ssDNA ricos en bases repetitivas consecutivas de guanina pueden inmovilizarse por este procedimiento en la superficie del sensor con los grupos COOH activados, aunque el mecanismo de esta reacción no está dilucidado ⁸⁹. Cualquier secuencia de ssDNA puede inmovilizarse mediante este procedimiento si previamente se elonga enzimáticamente con residuos de guanina.

Grafito funcionalizado con grupos amino:

El electrodo de grafito se oxida electroquímicamente con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y HNO_3 y luego se reduce con hidruro de aluminio y litio para producir grupos -OH en la superficie del electrodo. Luego, el electrodo se coloca en una solución de APTES (3-aminopropiltriétoxilano), generándose de esta forma grupos amino primario terminales en la superficie ⁴⁴. El electrodo modificado con grupos amino se deja incubar en una solución de EDC y ssDNA (sonda). En este punto, el extremo fosfato en posición 5' se activa con la carbodiimida y se inmoviliza covalentemente sobre la superficie del sensor a través de los grupos NH_2 .

- Inmovilización covalente sobre transductores metálicos (oro y platino)

Las inmovilizaciones sobre oro se llevan a cabo principalmente por quimioadsorción de sondas derivatizadas con un grupo mercaptohexil en el fosfato de ubicación 5' ^{59,69,62,63,126,142}.

En otro procedimiento se han inmovilizado moléculas de ssDNA ^{71,99,124,370-372} y ssPNA ¹²⁵ derivatizadas con grupo tiol (HS-(CH₂)₆-ssDNA) sobre superficies de oro, mediante películas mixtas de sonda y espaciador lateral derivatizado con tiol [MCH= HS-(CH₂)₆-OH], mediante una metodología de dos pasos: la superficie de oro se incuba primero con HS-(CH₂)₆-ssDNA y luego con MCH, generando superficies de adsorción más controlada.

Otro método de inmovilización covalente de una sonda de DNA sobre oro se lleva a cabo mediante modificación de un electrodo de oro con una película de aminoetanotiol ⁵⁵. Esto permite generar funciones -NH₂ en la superficie de oro. El electrodo se incuba con EDC y ssDNA. Estas condiciones permitieron la inmovilización a través de los grupos fosfato (en 5' de la sonda) activados con EDC, con los grupos amino de la superficie del electrodo mediante un enlace tipo fosforamido.

Se ha descrito otra posibilidad de inmovilización utilizando pasos sucesivos de adsorción y reacción de alquenobifosfonato de aluminio (Al₂C₄BP) sobre un transductor de oro. Luego de la reacción sobre el oro, la superficie expone numerosos sitios de unión de Al³⁺. Este tipo de reacción se basa en la interacción del centro metálico (Al³⁺) con los grupos fosfatos del esqueleto del DNA ^{94,95}.

También, se han modificado mediante oxidación con K₂Cr₂O₇ y HNO₃ transductores de platino ³⁷³. En una primera metodología de derivatización de la superficie, ésta se expone a mercaptosilano y se incuba posteriormente con ácido iodoacético para activar la superficie con grupos carboxílicos. Los electrodos así activados se incuban con una carbodiimida soluble (CDI). Los grupos amino de las bases del DNA reaccionan con los grupos carboxílicos activados por CDI.

Una modificación de esta técnica incluye derivatizar la superficie con grupos amino. A los electrodos con grupos carboxílicos activados (obtenidos como se describiera anteriormente) se le acopla, mediante CDI, una diamina (diaminohexano). De esta forma se generan grupos amino primarios en la superficie, que se acoplan con el extremo fosfato de ubicación 5' de la sonda de DNA, mediante una carbodiimida.

- Inmovilización covalente sobre superficies de polipirrol

La inmovilización sobre este tipo de transductores se ha realizado de dos maneras diferentes. Una de las metodologías de inmovilización es mediante copolimerización electroquímica sobre la superficie del transductor, de pirrol y sonda derivatizada con un grupo pirrol introducido en el extremo 5' de la misma por la metodología del fosforamido ^{146,147}. La otra forma es realizando la copolimerización sobre la superficie con un buen grupo saliente para que después pueda inmovilizarse la sonda de DNA ³⁷⁴. Esto implica el uso del copolímero precursor 3-N hidroxifalimida pirrol, siendo la hidroxifalimida el grupo saliente. Una vez se realiza la electropolimerización, se hace reaccionar con una sonda derivatizada con un grupo amino en el extremo 5', realizándose la unión covalente y generándose en la superficie el polímero 3-DNA-acetamidopirrol.

Atrapamiento en matrices poliméricas

Se ha inmovilizado ssDNA mediante atrapamiento en matrices poliméricas de pirrol electropolimerizado sobre un transductor de carbono vitrificado ³⁷⁵. El polianión de DNA actúa como dopante de la película de polipirrol, manteniendo la neutralidad eléctrica, y es capaz de hibridarse efectivamente con su secuencia complementaria.

Inmovilización en membranas bilipídicas

La inmovilización de DNA se ha llevado a cabo con electrodos de plata modificados con una membrana bilipídica estabilizada de fosfatidilcolina ³⁷⁶. Para tal fin, los oligonucleótidos se funcionalizaron en 5' con una cadena alifática.

Inmovilización en un composite de pasta de carbono

Estos composites se realizaron mediante inmovilización previa de DNA en partículas de sílice-titanio oxidadas ⁸³. Las partículas con DNA se utilizaron para realizar el composite con pasta de carbono. Este tipo de electrodos pueden pulirse y así ser renovadas sus superficies, teniéndose un reservorio constante de DNA. La principal ventaja de este tipo de sensor es la posibilidad de renovar la superficie, evitando así los métodos térmico y químico de regeneración.

1.4.5.2 Métodos de detección más utilizados en genosensores electroquímicos

Hay dos tendencias fundamentales para la detección del dúplex de DNA formados en la superficie del transductor ³⁵⁰. Estas son:

- utilizando indicadores electroactivos
- detectando la señal de guanina (sin indicadores externos)

La tendencia es intentar evidenciar la reacción de hibridación sin utilizar agentes externos y evitando el uso de sondas marcadas.

Métodos de detección de hibridación basados en indicadores electroactivos

Es el método de detección más ampliamente utilizado. En este caso, la formación del dúplex es comúnmente detectada utilizando indicadores de hibridación electroactivos. Estos pueden ser complejos catiónicos metálicos tales como Os(bpy)₃³⁺ ^{91,97-99}, Os(phen)₃²⁺ ⁹⁹, Os(5,6-dmphen)₃²⁺ ⁹⁹, Os(4,7-dmphen)₃²⁺ ⁹⁹, Co(phen)₃³⁺ ^{51,56,72-85,89,91}, Co(bpy)₃³⁺ ^{56,80,84,86-91}, Co(tppz)₂³⁺ ⁸⁴, Ru(bpy)₃²⁺ ^{92,93}, Ru(phen)₃²⁺ ^{43,94,95}, Fe(phen)₃²⁺ ^{43,80}, Fe(bpy)₃²⁺ ⁸⁰, Cu(phen)₂²⁺ ^{86,96} y Cu(TAAB)₂²⁺ ⁹⁶, o intercaladores orgánicos tales como hidrazinas ^{51,56}, antraminas ^{49-51,56}, fenotiazinas ^{51,57} y azul de metileno ^{58,59}, naranja de acridina ^{43,49,50}, daunomicina ^{43,51-55}, derivados del naftaleno ⁶⁹⁻⁷¹, antraciclinas, tetraciclinas ⁴³, bromuro de etidio ^{43,44}, vinblastina ⁴³, Hoechst 33258 ^{43,61-63} y 33342 ⁴³, bencil ⁶⁷ y metil ⁶⁸ viologen, minociclina ⁴³ y ioduro de propidio ⁴³, que interactúan de diferentes maneras con ss o ds DNA, pero preferentemente con dsDNA. Esa es la base de la detección de la reacción de hibridación. Este tipo de indicadores electroactivos posee una gran afinidad de asociación mediante distintos mecanismos con el dsDNA, preconcentrándose en la superficie del sensor si existen en la misma híbridos de DNA. Una vez que se forma el dúplex (como se describió en las secciones anteriores), los compuestos orgánicos intercalantes se unen al dsDNA a través de sus grupos aromáticos planares entre los pares de bases sucesivos de la doble hebra. El aumento de la respuesta electroquímica se debe a la asociación del intercalador con el dúplex y sirve como señal del evento de hibridación. Se cree que los complejos metálicos actúan preferentemente mediante interacciones electrostáticas, aunque en algunos casos también se unen al dsDNA mediante intercalación e interacciones hidrofóbicas con los surcos mayores y menores ⁸⁶.

Las metodologías electroquímicas de transducción de los indicadores electroactivos preconcentrados son, principalmente, la voltamperometría cíclica y la CPSA (del inglés *constant current chronopotentiometric stripping analysis*).

Cabe destacar que, al momento de la investigación, es necesario aplicar un paso de amplificación para aumentar la concentración del analito en la solución hasta 2 $\mu\text{g/ml}$ ⁵³. La señal electroquímica que deviene de algunos indicadores electroactivos es pequeña, debido a que no sólo se unen con dsDNA sino también con la sonda no hibridada y con la superficie del transductor directamente mediante adsorciones de tipo física ⁴³. Estas adsorciones inespecíficas disminuyen la sensibilidad del genosensor. Es por lo tanto muy importante considerar las propiedades de los intercaladores y complejos metálicos a la hora de seleccionar uno de ellos como indicador electroactivo del evento de hibridación.

Aunque las señales de oxidación voltamétricas de los indicadores electroactivos de DNA en electrodos de carbono son utilizadas, éstas son pobres y se observan sólo pequeñas diferencias entre las señales debidas a ss y ds DNA; es por esto que se necesitarían mayores concentraciones de DNA para poder obtener señales voltamétricas importantes ¹⁰⁷.

Para los análisis que utilizan indicadores electroactivos es más conveniente utilizar como metodología analítica de transducción la técnica CPSA que la voltamperometría cíclica.

Sin embargo, se está trabajando intensamente en la síntesis de indicadores electroactivos con una mejor discriminación entre la doble y simple hebra del DNA. Así, por ejemplo, se ha diseñado un intercalador (naftalendiimida) funcionalizado con grupos con propiedades electroquímicas (ferrocenil) ^{70,71}, que muestra una excelente diferenciación entre dsDNA y ssDNA.

Otro avance importante consiste en la síntesis de sondas funcionalizadas con grupos con propiedades electroquímicas. Así, se han sintetizado y caracterizado sondas funcionalizadas con un grupo ferrocenil ^{148,149,355,356}.

Una nueva técnica de amplificación de la señal electroquímica –conocida como electrocatálisis–, ha demostrado ser muy útil para la detección de mutaciones puntuales. El principio de la electrocatálisis de basa en la reducción de azul de metileno intercalado en el dsDNA mediante la aplicación de un potencial, y su regeneración posterior con un mediador en solución, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ⁵⁹, de manera que el ciclo catalítico continua y la señal se amplifica.

Métodos de detección de hibridación basados en la señal de guanina (sin indicadores electroquímicos externos)

En este segundo caso, la hibridación se detecta utilizando el pico intrínseco de oxidación de residuos de guanina ^{49,50,54,56,117,118} (a +1.03 V vs Ag/AgCl) que disminuye en presencia de secuencias complementarias ⁵¹.

Todas las estrategias de detección que usan la electroactividad de la base tiene como problema esta disminución de señal del híbrido respecto al ssDNA, debido a que la detección de las bases que se encuentran rodeadas por la doble hélice se ve impedida debido a los azúcares y fosfato de su entorno ¹²². Estos picos voltamétricos insuficientes pueden remediarse utilizando CPSA y técnicas sofisticadas correctoras de la línea de base.

Se ha demostrado además un incremento en los picos de oxidación de la guanina al aplicar calor a un sensor de pasta de carbono ¹¹⁹. Esto se debe a que el analito se oxida más fácilmente a temperaturas elevadas.

Este método de detección basado en la señal de la guanina no puede ser utilizado para detectar el evento de hibridación si una de las dos hebras del dúplex contiene bases guaninas ⁷³. Esta limitación fundamental se ha solucionado con el uso de sondas libres de guanina, cuyos residuos de

guanina están sustituidos por inosina ^{73,120}. Mientras que los residuos de inosina pueden formar pares de bases con citosina, su señal de oxidación está bien separada de la oxidación de la guanina. Así, la hibridación del DNA se acompaña de la aparición de señales de oxidación debido a residuos de guanina en el DNA analito.

1.4.5.3 Estudio electroquímico del DNA y de daño en el DNA

La electroactividad de los ácidos nucleicos fue descubierta hace ya 40 años ¹⁰⁴. Como especies electroactivas que son, los ácidos nucleicos producen picos por voltamperometría bien definidos sobre electrodos de mercurio. G y A pueden oxidarse en electrodos de carbono y otros electrodos sólidos –platino, oro, plata, cobre–. La reducción de G, C y A ocurre a potenciales negativos, que sólo puede obtenerse con electrodo de mercurio ¹⁰⁵⁻¹¹⁵ (Figura 1.27). Las bases timina y uracilo pueden reducirse a potenciales muy bajos y en solventes no acuosos ¹⁰⁸. Estos procesos de oxidación y reducción que ocurren a potenciales extremos son, en esencia, irreversibles. En estos transductores, las pentosas y los grupos fosfato no son electroactivos ¹⁰⁵⁻¹⁰⁹.

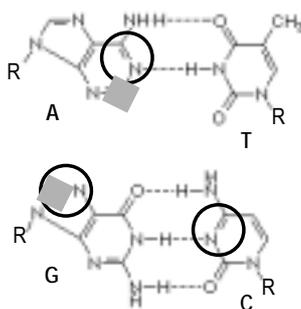


Figura 1.27. Representación de los pares de bases y de los grupos electroactivos. Los círculos muestran los sitios que pueden reducirse en un electrodo de mercurio, mientras que los cuadrados, aquellos capaces de ser oxidados en un electrodo de carbono.

Los electrodos de mercurio modificados con ácidos nucleicos pueden prepararse fácilmente por inmersión de un electrodo de mercurio en solución de DNA ^{105-107,112}. En este tipo de electrodos decrece las cantidades de DNA necesarias para el análisis. Las bases del DNA y los nucleósidos se adsorben fuertemente en el electrodo de mercurio. Se ha demostrado que los ácidos nucleicos poseen extraordinaria habilidad para asociarse (condensación bidimensional) en la superficie del electrodo de mercurio y pueden formar películas monomoleculares compactas. Las bases del DNA reaccionan con el electrodo de mercurio a potenciales positivos elevados formando compuestos solubles.

Sin embargo, se ha demostrado que en el electrodo de mercurio no puede llevarse a cabo reacciones de hibridación de ssDNA con su secuencia complementaria ¹⁰⁷. Este hecho es debido a que las bases hidrofóbicas del ssDNA reaccionan fuertemente con la superficie del electrodo de mercurio, también hidrofóbica, y no quedan accesibles para formar el dúplex con la secuencia complementaria del analito. La aplicación del electrodo de mercurio en sensores de hibridación de DNA es poco viable.

Las interacciones del DNA con agentes químicos (como por ejemplo, radicales libres ^{112,113} y carcinógenos) y físicos (como la luz UV y las radiaciones ionizantes) puede conducir a varios tipos de daño en el DNA, tales como mutaciones perjudiciales, muerte celular y cáncer ¹⁰². Estas lesiones pueden ocasionarse por: (a) escisión del esqueleto fosfato azúcar y otras interacciones covalentes que implican daño de las bases nitrogenadas y/o residuos fosfato y azúcar y (b) interacciones reversibles no covalentes tales como intercalación, unión a los surcos y uniones electrostáticas. La base nitrogenada guanina principalmente es la que lleva a cabo la mayoría de las reacciones, incluidas oxidaciones, alquilaciones, hidroxilaciones radicalarias, reacciones con complejos metálicos y con oxígeno singlete. El producto de su oxidación es 8-oxoguanina que puede detectarse electroquímicamente como producto de excreción en orina ¹¹⁶. Los electrodos de mercurio son muy útiles para la detección de estos daños en la molécula de DNA ^{106,107,110,112,114}, como un método alternativo a los ya existentes ¹⁰². Como puede observarse en la *Figura 1.27*, los sitios de reducción de A y C forman parte del sistema que interviene en la formación de los pares de hidrógeno del dúplex, por lo que las señales de reducción de A y C están fuertemente influenciadas por la estructura del DNA y, por supuesto, si el mismo se encuentra como ssDNA o dsDNA ^{108,109}. Asimismo, mediante los electrodos de mercurio se pueden estudiar modificaciones estructurales del DNA ¹⁰⁵, tales como las que ocurren en la interacción del DNA con agentes intercalantes ¹¹³. Pese a que el más utilizado es el electrodo de mercurio, también se ha usado un sensor de carbono vitrificado para el estudio del daño de DNA producido por varios agentes ⁹⁶.

Se han utilizado también para evaluar el comportamiento electroquímico del DNA un transductor de amalgama de plata ³⁵⁹ y un transductor de carbono vitrificado recubierto con una película de Hg ³⁶⁰, que representan una alternativa al electrodo de Hg y que muestran mejor estabilidad mecánica y posibilidad de miniaturización. También se ha reportado el uso de electrodos de carbono vitrificado con polipirrol electropolimerizado en su superficie para la detección de daño en el DNA por radiaciones UV ^{56,354}.

Se ha demostrado también la oxidación de ssDNA y dsDNA en microelectrodos de oro ³⁵⁷. En este transductor, la oxidación de ssDNA ocurre a 1.10 V (vs electrodo de calomel saturado), y se debe a residuos de guanina y de adenina. La oxidación de dsDNA es considerablemente menor, debido a que las bases nitrogenadas en este caso se encuentran rodeadas por la doble hélice y se ven impedidas a participar en la reacción del electrodo por los azúcares y fosfato de su entorno. Se ha utilizado también transductores modificados con nafión-óxido de rutenio para la determinación de guanina y adenina en DNA y RNA ¹²¹. En este transductor se observan picos bien definidos de oxidación de guanina (a + 0.92 V vs Ag/AgCl) y de adenina (a + 1.1 V).

1.4.5.4 Otros tipos de metodologías de detección en sensores de DNA

dsDNA como membrana sensora

Como ya se ha discutido, el DNA es capaz de interactuar con numerosas moléculas ⁴². Así, el dsDNA puede utilizarse como elemento de reconocimiento de analitos electroactivos que interactúan con dsDNA en biosensores de afinidad. El dsDNA puede inmovilizarse mediante la aplicación de un potencial controlado ^{49-51,54,56}, o mediante simple adsorción física ^{351,352}. Existen una variedad de pequeños analitos (drogas, carcinógenos, poluentes) que interactúan con el DNA por intercalación o unión electrostática.

Estos sensores se han usado para la detección de trazas de poluentes y carcinógenos, tales como hidrazinas^{51,56} (dimetilhidrazina), poluentes aromáticos aminados^{51,56} (antramina o bencidina), y drogas tales como fenotiacinas^{51,57}, antramincinas³⁵⁸, antibióticos (daunomicina⁵¹, antraquinona³⁵²), nitroimidazol³⁵¹, entre otros.

La transducción se basa en la electroactividad intrínseca de estas moléculas preconcentradas, mediante CPSA. También se ha utilizado voltametría cíclica, de pulso diferencial y de onda cuadrada^{351,352}.

Hay dos esquemas más para detectar las interacciones analito/dsDNA. Estos incluyen: a) la detección de analitos no electroactivos mediante competición y desplazamiento de un marcador electroactivo, y b) cambios en la señal anódica intrínseca (debido a residuos de guanina) del dsDNA inmovilizado en el transductor, debido a variaciones químicas, estructurales o conformacionales por interacción con el analito^{49-51,54,56}. Mediante esta última estrategia se ha conseguido detectar ftalatos, PBCs, aflatoxinas, aminos aromáticas, entre otros analitos^{49,50,54}.

Técnicas electroquímicas menos frecuentes de detección de DNA

La cantidad de DNA, más específicamente el número de residuos fosfato de los nucleótidos, fue calculada a través de la cantidad de marcadores redox catiónicos en la superficie del electrodo. Esta compensación de carga de saturación de la película polianiónica de DNA por el marcador redox catiónico fue determinada utilizando cronocoloumetría como método de detección¹²⁴.

El DNA puede también medirse de manera indirecta utilizando un marcador electroquímico aniónico mediante un genosensor de canales iónicos¹²⁵. El mismo consiste en una membrana mixta de MCH y SH-PNA (debe recordarse que el PNA tiene una cadena pseudopeptídica neutra). Cuando el PNA se hibrida con el DNA complementario, aumenta la carga negativa sobre la superficie del sensor, hecho que provoca repulsión de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, y la disminución consecuente de la señal electroquímica.

También se basa en este mismo principio un sensor en formato de captura con medida de impedancia¹²⁶. La inmovilización de la sonda de captura sobre el electrodo de oro revela un aumento en la resistencia de transferencia electrónica por repulsión electrostática entre el ssDNA y el marcador $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Ese parámetro va en aumento a medida que aumenta la densidad de cargas negativas con la ulterior reacción con el DNA analito y con la sonda funcionalizada con biotina, y finalmente con la reacción de la biotina con la avidina. Esta última reacción genera el aislamiento de la superficie del sensor que consiste en una barrera para la transferencia electrónica¹²⁶.

Otro de los pocos métodos electroquímicos que no se basa en la oxidación/reducción de las bases nitrogenadas del DNA ni en indicadores electroactivos, utiliza los restos de azúcar (pentosas) del esqueleto del DNA para su detección mediante electrodos de cobre^{122,123}.

La detección de DNA se ha llevado a cabo también mediante un interruptor de canales iónicos^{377,378} (en inglés *ion channel switch biosensor*). En este caso, las sondas biotiniladas se inmovilizan a una membrana lipídica a través de estreptavidina. Dicha membrana –que posee gramicidina que actúa como un canal iónico– tiene la particularidad de que cuando existe hibridación los canales iónicos se cierran, modificándose la admitancia eléctrica de la membrana, que es detectada mediante un electrodo de oro³⁷⁹.

Se han utilizado medidas de impedancias electroquímicas para la detección de DNA en sensores de tipo FET (transistores de efecto de campo)^{380,381,382}. El DNA se ha inmovilizado

covalentemente a un sensor de tipo FET de silicio mediante APTES ^{381,382} o mediante adsorción física sobre el mismo transductor ³⁸².

La principal ventaja de estos tipos de detección es que no requieren la utilización de oligonucleótidos funcionalizados.

1.4.6 CAMPOS DE APLICACIÓN DE LOS GENOSENSORES

El diagnóstico del DNA se ha orientado en sus comienzos hacia el diagnóstico clínico, médico y forense. La detección de secuencias génicas de humanos, virus y bacterias se ha convertido fundamental en el diagnóstico de enfermedades hereditarias, de cáncer, de infecciones virales y bacterianas, así como en la investigación forense (Tabla 1.2).

Sin embargo, sus aplicaciones se han ido ampliando a áreas cada vez más diversas y fuera del ámbito hospitalario.

Tabla 1.2. *Ejemplos de aplicaciones de diagnóstico de DNA en el ámbito clínico y forense*

Fuente de DNA	Aplicación
Humano	Paternidad/Determinaciones forenses Complejo HLA DNA mitocondrial Polimorfismos de longitud (RFLP) Oncogenes/genes de supresión tumoral c-myc, c-myb, c-abl, c-sis, c-ras, proteína G, jun, p53, genes retinoblastoma Desórdenes hereditarios Fibrosis cística Hipercolesterolemia Anemia a células falciformes Enfermedad de Huntington Distrofia muscular de Duchenne β-Talasemias Fenilcetonuria Enfermedad poliquística renal Hemocromatosis Hemofilia A/Enfermedad de Von Willebrand
Viral	Citomegalovirus Papilomavirus humanos Virus de inmunodeficiencia humana Virus de la leucemia a células T Hepatitis B
Bacteriano	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Chlamydia</i> <i>Bacillus subtilis</i> (RNA) <i>Escherichia coli</i> (RNA) <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (RNA)

Nuevas aplicaciones se dirigen hacia la industria, principalmente la alimentaria, la biotecnológica y la farmacológica. Otros campos muy potentes son la investigación biomédica y la monitorización medioambiental.

Otras aplicaciones menos frecuentes pueden ser, por ejemplo, la antropología (estudio de las corrientes migratorias), la biorremediación y la valoración de la biomasa.

1.4.7 PERSPECTIVAS FUTURAS DE LOS GENOSENSORES

El desarrollo de genosensores implica los siguientes procedimientos:

- selección y/o modificación del transductor
- inmovilización de DNA en la superficie del transductor
- hibridación en la interface del transductor
- selección del sistema de detección del evento de hibridación y del formato del mismo
- transducción
- análisis de la información obtenida.

El primer punto especificado es un elemento crucial en el diseño de genosensores. En este campo se requieren nuevas propuestas en cuanto a materiales funcionalizados y, por ende, nuevas estrategias para unir ácidos nucleicos a superficies modificadas ³⁵⁰. La inmovilización de DNA a superficies requiere mayor profundidad en el estudio, e implica tener en cuenta factores tales como la orientación y la densidad del empaquetamiento del DNA. Además es necesario considerar la relevancia que tiene la unión a través de múltiples sitios o del extremo de la hebra de DNA. Por extensión, es fundamental el profundo estudio de las superficies para obtener el mayor rendimiento en la reacción de hibridación, hecho que será relevante en parámetros tales como sensibilidad y límite de detección del dispositivo.

El objetivo fundamental del diseño de genosensores es lograr mejorar, o al menos complementar, las técnicas clásicas de biología molecular o las nuevas metodologías, tales como los chips de DNA.

Pese a que los genosensores electroquímicos son más robustos y más fácilmente capaces de ser producidos de forma masiva a bajos costes, no han sido aún explotados comercialmente de manera extensiva.

Los únicos dispositivos comerciales se basan en transducción óptica. Así, el sistema genosensor BIAcore™ (Pharmacia, Suecia) ^{152,158,160,265,334}, utiliza el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales. Su fundamento se basa en el campo electromagnético generado en la superficie de un metal conductor (oro), que se excita por un haz de luz incidente de una determinada longitud de onda, aplicado en un ángulo incidente concreto. El haz de luz incidente provoca la oscilación de electrones de la superficie del metal, denominados plasmones superficiales. Este fenómeno tiene lugar sólo si se aplica el haz con un ángulo de incidencia concreto, denominado ángulo de resonancia. Bajo estas circunstancias, una parte importante de la luz se convierte en plasmones superficiales, provocando una atenuación de la luz reflejada. La relación entre la señal y la

concentración del analito se establece teniendo en cuenta que el ángulo de resonancia depende de los índices de refracción de la interficie solución-metal y que la interacción del analito con la capa de reconocimiento en contacto con el metal causa la variación en su índice de refracción. Si se monitoriza el ángulo de la luz incidente, el cambio en el índice de refracción, en relación con la cantidad de analito unido a la superficie por reconocimiento específico, se puede detectar como una variación en el ángulo de resonancia. Alternativamente, si se fija el ángulo de incidencia se puede monitorizar el cambio en la intensidad reflejada. Este dispositivo se utiliza en laboratorios de investigación para medidas cinéticas y de afinidad de sondas de DNA entre sí y DNA con proteínas. También se utiliza para analizar la manipulación del DNA inmovilizado sobre la superficie del sensor con diferentes enzimas, como endonucleasas, ligasas, polimerasas, y transcriptasas reversas. Otro sensor óptico con fundamento similar, IAsys™ (Affinity Sensor, UK) ²⁶⁵, utiliza como superficie titanio o hafnio en lugar de oro, que actúan como películas resonantes dieléctricas de gran índice de refracción (espejos resonantes). El fundamento de detección es muy similar al de resonancia de plasmones superficiales.

Este tipo de dispositivos poseen amplias aplicaciones en el campo de investigación biomédica, y serían muy útiles para diagnósticos de *screening* a gran escala si los costos operacionales se redujeran.

1.5 OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS

Durante el desarrollo de la introducción del presente trabajo, se ha comentado y discutido la relevancia que tiene la determinación de secuencias de DNA de humanos, virus y bacterias en numerosos campos de estudio. Las técnicas clásicas se ven obsoletas frente a la demanda de información genética de manera rápida y a un coste menor.

El desarrollo de los chips de DNA –dispositivos capaces de análisis multiparamétricos–, resolvió parte de esta problemática analítica, contribuyendo de manera decisiva a la consecución del Proyecto Genoma Humano y en la investigación biomédica. Sin embargo, existen aún campos de aplicación y necesidades analíticas que no se ven cubiertos con las metodologías antes mencionadas.

La industria, por ejemplo, requiere dispositivos cuya utilización no suponga supervisión profesional, cuyo manejo sea sencillo y cuyo coste sea menor.

(1) En este contexto, el objetivo principal de la presente tesis se dirige a cubrir estas demandas, mediante la construcción de **genosensores amperométricos**. La alta sensibilidad de los transductores electroquímicos, sumados al hecho de su compatibilidad con tecnologías de miniaturización/microfabricación, los convierten en dispositivos atractivos para el diagnóstico rápido y simple de DNA en campos tales como el alimentario, el biotecnológico y el medioambiental. Los bajos costes de su producción los hacen viables para su implimentación como dispositivos de un solo uso y en forma de *kit* diagnóstico.

(2) Ahora bien, la construcción de genosensores amperométricos implica la inmovilización del DNA sobre un transductor electroquímico. La consecución de este objetivo abarca la construcción, evaluación y caracterización de materiales de naturaleza electroquímica, y la evaluación de las ventajas y desventajas de las distintas metodologías de inmovilización de DNA sobre estos materiales.

(3) Durante el desarrollo de la introducción se ha visto que las metodologías de detección del DNA existentes hasta el momento en el campo de los genosensores electroquímicos mostraban ciertas falencias. Otro objetivo clave consiste entonces en el desarrollo de una estrategia de detección lo suficientemente sensible para determinar el evento de hibridación que ocurre sobre el transductor electroquímico. Es por eso que se realizará la caracterización de la reacción enzimática de la peroxidasa para implementarla por primera vez como sistema de marcación en el desarrollo de genosensores electroquímicos. Esto implica compatibilizar algunos aspectos conocidos del análisis clásico de DNA con la detección electroquímica. En este punto también se estudiará la forma más conveniente de acoplar marcadores enzimáticos a la química de los ácidos nucleicos.

(4) Por otra parte, otro objetivo es la evaluación de distintos formatos analíticos de hibridación para cubrir todas las posibles demandas de información genética, de manera de poder asegurar la versatilidad del dispositivo genosensor desarrollado en distintas situaciones analíticas.

(5) Por último, el objetivo final es la aplicación del genosensor para la resolución de muestras reales, de forma de poder validar la utilidad de los dispositivos desarrollados frente a situaciones analíticas concretas.

1.6 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Gregor Mendel. Versuche über Pflanzen-Hybriden, 1965. (www.netspace.org/MendelWeb/Mendel.html)
- ² D. L. Hartl, V. Orel. *Genetics* 1992, 131, 245-253.
- ³ D. Voet, J. G. Voet. *Bioquímica*, Omega: Barcelona, 1992.
- ⁴ B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson. *Biología molecular de la célula*, 2da ed.; Omega: Barcelona, 1994.
- ⁵ A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M.M. Cox. *Principios de Bioquímica*, 2da ed.; Omega: Barcelona, 1994.
- ⁶ J. D. Watson, F. H. C. Crick. *Nature* 1953, 171, 737-738.
- ⁷ A. Guttman. *Anal. Chem.* 1999, 71, 3598-3602.
- ⁸ M. Yang, M. E. McGovern, M. Thompson. *Anal. Chim. Acta* 1997, 346, 259-275.
- ⁹ L. T. Kirby. *DNA Fingerprinting*, Stockton Press: New York, 1990.
- ¹⁰ L. J. Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press, Inc.: San Diego, 1992.
- ¹¹ T.A. Brown. *Molecular Biology*, Bios Scientific Publishers: Oxford, 1991.
- ¹² L.G. Davis, M.D. Dibner, J. F. Battey. *Basic methods in Molecular Biology*, Elsevier: U.S.A., 1986.
- ¹³ J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2th ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.
- ¹⁴ J. Meinkoth, G. Wahl. *Anal. Biochem.* 1984, 138, 267-284.
- ¹⁵ T. R. Gingeras, D. Y. Kwoh, G. R. Davis. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5373-5390.
- ¹⁶ K. C. Reed, D. A. Mann. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 7207-7221.
- ¹⁷ M. Renz, C. Kurz. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 3435-3444.
- ¹⁸ B. G. Healey, R. S. Matson, D. R. Walt. *Anal. Biochem.* 1997, 251, 270-279.
- ¹⁹ A. Castro, J. G. K. Williams. *Anal. Chem.* 1997, 69, 3915-3920.
- ²⁰ J. Van Ness, S. Kalbfleisch, C. R. Petrie, M. W. Reed, J. C. Tabone, N. M. J. Vermeulen. *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 3345-3350.
- ²¹ L. Singh, K. W. Jones. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 5627-5638.
- ²² C. R. Graham, D. Leslie, D. J. Squirrell. *Biosens. Bioelectron.* 1992, 7, 487-493.
- ²³ N. J. C. Strachan, D. I. Gray. *Letters In Applied Microbiology* 1995, 21, 5-9.
- ²⁴ V. T. Kung, P. R. Panfili, E. L. Sheldon, R. S. King, P. A. Nagainis, B. Gomez, D. A. Ross, J. Briggs, R. F. Zuk. *Anal. Biochem.* 1990, 187, 220-227.
- ²⁵ A. C. Syvänen, M. Laaksonen, H. Söderlund. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14, 5037-5048.
- ²⁶ A. P. Abel, M. G. Weller, G. L. Duveneck, M. Ehrat, M. Widmer. *Anal. Chem.* 1996, 68, 2905-2912.
- ²⁷ S. S. Ghosh, G. F. Musso. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5353-5372.
- ²⁸ R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6230-6234.
- ²⁹ A. J. Thiel, A. G. Frutos, C. E. Jordan, R. M. Corn, L. M. Smith. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4948-4956.
- ³⁰ Y. Nagata, H. Yokota, O. Kosuda, K. Yokoo, K. Takemura, T. Kikuchi. *Febs Lett.* 1985, 183, 379-382.
- ³¹ S. Tyagi, F. R. Kramer. *Nat. Biotechnol.* 1996, 14, 303-308.
- ³² S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer. *Nat. Biotechnol.* 1998, 16, 49-53.
- ³³ L. G. Kostrikis, S. Tyagi, M. M. Mhlanga, D. D. Ho, F. R. Kramer. *Science* 1998, 279, 1228-1229.
- ³⁴ J. Anderson, H. Huang. *Strategies* 1999, 12, 109-110.
- ³⁵ M. Cayouette, A. Sucharczuk, J. Moores, S. Tyagi, F. R. Kramer. *Strategies* 1999, 12, 85-88.
- ³⁶ X. Fang, X. Liu, S. Schuster, W. Tan. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 2921-2922.
- ³⁷ X. Liu, W. Tan. *Anal. Chem.* 1999, 71, 5054-5059.
- ³⁸ X. Liu, W. Farmerie, S. Schuster, W. Tan. *Anal. Biochem.* 2000, 283, 56-63.
- ³⁹ K.J. Livak, S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, K. Deetz. *Gen. Res.* 1995, 4, 357-362.

- 40 I. A. Nazarenko, S. K. Bhatnagar, R. J. Hohman. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 2516-2521.
- 41 J. P. Knemeyer, N. Marmé, M. Sauer. *Anal. Chem.* 2000, 72, 3717-3724.
- 42 L. B. McGown, M. J. Joseph, J. B. Pitner, G. P. Vonk, C. P. Linn. *Anal. Chem.* 1995, 663A-668A.
- 43 K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori. *Anal. Chim. Acta* 1994, 286, 219-224.
- 44 S. Liu, J. Ye, P. He, Y. Fang. *Anal. Chim. Acta* 1996, 335, 239-243.
- 45 P. A. E. Piunno, U. J. Krull, R. H. E. Hudson, M. J. Damha, H. Cohen. *Anal. Chem.* 1995, 67, 2635-2643.
- 46 P. A. E. Piunno, U. J. Krull, R. H. E. Hudson, M. J. Damha, H. Cohen. *Anal. Chim. Acta* 1994, 288, 205-214.
- 47 A. H. Uddin, P. A. E. Piunno, R. H. E. Hudson, M. J. Damha, U. J. Krull. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 4139-4146.
- 48 L. Henke, P. A. E. Piunno, A. C. McClure, U. J. Krull. *Anal. Chim. Acta* 1997, 344, 201-213.
- 49 G. Chiti, G. Marrazza, M. Mascini. *Anal. Chim. Acta*, 2001, 427, 155-164.
- 50 M. Mascini, I. Palchetti, G. Marazza. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001, 369, 15-22.
- 51 J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, N. Dontha. *Biosens. Bioelectron.* 1997, 12, 587-599.
- 52 X. Chu, G. L. Shen, J. H. Jiang, T. F. Kang, B. Xiong, R. Q. Yu. *Anal. Chim. Acta* 1998, 373, 29-38.
- 53 G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 43-51.
- 54 G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini. *Anal. Chim. Acta* 1999, 387, 297-307.
- 55 X. Sun, P. He, S. Liu, J. Ye, Y. Fang. *Talanta* 1998, 47, 487-495.
- 56 J. Wang, G. Rivas, X. Cai, E. Paleček, P. Nielsen, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, C. Parrado, M. Chicharro, P. A. M. Farias, F. S. Valera, D. H. Grant, M. Ozsoz, M. N. Flair. *Anal. Chim. Acta* 1997, 347, 1-8.
- 57 J. Wang, G. Rivas, X. Cai, H. Shiraishi, P. A. M. Farias, N. Dontha, D. Lou. *Anal. Chim. Acta* 1996, 332, 139-144.
- 58 A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, U. S. Akarca, M. Ozsoz. *Anal. Chim. Acta*, 2000, 422, 139-149.
- 59 E. M. Boon, D. M. Ceres, T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton. *Nature Biotechnol.* 2000, 18, 1096-1100.
- 60 Q-Y Chen, D-H Li, Y. Zhao, H-H Yang, Q-Z Zhu, J-G Xu. *Analyst* 1999, 124, 901-906.
- 61 C. J. Squire, L. J. Baker, G. R. Clark, R. F. Martin, J. White. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, 1252-1258.
- 62 K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori. *Anal. Chem.* 1994, 66, 3830-3833.
- 63 K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori. *Sensors and Actuators B* 1998, 46, 220-225.
- 64 F. Kleinjung, F. F. Bier, A. Warsinke, F. W. Scheller. *Anal. Chim. Acta.* 1997, 350, 51-58.
- 65 M. Mecklenburg, A. Grauers, B. R. Jonsson, A. Weber, B. Danielsson. *Anal. Chim. Acta* 1997, 347, 79-86.
- 66 D. Hanafi-Bagby, P. A. E. Piunno, C. C. Wust, U. J. Krull. *Anal. Chim. Acta* 2000, 411, 19-30.
- 67 D-W. Pang, H. D. Abruña. *Anal. Chem.* 2000, 72, 4700-4706.
- 68 B. R. Horrocks, M. V. Mirkin. *Anal. Chem.* 1998, 70, 4653-4660.
- 69 S. Takenaka, M. Yokoyama, H. Kondo. *Chem. Commun.* 1997, 1, 115-116.
- 70 S. Takenaka, Y. Uto, H. Saita, M. Yokoyama, H. Kondo, D. Wilson. *Chem. Commun.* 1998, 10, 1111-1112.
- 71 S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo. *Anal. Chem.* 2000, 72, 1334-1341.
- 72 J. Wang. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 757-762.
- 73 J. Wang, G. Rivas, J. R. Fernandes, J. L. Lopez Paz, M. Jiang, R. Waymire. *Anal. Chim. Acta* 1998, 375, 197-203.
- 74 J. Wang, G. Rivas, X. Cai, M. Chicharro, C. Parrado, N. Dontha, A. Begleiter, M. Mowat, E. Paleček, P. E. Nielsen. *Anal. Chim. Acta* 1997, 344, 111-118.
- 75 J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi. *Anal. Chim. Acta* 1996, 326, 141-147.
- 76 J. Wang, E. Paleček, P. E. Nielsen, G. Rivas, X. Cai, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, P. A. M. Farias. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7667-7670.
- 77 J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P. A. M. Farias, N. Dontha. *Anal. Chem.* 1996, 68, 2629-2634.
- 78 J. Wang, G. Rivas, C. Parrado, X. Cai, M. N. Flair. *Talanta* 1997, 44, 2003-2010.

- ⁷⁹ J. Wang, G. Rivas, X. Cai, N. Dontha, H. Shiraishi, D. Luo, F. S. Valera. *Anal. Chim. Acta* 1997, 337, 41-48.
- ⁸⁰ M. T. Carter, M. Rodriguez, A. J. Bard. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8901-8911.
- ⁸¹ A. Erdem, B. Meric, K. Kerman, T. Dalbasti, M. Ozsoz. *Electroanal.* 2000, 11, 1372-1376.
- ⁸² A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, U. S. Akarca, M. Ozsoz. *Electroanal.* 1999, 11, 586-588.
- ⁸³ J. Wang, J. R. Fernandes, L. T. Kubota. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3699-3702.
- ⁸⁴ D-W. Pang, H. D. Abruña. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3162-3169.
- ⁸⁵ Z. Li, H. Wang, S. Dong, E. Wang. *Analytical Sciences* 1997, 13, 305-310.
- ⁸⁶ M. Aslanoglu, C. J. Issac, A. Houlton, B. R. Horrocks. *Analyst* 2000, 125, 1791-1798.
- ⁸⁷ J. Wang, G. Rivas, X. Cai. *Electroanalysis* 1997, 9, 395-398.
- ⁸⁸ S. R. Mikkelsen. *Electroanalysis* 1996, 8, 15-19.
- ⁸⁹ K. M. Millan, S. R. Mikkelsen. *Anal. Chem.* 1993, 65, 2317-2323.
- ⁹⁰ K. M. Millan, A. J. Spurmanis, S. R. Mikkelsen. *Electroanalysis* 1992, 4, 929-932.
- ⁹¹ K. M. Millan, A. Saraullo, S. R. Mikkelsen. *Anal. Chem.* 1994, 66, 2943-2948.
- ⁹² P. M. Armistead, H. H. Thorp. *Anal. Chem.* 2000, 72, 3764-3770.
- ⁹³ H. H. Thorp. *Trends Biotech.* 1998, 16, 117-121.
- ⁹⁴ X-H. Xu, H. C. Yang, T. E. Mallouk, A. J. Bard. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 8386-8387.
- ⁹⁵ X-H. Xu, A. J. Bard. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 2627-2631.
- ⁹⁶ J. Labuda, M. Bucková, M. Vanicková, J. Mattusch, R. Wennrich. *Electroanalysis* 1999, 11, 101-107.
- ⁹⁷ Y. Mishima, J. Motonaka, S. Ikeda. *Anal. Chim. Acta* 1997, 345, 45-50.
- ⁹⁸ Y. Mishima, J. Motonaka, K. Maruyama, K. Minagawa, S. Ikeda. *Sensors and Actuators B* 2000, 65, 340-342.
- ⁹⁹ K. Maruyama, J. Motonaka, Y. Mishima, Y. Matsuzaki, I. Nakabayashi, Y. Nakabayashi. *Sensors and Actuators. B*, 2001, 76, 215-219.
- ¹⁰⁰ T. Nogami, T. Ohto, O. Kawaguchi, Y. Zaitso, S. Sasaki. *Anal. Chem.* 1998, 70, 5296-5301.
- ¹⁰¹ J. Briggs, P. R. Panfili. *Anal. Chem.* 1991, 63, 850-859.
- ¹⁰² J. Cadet, M. Weinfeld. *Anal. Chem.* 1993, 65, 675A-682A.
- ¹⁰³ T. S. Rao, K. Jayaraman, G. R. Revankar. *Tetrahedron Letters* 1993, 34, 6192-1993.
- ¹⁰⁴ E. Paleček. *Nature* 1960, 188, 656-657.
- ¹⁰⁵ E. Paleček. *Electroanalysis* 1996, 8, 7-14.
- ¹⁰⁶ M. Fojta, E. Paleček. *Anal. Chim. Acta* 1997, 342, 1-12.
- ¹⁰⁷ E. Paleček, M. Fojta, M. Tomschik, J. Wang. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 621-628.
- ¹⁰⁸ E. Paleček, M. Fojta. *Anal. Chem.* 2001, 75A-83A.
- ¹⁰⁹ E. Paleček, P. Boublíková, F. Jelen. *Anal. Chim. Acta* 1986, 187, 99-107.
- ¹¹⁰ M. Fojta, V. Staňková, E. Paleček, P. Koscielniak, J. Mitáš. *Talanta* 1998, 46, 155-161.
- ¹¹¹ J. Wang, D. H. Grant, M. Ozsoz, X. Cai, B. Tian, J. R. Fernandes. *Anal. Chim. Acta* 1997, 349, 77-83.
- ¹¹² M. Fojta, T. Kubičárová, E. Paleček. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 107-115.
- ¹¹³ M. Fojta, L. Havran, J. Fulnečková, T. Kubičárová. *Electroanal.* 2000, 12, 926-934.
- ¹¹⁴ F. Jelen, V. Vetterl, P. Běluša, S. Hasoň. *Electroanal.* 2000, 12, 987-992.
- ¹¹⁵ L. Trnková, R. Kizek, O. Dracka. *Electroanal.* 2000, 12, 905-911.
- ¹¹⁶ A. M. Oliveira Brett, J. A. P. Piedade, S. H. P. Serrano. *Electroanal.* 2000, 12, 969-973.
- ¹¹⁷ J. Wang, X. Cai, C. Jonsson, M. Balakrishnan. *Electroanalysis* 1996, 8, 20-24.
- ¹¹⁸ J. Wang, X. Cai, J. R. Fernandes, D. H. Grant, M. Ozsoz. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4056-4059.
- ¹¹⁹ J. Wang, P. Gründler, G-U Flechsing, M. Jasinski, G. Rivas, E. Sahlin, J. L. Lopez Paz. *Anal. Chem.* 2000, 72, 3752-3756.
- ¹²⁰ J. Wang, A-N. Kawde. *Anal. Chim. Acta* 2001, 431, 219-224.
- ¹²¹ J-M. Zen, M-R. Chang, G. Ilangoan. *Analyst* 1999, 124, 679-684.

- 122 P. Singhal, W. G. Kuhr. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4828-4832.
- 123 P. Singhal, W. G. Kuhr. *Anal. Chem.* 1997, 69, 3552-3557.
- 124 A. B. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov. *Anal. Chem.* 1998, 70, 4670-4677.
- 125 H. Aoki, P. Bühlmann, Y. Umezawa. *Electroanal.* 2000, 12, 1272-1276.
- 126 A. Bardea, F. Patolsky, A. Dagan, I. Willner. *Chem. Commun.* 1999, 21-22.
- 127 C. Fan, G. Li, J. Zhu, D. Zhu. *Anal. Chim. Acta* 2000, 423, 95-100.
- 128 S. S. Rosatto, G. De Oliveira Neto, L. T. Kubota. *Electroanal.* 2001, 13, 445-450.
- 129 X. Chen, C. Ruan, J. Kong, J. Deng. *Anal. Chim. Acta* 2000, 412, 89-98.
- 130 L. Qingwen, L. Guoan, F. Jun, C. Dawen, O. Qi. *Analyst* 2000, 125, 1908-1910.
- 131 J. N. Kremsky, J. L. Wooters, J. P. Dougherty, R. E. Meyers, M. Collins, E. L. Brown. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2891-2909.
- 132 V. Lund, R. Schmid, D. Rickwood, E. Hornes. *Nucleic Acids Res.* 1988, 22, 10861-10880.
- 133 S. F. Wolf, L. Haines, J. Fisch, J. N. Kremsky, J. P. Dougherty, K. Jacobs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2911-2926.
- 134 Y. Okahata, Y. Matsunobu, K. Ijiro, M. Mukae, A. Murakami, K. Makino. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 8299-8300.
- 135 S. R. Rasmussen, M. R. Larsen, S. E. Rasmussen. *Anal. Biochem.* 1991, 198, 138-142.
- 136 R. Müller, D. P. Herten, U. Lieberwirth, M. Neumann, M. Sauer, A. Schulz, S. Siebert, K. H. Drexhage, J. Wolfrum. *Chemical Physics Letters* 1997, 279, 282-288.
- 137 B. C. F. Chu, G. M. Wahl, L. E. Orgel. *Nucleic Acids Res.* 1983, 11, 6513-6529.
- 138 J. Wang, P. E. Nielsen, M. Jiang, X. Cai, J. R. Fernandez, D. H. Grant, M. Ozsoz, A. Beglieter, M. Mowat. *Anal. Chem.* 1997, 69 (24), 5200-5202.
- 139 K. Ito, K. Hashimoto, Y. Ishimori. *Anal. Chim. Acta.* 1996, 327, 29-35.
- 140 F. Patolsky, A. Lichtenstein, I. Willner. *Nature Biotechnol.* 2001, 19, 253-257.
- 141 F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, V. Haring. *Sensors and Actuators B* 1997, 41, 189-197.
- 142 R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin. *Science* 1997, 277, 1078-1081.
- 143 H. J. Watts, D. Yeung, H. Parkes. *Anal. Chem.* 1995, 67, 4283-4289.
- 144 J. C. Andle, J. F. Vetelino, M. W. Lade, D. J. McAllister. *Sensors and Actuators B* 1992, 8, 191-198.
- 145 R. Jenison, S. Yang, A. Haeberli, B. Polinsky. *Nature Biotechnol.* 2001, 19, 62-65.
- 146 T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthelet, G. Bidan, R. Téoule. *Nucleic Acids Res.* 1994, 22, 2915-2921.
- 147 N. Lassalle, E. Vieil, J. P. Correia. *Biosens. Bioelectron.* 2001, 16, 295-303.
- 148 S. Takenaka, Y. Uto, H. Kondo, T. Ihara, M. Takagi. *Anal. Biochem.* 1994, 218, 436-443.
- 149 Y. Uto, H. Kondo, M. Abe, T. Suzuki, S. Takenaka. *Anal. Biochem.* 1997, 250, 122-124.
- 150 P. J. Bates, H. S. Dosanjh, S. Kumar, T. C. Jenkins, C. A. Laughton, S. Neidle. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23, 3627-3632.
- 151 D. Guschin, G. Yershov, A. Zaslavsky, A. Gemell, V. Shick, D. Proudnikov, P. Arenkov, A. Mirzabekov. *Anal. Biochem.* 1997, 250, 203-211.
- 152 P. Nilsson, B. Persson, M. Uhlén, P. A. Nygren. *Anal. Biochem.* 1995, 224, 400-408.
- 153 X. Chen, X-E. Zhang, Y-Q Chain, W-P Hu, Z-P Zhang, X-M Zhang, A. E. G. Cass. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 451-458.
- 154 J. C. Lewis, A. Feltus, C. M. Ensor, S. Remanathan, S. Daunert. *Anal. Chem.* 1998, 70, 579A-585A.
- 155 F. F. Bier, F. W. Scheller. *Biosens. Bioelectron.* 1996, 11, 669-674.
- 156 F. F. Bier, F. Kleinjung, F. W. Scheller. *Sensors and Actuators B* 1997, 38-39, 78-82.
- 157 F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, K. Niikura, Y. Okahata. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2043-2049.
- 158 S. Sawata, E. Kai, K. Ikebukuro, T. Iida, T. Honda, I. Karube. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 401-408.

- 159 S. Tombelli, M. Mascini, C. Sacco, A. P. F. Turner. *Anal. Chim. Acta*, 2000, 418, 1-9.
- 160 I. Babic, S. E. Andrew, F. R. Jirik. *Mutation Research*, 1996, 372, 87-96.
- 161 P. A. E. Piunno, J. Watterson, C. C. Wust, U. J. Krull. *Anal. Chim. Acta* 1999, 400, 73-89.
- 162 D. J. Stone, J. Walsh, F. M. Benes. *Mol. Brain. Res.* 1999, 71, 201-209.
- 163 E. Basyuk, E. Bertrand, L. Journot. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28 (10), i-iii.
- 164 S. A. Khan, M. S. Nawaz, A. A. Khan, C. E. Cerniglia. *Mol. Cell. Probes* 1999, 13, 233-237.
- 165 A. K. Lockley, C. G. Jones, J. S. Bruce, S. J. Franklin, R. G. Bardsley. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 1313-1314.
- 166 C. A. Jantos, R. Roggendorf, F. N. Wuppermann, J. H. Hegemann. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 1890-1894.
- 167 H. De Beenhouwer, Z. Liang, P. De Rijk, C. Van Eekeren, F. Portaels. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2994-2998.
- 168 K. Povlsen, J. S. Jensen, I. Lind. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3211-3216.
- 169 J. C. Venter et al. *Science* 2001, 291, 1304-1351.
- 170 International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature* 2001, 409, 814-941.
- 171 <http://genome.ucsc.edu>
- 172 www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide
- 173 W-H Li, Z. Gu, H. Wang, A. Nekrutenko. *Nature* 2001, 409, 847-849.
- 174 The International SNP Map Working Group. *Nature* 2001, 409, 928-933.
- 175 G. Jimenez-Sanchez, B. Childs, D. Valle. *Nature* 2001, 409, 853-855
- 176 H. C. Riethman et al. *Nature* 2001, 409, 948-951.
- 177 P. A. Futreal, A. Kasperzyk, E. Birney, J. C. Mullikin, R. Wooster, M. R. Stratton. *Nature* 2001, 409, 850-852.
- 178 C. A. Tilford et al. *Nature* 2001, 409, 943-945.
- 179 D. R. Bentley et al. *Nature* 2001, 409, 942-943.
- 180 K. T. Montgomery et al. *Nature* 2001, 409, 945-946.
- 181 T. Brüls et al. *Nature* 2001, 409, 947-948.
- 182 The International Human Genome Mapping Consortium. *Nature* 2001, 409, 934-941.
- 183 E. J. Nestler, D. Landsman. *Nature* 2001, 409, 834-835.
- 184 J. D. Clayton, C. P. Kyriacou, S. M. Reppert. *Nature* 2001, 409, 829-831.
- 185 D. D. Shoemaker et al. *Nature* 2001, 409, 922-927.
- 186 T. Kawarasaki, K. Matsumoto, J. Murofushi, M. Chikyu, Y. Itagaki, A. Horiuchi. *Theriogenology* 2000, 53, 1501-1509.
- 187 R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim. *Science* 1985, 230, 1350-1354.
- 188 D. Noble. *Anal. Chem.* 1995, 67, 613A-615A.
- 189 M. J. Mc Pherson, P. Quirze, G. R. Taylor. *PCR 1. A practical approach*, Oxford University Press: Oxford, 1996.
- 190 K. C. Chan, L. B. Koutny, E. S. Young. *Anal. Chem.* 1991, 63, 746-750.
- 191 E. M. Southern. *J. Mol. Biol.* 1975, 98, 503-517.
- 192 E. Southern, K. Mir, M. Shchepinov. *Nature Genetics Supplement* 1999, 21, 5-9.
- 193 F. C. Kafatos, C. W. Jones, A. Efstratiadis. *Nucleic Acids Res.* 1979, 7, 1541-1552.
- 194 S. Girotti, E. Ferri, S. Ghini. *Anal. Chim. Acta* 1991, 255, 387-394.
- 195 D. M. Kube, A. Srivastava. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 3375-3376.
- 196 J. A. Mangan, K. M. Sole, D. A. Mitchison, P. D. Butcher. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 675-676.
- 197 G. H. McCall. The fabrication of high density oligonucleotide arrays for hybridisation-based sequence analysis. En: W. Hori y E. Nagle (Eds), *Biochips arrays and integrated devices for clinical diagnosis*, IBC Library Series: Southborough, pp. 2.1-2.33. 1997.

- 198 T. K. Christopoulos. *Anal. Chem.* 1999, 71, 425R-438R.
- 199 F. S. Collins. *Nature Genetics Supplement* 1999, 21, 2.
- 200 E. S. Lander. *Nature Genetics Supplement* 1999, 21, 3-4.
- 201 G. H. W. Sanders, A. Manz. *Trends anal. chem.* 2000, 19, 364-378.
- 202 B. Sinclair. *Scientist* 1999, 13, 18.
- 203 Z. R. Ekins, F. W. Chu. *Trends Biotechnol.* 1999, 217-218
- 204 R. F. Service. *Science* 1998, 282, 396-399.
- 205 D. D. L. Bowtell. *Nature Genetics Supplement* 1999, 21, 25-32.
- 206 J. Wang. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, 3011-3016.
- 207 L. Shi. www.gene-chips.com.
- 208 V. G. Cheung, M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi, R. Kucherlapati, G. Childs. *Nature Genetics Supplement* 1999, 21, 15-19.
- 209 R. J. Lipshutz, S. P. A. Fodor, T. R. Gingeras, D. L. Lockhart. *Nature Genetics Supplement* 1999, 21, 20-24.
- 210 M. Beier, J. D. Hoheisel. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, e11.
- 211 E. LeProust, H. Zhang, P. Yu, X. Zhou, X. Gao. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 2171-2180.
- 212 A. Kumar, Z. Liang. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, e2.
- 213 C. A. Pelizzari, N. N. Khodarev, N. Gupta, D. P. Calvin, R. R. Weichselbaum. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, 4577-4581.
- 214 C. R. Lowe. *Current Opinion In Structural Biology* 2000, 10, 428-234.
- 215 P. O. Brown, D. Botstein. *Nature Genetics Supplement* 1999, 21, 33-37.
- 216 C. Debouck, P. N. Goodfellow. *Nature Genetics Supplement* 1999, 21, 48-50.
- 217 J. G. Hacia. *Nature Genetics Supplement* 1999, 21, 42-47.
- 218 S. Dubiley, E. Kirillov, Y. Lysov, A. Mirzabekov. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 2259-2265.
- 219 D. D. Duggan, M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer, J. M. Trent. *Nature Genetics Supplement* 1999, 21, 10-14.
- 220 S. M. Welford, J. Gregg, E. Chen, D. Garrison, P. H. Sorensen, C. T. Denny, S. F. Nelson. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 3059-3065.
- 221 C. Y. Zhong, J. Riov, R. Goren, D. Holland. *Anal. Biochem.* 2000, 282, 129-135.
- 222 Fodor, S. P. A. et al. *Science* 251, 1991, 767-773.
- 223 C.M. Henry. *Anal. Chem. News & Features* 1999, 462A-464A.
- 224 J. G. Hacia, K. Edgemon, B. Sun, D. Stern, S. P. A. Fodor, F. S. Collins. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 3865-3866.
- 225 D. E. Bassett Jr., M. B. Eisen, M. S. Boguski. *Nature Genetics Supplement* 1999, 21, 51-55.
- 226 M. U. Kopp, A. J. de Mello, A. Manz. *Science* 1998, 280, 1046-1048.
- 227 M. A. Shoffner, J. Cheng, G. E. Hvichia, L. J. Kricka, P. Wilding. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24, 375.-379.
- 228 J. Cheng, M. A. Shoffner, G. E. Hvichia, L. J. Kricka, P. Wilding. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24, 380-385.
- 229 T. B. Taylor, E. S. Winn-Deen, E. Picozza, T. M. Woudenberg, M. Albin. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 3164-3168.
- 230 I. Schneegaß, R. Bräutigam, J. M. Köhler. *Lab on a Chip* 2001, 1, 42-49.
- 231 D. Schmalzing, A. Adourian, L. Koutny, L. Ziaugra, P. Matsudaira, D: Ehrlich. *Anal. Chem.* 1998, 70, 2303-2310.
- 232 S. Liu, Y. Shi, W. W. Ja, R. A. Mathies. *Anal. Chem.* 1999, 71, 566-573.
- 233 A. T. Woolley, G. F. Sensabaugh, R. A. Mathies. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2181-2186.
- 234 C. S. Effenhausen, G. J. M. Bruin, A. Paulus, M. Ehrat. *Anal. Chem.* 1997, 69, 3451-3457.
- 235 H-P. Chou, C. Spence, A. Scherer, S. Quake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 11-13.

- 236 J. S. Bader, R. W. Hammond, S. A. Henck, M. W. Deem, G. A. McDermott, J. M. Bustillo, J. W. Simpson, G. T. Mulhern, J. M. Rothberg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 13165-13169.
- 237 X-J. Huang, Q-S Pu, Z-L. Fang. *Analyst* 2001, 126, 281-284.
- 238 D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, A. Manz. *Science* 1993, 261, 895-897.
- 239 G-B. Lee, S-H. Chen, G-R. Huang, W-C. Sung, Y-H. Lin. *Sensors and Actuators B* 2001, 75, 142-148.
- 240 A. T. Woolley, D. Hadley, P. Landre, A. J. de Mello, R. A. Mathies, M. A. Northrup. *Anal. Chem.* 1996, 68, 4081-4086.
- 241 L. C. Waters, S. C. Jacobson, N. Kroutchinina, J. Khandurina, R. S. Foote, J. M. Ramsey. *Anal. Chem.* 1998, 70, 5172-5176.
- 242 J. Cheng, L. C. Waters, P. Fortina, G. Hvichia, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey, L. J. Kricka, P. Wilding. *Anal. Biochem.* 1998, 257, 101-106.
- 243 R. P. Oda, M. A. Strausbauch, A. F. R. Huhmer, N. Borson, S. R. Jurens, J. Craighead, P. J. Wettstein, B. Eckloff, B. Kline, J. P. Landers. *Anal. Chem.* 1998, 70, 4361-4368.
- 244 N. Zhang, H. Tan, E. S. Yeung. *Anal. Chem.* 1999, 71, 1138-1145.
- 245 M. A. Burns, C. H. Mastrangelo, T. S. Sammarco, F. P. Man, J. R. Webster, B. N. Johnson, B. Foerster, D. Jones, Y. Fields, A. R. Kaiser, D. T. Burke. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 5556-5561.
- 246 M. A. Burns, B. N. Johnson, S. N. Brahmasandra, K. Handique, J. R. Webster, M. Krishnan, T. S. Sammarco, P.M. Man, D. Jones, D. Heldsinger, C. H. Mastrangelo, D. T. Burke. *Science* 1998, 282, 484-487.
- 247 D. T. Burke, C. H. Mastrangelo, M. A. Burns. *Genome Res.* 1997, 7, 189-197.
- 248 L. C. Waters, S. Jacobson, N. Kroutchinina, J. Khandurina, R. Foote, J. M. Ramsey. *Anal. Chem.* 1998, 70, 158-162.
- 249 R. G. Sosnowski, E. Tu, W. F. Butler, J. P. O'Connell, M. J. Heller. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 1119-1123.
- 250 J. Cheng, E. L. Sheldon, L. Wu, A. Uribe, L. O. Gerrue, J. Carrino, M. J. Heller, J. P. O'Connell. *Nat. Biotechnol.* 1998, 16, 541-545.
- 251 C. F. Edman, D. E. Raymond, D. J. Wu, E. Tu, R. G. Sosnowski, W. F. Butler, M. Nerenberg, M. J. Heller. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 4907-4914.
- 252 I. Inoue, Y. Wakamoto, H. Moriguchi, K. Okano, K. Yasuda. *Lab On A Chip* 2001, 1, 50-55.
- 253 P. Belgrader, M. Okuzumi, F. Pourahmadi, D. A. Borkholder, M. Allen Northrup. *Biosen. Bioelectron.* 2000, 14, 849-852.
- 254 A. J. De Mello. *Lab On A Chip* 2001, 1, 7N-12N.
- 255 O. C. Keller, J. Buffle. *Anal. Chem.* 2000, 72, 936-942.
- 256 O. C. Keller, J. Buffle. *Anal. Chem.* 2000, 72, 943-948.
- 257 H. H. Bau, J. Zhong, M. Yi. *Sensors And Actuators B* 2001, 79, 207-215.
- 258 M. B. Esch, L. E. Locascio, M. J. Tarlov, R. A. Durst. *Anal. Chem.* 2001, 73, 2952-2958.
- 259 D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson. *Biosen. Bioelectron.* 2001, 16, 121-131.
- 260 R. P. Buck, E. Lindner. *Anal. Chem.* 2001, 88A-97A.
- 261 M. De La Guardia. *Mikrochim. Acta* 1995, 120, 243-255.
- 262 E. T. Powner, F. Yalcinkaya. *Sensor review* 1997, 17, 107-116.
- 263 D. Kriz, O. Ramström, K. Mosbach. *Anal. Chem.* 1997, 345A-349A.
- 264 S. Alegret. *Els sensors químics*. Arxius de les Seccions de Ciències, Institut d'Estudis Catalans 1995, 100, 385-397.
- 265 J. E. Pearson, A. Gill, P. Vadgama. *Ann. Clin. Biochem.* 2000, 37, 119-145.
- 266 M. P. Byfield, R. A. Abuknesha. *Biosens. Bioelectron.* 1994, 9, 373-400.
- 267 M. P. Marco, S. Gee, B. D. Hammock. *Trends in Anal. Chem.* 1995, 14, 341-350.

- 268 B. L. Liu, M. A. Saltman. *Laboratory medicine*, 1996, 27, 109-115.
- 269 W. Lukosz. *Biosens. Bioelectron.* 1991, 6, 215-225.
- 270 A. Bratov, J. Peral, S. Alegret. *Química Analítica* 1995, 14, 3-16.
- 271 A. J. Killard, B. Deasy, R. O'Kennedy, M. R. Smyth. *Trends in Anal. Chem.* 1995, 14, 257-265.
- 272 R. M. Carter, M. B. Jacobs, G. J. Lubrano, G. G. Guilbault. *Anal. Lett.* 1995, 1379-1386.
- 273 E. A. H. Hall. *Biosensors*; Open University Press: Buckingham, 1990.
- 274 Marta Santandreu i Vilajosana. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona, 1998.
- 275 Marek Jurkiewicz. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona, 1998.
- 276 K. Habermüller, M. Mosbach, W. Schuhmann. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 366, 560-568.
- 277 A. W. Bott. *Curr. Seps* 1996, 14, 104-110.
- 278 M. Álvarez Icaza, V. Bilitewski. *Anal. Chem.* 1993, 65, 525A-533A.
- 279 J. Albery. *Electrode Kinetics*; Oxford University Press: Oxford, 1975.
- 280 Daniel Martorell. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona, 1995.
- 281 A. W. Bott. *Curr. Seps*. 2001, 19, 71-75.
- 282 W. R. Heineman, P. T. Kissinger. *Curr. Seps* 1989, 9, 15-18.
- 283 S. Zhang, G. Wright, Y. Yang. *Biosen. Bioelectron.* 2000, 15, 273-282.
- 284 F. Céspedes, E. Martínez Fábregas, S. Alegret. *Trends in Anal. Chem.* 1996, 15, 296-304.
- 285 D. E. Tallman, S. L. Petersen. *Electroanalysis* 1990, 2, 499-510.
- 286 R. N. Adams. *Anal. Chem.* 1958, 30, 1576.
- 287 M. A. T. Gilmartin, J. P. Hart. *Analyst* 1995, 120, 1029-1045.
- 288 S. Alegret. *Analyst* 1996, 120, 1029-1045.
- 289 S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, A. A. S. C. Machado, J. L. F. C. Lima, J. M. Paulís. *Química Analítica* 1987, 6, 278-292.
- 290 S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, F. Céspedes, E. Martínez Fábregas, M. Del Valle. *Sensors and Materials* 1996, 8, 147-153.
- 291 S. Alegret, E. Centelles, F. Céspedes, E. Martínez Fábregas, D. Martorell, A. Morales, J. Muñoz. *Biosens. Bioelectron.* 1996, 11, 335-344.
- 292 C. A. Galán Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret. *Trends in Anal. Chem.* 1996, 14, 225-231.
- 293 F. Céspedes, S. Alegret. *Food Technology and Biotechnology Review* 1996, 34, 143-145.
- 294 C. A. Galán Vidal, J. Muñoz, S. Alegret. *Thick-film biosensors*. En *Biosensors and Applications*; Academic Press: New York, 1998.
- 295 S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, J. García Raurich, E. Martínez Fábregas. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1988, 6, 749-755.
- 296 E. Figuerola, A. Florido, M. Aguilar, J. De Pablo, S. Alegret. *Anal. Chim. Acta* 1988, 215, 283-288.
- 297 S. Alegret, A. Florido, J. L. F. C. Lima, A. A. S. C. Machado. *Talanta* 1989, 36, 825-829.
- 298 S. Alegret, M. Blanco, J. Bartrolí, J. M. Paulís, J. L. F. C. Lima, A. A. S. C. Machado. *Anal. Chim. Acta* 1985, 164, 147-152.
- 299 S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, J. L. F. C. Lima, A. A. S. C. Machado, J. M. Paulís. *Anal. Lett.* 1985, 18, 2291-2303.
- 300 S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, E. Martínez Fábregas. *Analyst* 1989, 114, 1443-1447.
- 301 S. Alegret, A. Florido. *Analyst* 1991, 116, 473-476.
- 302 S. Alegret, M. T. Escalas. *Biosens. Bioelectron.* 1991, 6, 609-613.
- 303 A. Bratov, N. Abramova, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret, J. Bartrolí. *Anal. Chem.* 1995, 67, 3589-3595.
- 304 J. Almirall, M. Jurkiewicz, M. García, S. Solé, A. Liesa, J. Padilla, E. Yuste, S. Alegret, E. Martínez Fábregas. *Nefrología* 1996, 16, 524-530.

- 305 F. Valdés Perezgasga, S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí. *Sensors and Actuators B* 1993, 15-16, 214-217.
- 306 G. Palleschi, M. Mascini, E. Martínez Fàbregas, S. Alegret. *Anal. Lett.* 1988, 21, 1115-1129.
- 307 S. Alegret, E. Martínez Fàbregas. *Biosensors* 1989, 4, 287-297.
- 308 M. H. Gil, A. P. Piedade, S. Alegret, J. Alonso, E. Martínez Fàbregas, A. Orellana. *Biosens. Bioelectron.* 1992, 7, 645-652.
- 309 E. Martínez Fàbregas, S. Alegret. *Journal of Chemical Education* 1993, 71, A67-A70.
- 310 A. Orellana, E. Martínez Fàbregas, S. Alegret. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1993, 11, 921-926.
- 311 C. Campmajó, J. J. Cairó, A. Sanfeliu, E. Martínez Fàbregas, S. Alegret, F. Gòdia. *Cytotechnology* 1994, 14, 177-182.
- 312 F. Céspedes, E. Martínez Fàbregas, S. Alegret. *Anal. Chim. Acta* 1994, 284, 21-26.
- 313 F. Céspedes, E. Martínez Fàbregas, S. Alegret. *Electroanalysis* 1994, 6, 759-763.
- 314 D. Martorell, F. Céspedes, E. Martínez Fàbregas, S. Alegret. *Anal. Chim. Acta* 1994, 290, 343-348.
- 315 F. Céspedes, F. Valero, E. Martínez Fàbregas, J. Bartrolí, S. Alegret. *Analyst* 1995, 120, 2255-2258.
- 316 A. Morales, F. Céspedes, J. Muñoz, E. Martínez Fàbregas, S. Alegret. *Anal. Chim. Acta* 1996, 332, 131-138.
- 317 D. Martorell, F. Céspedes, E. Martínez Fàbregas, S. Alegret. *Anal. Chim. Acta* 1997, 337, 305-313.
- 318 C. A. Galán Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret. *Sensors & Actuators B*, 1997, 45, 55-62.
- 319 M. Santandreu, F. Céspedes, S. Alegret, E. Martínez Fàbregas. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2080-2085.
- 320 M. Másson, Z. Liu, T. Harayama, E. Kobatake, Y. Ikariyama, M. Aizawa. *Anal. Chim. Acta* 1995, 304, 353-359.
- 321 T. Vo-Dinh, B. Cullum. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 366, 540-551.
- 322 J. E. Frew, H. A. O. Hill. *Anal. Chem.* 1987, 59, 933A-944A.
- 323 W. Göpel. *Sensors and Actuators B*, 1991, 4, 7-21.
- 324 A. P. F. Turner. *Science* 2000, 290, 1315-1317.
- 325 C. Ziegler. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 366, 552-559.
- 326 F. Scheller, F. Schubert, D. Pferiffer, R. Hintsche, I. Dransfeld, R. Renneberg, U. Wollenberger, K. Riedel, M. Pavlova, M. Kühn, H. G. Müller, P. M. Tan, W. Hoffmann, W. Moritz. *Analyst* 1989, 114, 653-662
- 327 E. Magner. *Analyst* 1998, 123, 1967-1970.
- 328 U. Maskos, E. M. Southern. *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 1679-1684.
- 329 G. L. Duveneck, M. Pawlak, D. Neuschäfer, E. Bär, W. Budach, U. Pieleles, M. Ehrat. *Sensors And Actuators B* 1997, 38-39, 88-95.
- 330 T. Livache, H. Bazin, P. Caillat, A. Roget. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 629-634.
- 331 K. Bondeson, A. Frostell-Karlsson, L. Fägerstam, G. Magnusson. *Anal. Biochem.* 1993, 214, 245-251.
- 332 I. D. Parsons, B. Persson, A. Mekhafia, G. M. Blackburn, P. G. Stockley. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23, 211-216.
- 333 C. E. Jordan, A. G. Frutos, A. J. Thiel, R. M. Corn. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4939-4947.
- 334 E. Kai, K. Ikebukuro, S. Hoshina, H. Watanabe, I. Karube. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 2000, 29, 283-288.
- 335 N. C. Fawcett, J. A. Evans, L-C. Chien, N. Flowers. *Anal. Lett.* 1988, 21, 1099-1114.
- 336 R. B. Towery, N. C. Fawcett, P. Zhang, J. A. Evans. *Biosens. Bioelectron.* 2001, 16, 1-8.
- 337 M. Yang, M. Thompson. *Anal. Chem.* 1993, 65, 3591-3597.
- 338 H. Su, M. Yang, K. M. R. Kallury, M. Thompson. *Analyst* 1993, 118, 309-312.
- 339 H. Su, K. M. R. Kallury, M. Thompson. *Anal. Chem.* 1994, 66, 769-777.
- 340 H. Su, M. Thompson. *Biosens. Bioelectron.* 1995, 10, 329-340.
- 341 H. Su, P. Williams, M. Thompson. *Anal. Chem.* 1995, 67, 1010-1013.

- 342 C. Nicolini, V. Erokhin, P. Facci, S. Guerzoni, A. Ross, P. Paschkevitch. *Biosens. Bioelectron.* 1997, 12, 613-618.
- 343 R. C. Ebersole, J. A. Miller, J. R. Moran, M. D. Ward. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 3239-3241.
- 344 H. Zhang, H. Tan, R. Wang, W. Wei, S. Yao. *Anal. Chim. Acta* 1998, 374, 31-38.
- 345 M. Yang, H. C. M. Yau, W. Zhu. *Anal. Chim. Acta* 1997, 351, 177-187.
- 346 H. Zhang, R. Wang, H. Tan, L. Nie, S. Yao. *Talanta* 1998, 46, 171-178.
- 347 S. Tombelli, M. Mascini, L. Braccini, M. Anachini, A. P. F. Turner. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 363-370.
- 348 P. Guedon, T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan, Y. Levy. *Anal. Chem.* 2000, 72, 6003-6009.
- 349 X. C. Zhou, L. Q. Huang, S. F. Y. Li. *Biosens. Bioelectron.*, 2001, 16, 85-95.
- 350 M. I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 291-303.
- 351 A. M. Oliveira Brett, S. H. P. Serrano, I. Gutz, M. A. La-Scalea, M. L. Cruz. *Electroanalysis* 1997, 9, 1132-1137.
- 352 A. M. Oliveira Brett, T. R. A. Macedo, D. Raimundo, M. H. Marques, S. H. P. Serrano. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 861-867.
- 353 J. Wang, M. Jiang, B. Mukherjee. *Anal. Chem.* 1999, 71, 4095-4099.
- 354 J. Wang, M. Jiang, A-N. Kawde. *Electroanal.* 2001, 13, 537-540.
- 355 C. Xu, H. Cai, P. He, Y. Fang. *Analyst* 2001, 126, 62-65.
- 356 C. Xu, H. Cai, Q. Xu, P. He, Y. Fang. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001, 369, 428-432.
- 357 D-W. Pang, Y-P. Qi, Z-L. Wang, J-K. Cheng, J-W. Wang. *Electroanal.* 1995, 7, 774-777.
- 358 C. Tejeiro, E. De La Red, D. Marín. *Electroanal.* 2000, 12, 963-968.
- 359 L. Novotný, L. Havran, B. Josypchuk, M. Fotja. *Electroanal.* 2000, 12, 960-962.
- 360 T. Kubičárová, M. Fotja, J. Vidic, L. Havran, E. Paleček. *Electroanal.* 2000, 12, 1422-1425.
- 361 W. B. Nowall, D. O. Wipf, W. G. Kuhr. *Anal. Chem.* 1998, 70, 2601-2606.
- 362 P. Pantano, T. H. Morton, W. G. Kuhr. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 1832-1833.
- 363 W. B. Nowall, N. Dontha, W. G. Kuhr. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 1237-1244.
- 364 S. Cosnier, B. Galland, C. Gondran, A. Le Pellec. *Electroanal.* 1998, 10, 808-813.
- 365 S. Cosnier, C. Gondran, A. Le Pellec, A. Senillon. *Anal. Lett.* 2001, 34, 61-70.
- 366 S. Cosnier, M. Stoytcheva, A. Senillou, H. Perrot, R. P. M. Furriel, F. A. Leone. *Anal. Chem.* 1999, 71, 3692-3697.
- 367 L. Kumpumbu-Kalemba, M. Leclerc. *Chem. Commun.* 2000, 1847-1848.
- 368 M. B. González García, C. Fernández-Sánchez, A. Costa-García. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 315-321.
- 369 C. Padeste, A. Grubelnik, L. Tiefenauer. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 431-438.
- 370 T. M. Herne, M. J. Tarlov. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 8916-8920.
- 371 R. G. Nuzzo, D. L. Allara. *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105, 4481-4483.
- 372 C. D. Bain, E. B. Troughton, Y-T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 321-335.
- 373 I. Moser, T. Schalkhammer, F. Pittner, G. Urban. *Biosens. Bioelectron.* 1997, 12, 729-737.
- 374 H. Korri-Youssoufi, F. Garnier, P. Srivastava, P. Godillot, A. Yassar. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 7388-7389.
- 375 J. Wang, M. Jiang, A. Fortes, B. Mukherjee. *Anal. Chim. Acta* 1999, 402, 7-12.
- 376 U. J. Krull, D. P. Nikolelis, S. C. Jantzi, J. Zeng. *Electroanal.* 2000, 12, 921-925.
- 377 B. A. Cornell, V. L. B. Braach-Maksvytis, L. G. King, P. D. J. Osman, B. Raguse, L. Wiczorek, R. J. Pace. *Nature* 1997, 387, 580-583.
- 378 A. P. F. Turner. *Nature* 1997, 387, 555-557.
- 379 S. W. Lucas, M. M. Harding. *Anal. Biochem.* 2000, 282, 70-79.

³⁸⁰ C. Berggren, B. Bjarnason, G. Johansson. *Electroanal.* 2001, 13, 173-180.

³⁸¹ E. Souteyrand, J. R. Martin, J. P. Cloarec. *Lettre Des Sciences Chimiques* 1995 (agosto, setiembre, octubre).

³⁸² H. Berney, J. West, E. Haefele, J. Alderman, W. Lane, J. K. Collins. *Sensors and Actuators. B*, 2000, 68, 100-108.

CONSTRUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE TRANSDUCTORES AMPEROMÉTRICOS

ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE SU UTILIZACIÓN EN LA CONSTRUCCIÓN DE GENOSENSORES

2.1 INTRODUCCIÓN

La necesidad de metodologías analíticas robustas, sensibles y selectivas para la determinación de secuencias génicas ha favorecido el desarrollo de genosensores como metodología alternativa de análisis ¹.

El diseño de un genosensor, como se ha descrito previamente en § 1.4.7, implica los siguientes procedimientos:

- selección y/o modificación de un transductor;
- inmovilización de DNA en la superficie del transductor;
- selección del sistema de detección del evento de hibridación y del formato del mismo;
- hibridación en la interfase del transductor y, eventualmente, marcación del dúplex;
- transducción;
- análisis de la información obtenida.

El presente capítulo describe la construcción y la evaluación electroquímica de nuevos transductores amperométricos con el objetivo final de inmovilizar de manera óptima DNA sobre sus superficies activas. En este capítulo, por lo tanto, se hará hincapié, en el primer procedimiento de los especificados anteriormente, pero sin perder de vista el segundo procedimiento que constituye el objetivo final.

2.1.1 SELECCIÓN DEL TRANSDUCTOR

El primer factor a tener en cuenta es la selección del transductor basándose en el tipo de transducción que se desee en el dispositivo genosensor, es decir, transducción óptica, piezoeléctrica o electroquímica.

Por los factores expuestos en §§ 1.4.4.3 y 1.4.5, y debido a las ventajas de la amperometría como metodología analítica (§ 1.4.2.3), se ha seleccionado dicha técnica como método de transducción de la reacción de hibridación.

Otro punto importante es la selección del material básico del transductor amperométrico (§ 1.4.2.2) que luego podrá modificarse químicamente, en caso que así se requiera.

Los transductores electroquímicos más utilizados en la construcción de genosensores se basan en pasta de carbono como material base ²⁻¹³, descritos con anterioridad en la literatura en la preparación de sensores electroquímicos ¹⁴. Sin embargo, las pastas de carbono poseen propiedades físico-mecánicas poco deseables en cuanto a la preparación de genosensores robustos y en distintas configuraciones, y su estabilidad en solventes no polares es escasa. Debido a estas propiedades físico-mecánicas indeseables, este tipo de material se descartó en el presente trabajo, ya que es preferible trabajar con materiales rígidos.

En la literatura se ha reportado como materiales transductores rígidos para la construcción de genosensores electroquímicos –modificados químicamente o no– carbono vitrificado ¹⁵⁻¹⁸, grafito pirolítico ¹⁹, oro ²⁰, platino ²¹ y transductores modificados superficialmente con polímeros conductores (polipirrol electropolimerizado) ²².

En el presente caso se pensó en trabajar con composites rígidos basados en polímeros en los que se agregó, como material conductor, polvo de grafito. Este tipo de material ha sido utilizado repetidamente en la construcción de biosensores amperométricos en los laboratorios donde se ha realizado la presente tesis doctoral ²³⁻²⁵. La rigidez del composite otorga ventajas de tipo físico-mecánicas y aumenta la robustez del dispositivo. En cuanto a sus propiedades electroquímicas, el carácter dual de la superficie del composite, compuesta de partículas de grafito en un medio polimérico, augura unos fenómenos de superficie más ricos en comparación con lo que acontece con superficies continuas de materiales conductores, tales como grafito, oro o polipirrol. Esto se puede explicar por el comportamiento de microelectrodos que presenta la superficie de los composites. En efecto, si la superficie de un macroelectrodo se reduce, la señal y el ruido asociado disminuyen. En un microelectrodo se establece una difusión no lineal que aumenta la calidad de la señal ^{26, 27}. Este efecto se traduce en una mejora de la relación señal/ruido y en menores límites de detección, aunque las bajas corrientes producidas por los microelectrodos requieren instrumentación costosa. La construcción de haces de microelectrodos separados por una matriz aislante y conectados en paralelo ²⁸ conseguiría aumentar la señal total del dispositivo –que sería igual a la suma de las señales de cada microelectrodo–, pero conservando las mejoras de la relación señal/ruido que otorga el uso de microelectrodos. Los composites –formados de partículas conductoras dispersas en una matriz polimérica– muestran las mismas propiedades electroquímicas que un haz o matriz de microelectrodos.

Otro aspecto importante a resaltar de un composite es su facilidad de preparación y de modificación en volumen y, por tanto, del control de los componentes en la superficie ²³⁻²⁵.

2.1.2 INMOVILIZACIÓN DEL DNA

Una vez delimitados estos ejes básicos de los transductores –sus propiedades físico-mecánicas y sus características electroquímicas–, se procedió a evaluar otros factores que determinan la elección de los mismos.

Dado el efecto que tiene la inmovilización del DNA en el reconocimiento por su secuencia complementaria durante el proceso denominado hibridación, otro factor importante a tener en cuenta a la hora de construir un dispositivo genosensor es como inmovilizar el DNA al transductor ¹.

La selección de una metodología u otra de inmovilización determinará la necesidad o no de modificar químicamente el transductor y las características de esta modificación.

Luego del análisis de los tipos de inmovilización reportados en genosensores electroquímicos (§ 1.4.5.1), se concluyó que la forma más económica y sencilla –desde el punto de vista metodológico– de inmovilizar DNA a un transductor electroquímico es la adsorción física. La adsorción es el método de inmovilización por excelencia en los protocolos de análisis de DNA mediante métodos clásicos, por lo que existen protocolos muy conocidos y bien establecidos en la bibliografía ^{29,30}. En cuanto a su implementación en la construcción de genosensores electroquímicos, la adsorción tiene ventajas claras sobre otros procedimientos de inmovilización: no requiere reactivos especiales ni sondas de DNA funcionalizadas y los procedimientos son cortos y muy sencillos. Esto otorga ventajas desde el punto de vista de la fabricación de los genosensores, en la posibilidad de construcción de dispositivos de un solo uso y en su implementación comercial en forma de *kit*. Las desventajas de la inmovilización por adsorción consisten en la posibilidad de desorción del DNA de la superficie –que no constituiría un problema en los genosensores de un solo uso– y, lo que es más importante, en la pobre eficiencia en la reacción de hibridación debido a que la adsorción ocurre en sitios múltiples de la cadena de DNA, lo que puede desfavorecer el apareamiento de bases complementarias.

La adsorción física de DNA sobre un transductor electroquímico no requiere modificación química del material base, por lo que la principal propiedad que se ha evaluado en los materiales descritos en el presente capítulo se basa fundamentalmente en las propiedades electroquímicas de los mismos.

Por otra parte, la mayor eficiencia en la hibridación se consigue cuando ésta ocurre en disolución. La inmovilización covalente del DNA a través del extremo 3´ o 5´, y más aún si se utiliza un brazo espaciador, se aproxima a esta situación ideal, a diferencia de la adsorción a través de sitios múltiples, que provoca que la cinética de la hibridación sea más lenta ³¹⁻³⁷.

Una mayor eficiencia en la hibridación reportaría en los dispositivos genosensores mayor sensibilidad y, por lo tanto, mejores límites de detección. Además, existen protocolos de inmovilización covalente bien establecidos en la literatura. Existen desventajas en cuanto a la implementación de la inmovilización covalente en la construcción de genosensores, tales como el uso de reactivos especiales y de sondas de DNA funcionalizadas. Además, el procedimiento es laborioso y requiere tiempos mayores. A menudo se requiere regenerar la superficie del genosensor, o bien realizar para cada uso la inmovilización covalente.

Debido a que la literatura reporta más ventajas que desventajas en la inmovilización covalente del DNA sobre transductores electroquímicos en cuanto a las propiedades idóneas de hibridación, se ha considerado también la posibilidad de implementar esta metodología de inmovilización en la construcción de genosensores electroquímicos.

De las metodologías de inmovilización covalente más desarrolladas en la bibliografía, la que se consideró en primer lugar como la más conveniente es la inmovilización por unión covalente sobre grafito funcionalizado con grupos $-\text{COOH}$ ^{10-12,18}, debido a los siguientes factores:

- Se ha reportado que las superficies modificadas con grupos $-\text{COOH}$ presentan menor adsorción inespecífica por repulsión electrostática del polianión DNA ^{33,36}.
- Utiliza, para la inmovilización covalente del DNA, una reacción muy citada en la bibliografía que se basa en los reactivos EDC y NHS ^{33,34,36-43}; esta reacción constituye un método general de acoplamiento de grupos $-\text{NH}_2$ a $-\text{COOH}$ ⁴⁴⁻⁴⁶. Hay antecedentes de este tipo de reacción de inmovilización (a una variedad de soportes) de proteínas ⁴⁷ y de ácidos nucleicos derivatizados en 5' con grupos $-\text{NH}_2$ ^{1,21,33,36}. Además, para la derivatización de ácidos nucleicos en 5' con grupos $-\text{NH}_2$ se utiliza también esta metodología, para unir una diamina al extremo fosfato 5' del DNA ⁴⁰.
- La metodología se puede adoptar a oligonucleótidos no derivatizados, basándose en la nucleofilicidad del N7 en los residuos de guanina ^{10-12,18}.

2.1.3 CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE NUEVOS TRANSDUCTORES BASADOS EN COMPOSITES RÍGIDOS

En el presente capítulo se integraron las ideas expuestas en la construcción de nuevos transductores basados en composites rígidos modificados con grupos $-\text{COOH}$ y en el capítulo siguiente se llevó a cabo la reacción de inmovilización covalente en NHS y EDC (véase capítulo 3) con el objeto de inmovilizar covalentemente y en un único punto una secuencia de DNA.

Con este fin, se realizó la construcción y evaluación de los siguientes nuevos transductores basados en composites rígidos:

- grafito-metacrilato-ácido esteárico
- grafito-epoxi-ácido esteárico
- grafito-epoxi- carboximetilcelulosa
- grafito-epoxi-CM Sephadex

En cuanto a la evaluación de los transductores modificados, en el presente capítulo se realizaron únicamente caracterizaciones electroquímicas, completándose su evaluación en el capítulo 3. Pese a haber sido descartado por sus propiedades físico-mecánicas, en el presente capítulo se relata la construcción de un transductor de pasta de grafito modificado con ácido esteárico. Este transductor fue utilizado en el capítulo 3 con el objeto de comparar los resultados de la reacción de inmovilización covalente basada en EDC-NHS (ya descrita en la bibliografía para este transductor) con los nuevos transductores construídos basados en composites rígidos.

Además, en este capítulo se evalúan las propiedades electroquímicas de algunos transductores rígidos no modificados, para la posible implementación de la inmovilización por adsorción. Así, se ha comparado el comportamiento electroquímico de transductores basados en composites –tales como grafito-epoxi y grafito-metacrilato–, con carbono vitrificado (ampliamente utilizado en la bibliografía).

Además, en este capítulo se describe la construcción de un nuevo transductor basado en un composite rígido al que se le integró una membrana comercial de nylon. El transductor así construido podría ser utilizado en un futuro en genosensores de membranas recambiables en las que el DNA se inmovilizaría e hibridaría sobre la membrana de nylon mediante protocolos ampliamente descritos en la bibliografía ⁴⁸⁻⁵⁷. En este caso la detección final del evento de hibridación sería, en lugar de óptica tal como en los métodos de análisis clásicos de DNA, electroquímica. La caracterización de este transductor también se completó en el capítulo 3.

2.2 EXPERIMENTAL

2.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

2.2.1.1 Equipamiento

La señal amperométrica se midió en todos los casos con una unidad amperométrica LC-4C de la firma comercial BAS (Bioanalytical Systems Inc, USA). El sistema de detección se conectó en algunos casos a un registrador LABOGRAPH 517 (Metrohm) lo que permitió obtener los registros gráficos en función del tiempo. El electrodo de referencia utilizado fue un electrodo de doble unión Ag/AgCl (ORION 900200), y su solución de referencia interna fue suministrada por la misma firma, permitiendo así obtener el potencial del electrodo de calomelanos saturado. Como solución de referencia externa se utilizó KCl 0.1 M. El electrodo auxiliar fue un electrodo de platino (CRISON 52-67 1). Para estudios comparativos, se utilizó un electrodo de trabajo de carbono vitrificado de 3 mm de diámetro interno (BAS Bioanalytical System Inc, USA), modelo MF 2012.

2.2.1.2 Reactivos y materiales

Los composites se prepararon con grafito en polvo de tamaño de partícula de 50 μm (BDH), resina epoxi Epo-Tek H77 (Epoxy Technology, USA), metacrilato comercial Sealer-Healer 1540 (monómero QM-57T-D) (Rohm & Hass), peróxido de benzoilo hidratado (25 %) (Fluka, Suiza) como catalizador del metacrilato.

Las modificaciones de los composites se realizaron con ácido esteárico 99 % (Aldrich), carboximetilcelulosa (Aldrich) y CM Sephadex C50 (Farmacia).

Para la preparación de la pasta de carbono se utilizó aceite mineral (Aldrich).

Las membranas de nylon integradas al composite grafito-epoxi son HYBOND™ N(+) (Amersham). Para la preparación del transductor se utilizó también nylon de apertura de malla de 40 (DIN 130-40 tup 2221).

Los pulidos de la superficie de los composites se realizaron con papel de alúmina de 3 μm (polishing strips 301044-001, Orion). Los pulidos del electrodo de carbono vitrificado se realizaron con solución de polvo de alúmina (polishing alumina CF-1050, BAS) sobre un soporte de pulido (alumina polish pads MF-1040, BAS).

Los calibrados se realizaron con peróxido de hidrógeno (Merck) y, eventualmente, hexacianoferrato(II) de potasio $-\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}-$ (Merck).

Las membranas de diálisis se obtuvieron a partir de un tubo de diálisis de Medicell International realizada de celulosa regenerada que contiene glicerina, agua y aproximadamente un 0.1 % de azufre.

El resto de los reactivos utilizado fue de calidad proanálisis o similar. Las soluciones acuosas se prepararon con agua bidestilada.

2.2.2 CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA DE CALIBRACIÓN AMPEROMÉTRICA

La configuración del sistema de calibración amperométrica se muestra en la Figura 2.1. La evaluación de los transductores se realiza mediante calibrados, es decir, adiciones crecientes de una sustancia electroactiva, a un potencial adecuado. Las medidas se realizan en una celda de medida donde se disponen tres electrodos: un electrodo de referencia de doble unión Ag/AgCl, un electrodo auxiliar de hilo de platino y el sensor construido que actúa como electrodo de trabajo (véase § 2.2.4).

Como estos sensores son de una longitud reducida (18 mm, véase § 2.2.4), es necesario acoplarlos a un soporte extensor de una longitud aproximada de 10 cm, construido con el mismo tubo de PVC utilizado para el cuerpo de los sensores. En uno de los extremos se coloca un conector hembra idéntico al que se utiliza anteriormente, y en el otro extremo un conector macho adherido con pegamento instantáneo. Estos dos conectores se sueldan con estaño a los extremos de un cable conductor que une ambas conexiones.

La celda de medida contiene 20 ml de solución tamponada de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M a pH 7.0, en la cual se va adicionando peróxido de hidrógeno o ferrocianuro. La agitación se consigue mediante un imán teflonado que, por acción de un agitador magnético, favorece el transporte por convección desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo. Los tres electrodos están conectados a una unidad amperométrica (§ 2.2.1.1), a través de la cual se puede fijar el potencial de trabajo y ajustar el cero relativo en la escala de intensidades, consiguiendo así eliminar el valor de la corriente residual.

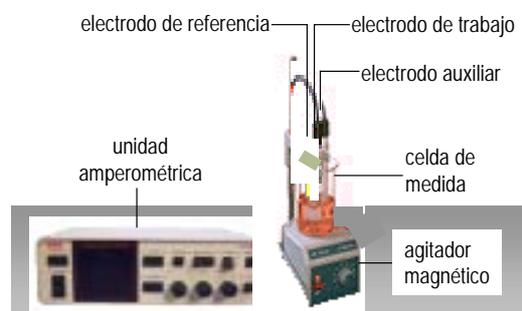


Figura 2.1. Sistema de detección amperométrico, en donde se muestra la disposición de los electrodos –de referencia, auxiliar y de trabajo–, de la celda de medida, del agitador magnético y de la unidad amperométrica.

2.2.3 CONSTRUCCIÓN DEL CUERPO DEL SENSOR AMPEROMÉTRICO

Para la construcción del cuerpo del transductor se utilizó una conexión hembra de 2 mm de diámetro. En su extremo se soldó una lámina de cobre circular, de la cual se eliminó mediante HNO_3 la capa de óxido que podría tener. Esta capa de óxido, de no eliminarse, podría aumentar la resistencia al paso de la corriente y, por lo tanto, disminuir la sensibilidad del transductor. Esta conexión se introdujo en un tubo cilíndrico de PVC de 6 mm de diámetro interno, de 8 mm de diámetro externo y de 18 mm de longitud. La rosca metálica que posee la conexión permitió que esta última quede bien fijada en un extremo del tubo de PVC, mientras que en el otro extremo quedó una cavidad virtual de 3 mm de profundidad. En esta cavidad posteriormente se introdujo el composite preparado (véase §§ 2.2.5.1, 2.2.6.1, 2.2.7.1, 2.2.7.2 y 2.2.8), tal como se puede observar en la Figura 2.2.

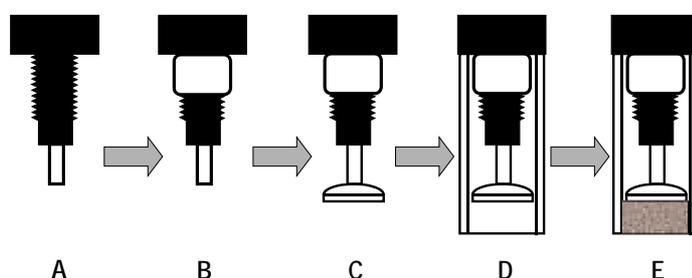


Figura 2.2. Etapas de la construcción del cuerpo del transductor amperométrico. Al conector hembra de 2 mm de diámetro (A), se le coloca una rosca metálica (B). Luego, se le suelda una lámina de cobre circular (C). Posteriormente, se le coloca el tubo de PVC (D). En la cavidad virtual se introduce el composite preparado (E).

2.2.4 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS TRANSDUCTORES ELECTROQUÍMICOS

2.2.4.1 Condiciones de calibración

Para llevar a cabo la evaluación amperométrica de los transductores, se aplicó el potencial correspondiente a la detección de una sustancia electroactiva respecto a un electrodo de calomelanos saturado, en una solución tamponada agitada, que contiene una concentración elevada de electrolito soporte (KCl) para favorecer la conductividad y minimizar la corriente de migración (fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH = 7.0). Cuando se utilizó H_2O_2 , se aplicó su potencial de oxidación, es decir 1150 mV (vs Ag/AgCl). Cuando se utilizó $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, se aplicó también su potencial de oxidación, es decir, 280 mV (vs Ag/AgCl).

Una vez que la señal se estabilizaba, se iba adicionando la sustancia mientras se realizaban las correspondientes lecturas de intensidad de corriente. Las calibraciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ \text{C}$).

2.2.4.2 Efecto de la agitación

La agitación en el sistema debe ser la misma para distintos calibrados, de manera tal que los resultados puedan ser comparables. De esta manera, la agitación siempre se mantuvo constante y utilizando el mismo imán teflonado.

2.2.4.3 Renovación de la superficie

Se procedió a la evaluación de la reproducibilidad obtenida en la superficie luego de someterla a procedimientos de pulido, con el objeto de así regenerar la superficie para posteriores usos.

Inmediatamente antes de la calibración de los sensores, se los sometió al procedimiento de pulido mediante el uso sucesivo de los siguientes papeles abrasivos, para el caso de los composites:

1. papel de vidrio (N ° 600).
2. papel de vidrio (N ° 800).
3. papel de alúmina de 3 μm

En todos los casos, el pulido se realizó con la superficie del sensor humectada con agua bidestilada y luego del pulido, la superficie se limpió con agua bidestilada mediante una jeringa, para eliminar los restos de material mal adherido.

Los pulidos del electrodo de carbono vitrificado se realizaron agregando una gota de solución de polvo de alúmina sobre un soporte de pulido especial.

2.2.4.4 Pretratamiento de la superficie con ultrasonidos

El interés por obtener superficies sensoras lo más reproducibles llevó a estudiar el efecto del tratamiento anterior al calibrado de la superficie de los transductores con ultrasonidos. Para evaluar su efectividad, se pulieron los electrodos (véase § 2.2.4.3) y se sumergió la superficie de los mismos (vigilando de no colocar en agua la junta eléctrica) en 2 ml de agua bidestilada y se sometieron a ultrasonidos durante 2 minutos. Posteriormente, se colocó en la mayoría de las determinaciones la membrana de diálisis (véase § 2.2.4.6) y se calibró en el sistema amperométrico descrito en § 2.2.2, mediante el procedimiento descrito en § 2.2.4.1.

2.2.4.5 Observación microscópica de las superficies

Los transductores basados en composites modificados, antes y después del tratamiento con ultrasonidos, fueron observados en el microscopio (10X) con el fin de identificar con más detalle cambios microscópicos en la superficie del sensor.

Los transductores de grafito-epoxi y de carbono vitrificado fueron también observados con microscopía electrónica de barrido con el objeto de caracterizar sus superficies. Para tal fin se ha utilizado un voltaje acelerado de 10 KV y una resolución de 100 μm .

2.2.4.6 Utilización de membranas de diálisis durante la calibración

Se ha comprobado que la interposición de una interfase que actúe de barrera difusional (como una membrana de diálisis) entre el medio de calibrado y el transductor, mejora la estabilidad de

las lecturas obtenidas y que, además, mejora la reproducibilidad entre calibrados realizados sobre las mismas condiciones de incubación ²⁵. No obstante, se observan dos hechos: tiempo de respuesta más largos y menores señales de intensidad comparados con el mismo transductor, en las mismas condiciones, sin membrana de diálisis. Esto se puede explicar si se tiene en cuenta que la membrana de diálisis supone una barrera de difusión, en el microentorno de la superficie del sensor. Su presencia, que no es totalmente imprescindible, estabiliza la señal y reduce el ruido, contribuyendo a mejorar la relación señal/ruido. Este efecto es especialmente notorio cuando se trabaja a potenciales altos –tal como el potencial de oxidación de H_2O_2^- , que produce ruidos mayores.

Inmediatamente antes de la calibración del transductor, y después de su pretratamiento [pulido (§ 2.2.4.3), lavado y/o ultrasonificación (§ 2.2.4.4)], se recubrió la superficie del sensor con una membrana de diálisis de 2 x 2 cm aproximadamente. Estas membranas fueron acondicionadas previamente en agua a ebullición, con el objeto de homogeneizar el tamaño de los poros.

Se sujetó mediante una junta tórica y se selló con *parafilm* (Figura 2.3). Posteriormente, todo el conjunto se incorporó al sistema de detección amperométrica. En todos los casos de calibrados con H_2O_2 se han utilizado membranas de diálisis (excepto para la evaluación del transductor grafito-epoxi-carboximetilcelulosa).

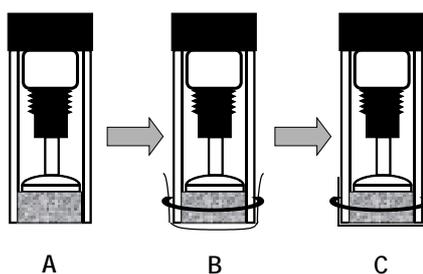


Figura 2.3. Procedimiento de sujeción de una membrana de diálisis al cuerpo del sensor: Al sensor recién construido (A), se le coloca la membrana de diálisis por sobre su superficie mediante una junta tórica (B). Aspecto del sensor luego de sujeta la membrana y recubierta la junta tórica con parafilm (C).

2.2.5 COMPOSITE GRAFITO-METACRILATO MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO

2.2.5.1 Preparación, curado y conservación del composite

El composite se preparó mezclando grafito en polvo y metacrilato en una relación 1:1 en peso. A esta mezcla se le incorporó peróxido de benzoilo como catalizador de la polimerización (endurecedor), en una proporción 24:1 partes en peso, respectivamente. Una vez que el composite, se homogeneizó correctamente, se agregó en este caso el ácido esteárico (que otorgó funciones carboxílicas al transductor), en distintos porcentajes en peso respecto a la masa total del composite (4 y 6 % p/p). Finalmente, el material resultante fue nuevamente homogeneizado e incorporado en el cuerpo del transductor amperométrico, construídos según se ha descrito en § 2.2.3.

Se prepararon lotes de sensores con composite modificados con ácido esteárico y lotes de sensores con composite grafito-metacrilato únicamente (sensores no modificados) con el objeto de comparar los resultados entre estos lotes y observar el efecto en la respuesta amperométrica de la introducción de ácido esteárico en el composite.

Ambos tipos de sensores (modificados o no) fueron curados durante tres días a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno en una cámara herméticamente cerrada, por la cual se hizo circular nitrógeno intermitentemente (generando así un ambiente ausente de oxígeno). El curado se realiza en atmósfera de nitrógeno debido a que el oxígeno ambiental inhibe la reacción de polimerización del metacrilato, e impide el correcto endurecimiento del composite si este gas está presente durante la reacción ²⁵.

Una vez curados, los electrodos se pulieron (véase § 2.2.4.3) y se sometieron (en los casos en que se quiso evaluar este procedimiento) a ultrasonidos (véase §2.2.4.4). Posteriormente, se les colocó la membrana de diálisis (véase § 2.2.4.6).

La regeneración de la superficie (cuando fue necesario) se realizó mediante el mismo procedimiento de pulido.

Los electrodos se conservaron en lugar seco y limpio, a temperatura ambiente.

2.2.5.2 Evaluación del transductor grafito-metacrilato modificado con ácido esteárico

La evaluación se realizó mediante calibrados con H₂O₂ en el sistema descrito en § 2.2.2. Los parámetros de calibración utilizados fueron los descritos en § 2.2.4.1.

2.2.6 COMPOSITE GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO

2.2.6.1 Preparación, curado y conservación del composite

El composite se preparó mezclando grafito en polvo y resina Epo-Tek H77 en una relación 1:4 partes en peso. Esta resina epoxi está constituida por dos componentes: la resina propiamente dicha y el endurecedor, que se combinaron en una proporción de 20:3 partes en peso, respectivamente. Una vez que el composite se homogeneizó correctamente, se agregó en este caso el ácido esteárico (para otorgar funciones carboxílicas al transductor), en distintos porcentajes en peso respecto a la masa total del composite (1 y 2 % p/p). Finalmente, el material resultante fue nuevamente homogeneizado e incorporado en el cuerpo del transductor amperométrico, construidos según se ha descrito en § 2.2.3.

Se prepararon lotes de sensores con composite modificado con ácido esteárico y lotes de sensores con composite grafito-epoxi únicamente (sensores no modificados) con el objeto de comparar los resultados entre estos lotes y observar el efecto en la respuesta amperométrica de la introducción de ácido esteárico en el composite.

Ambos tipos de sensores (modificados o no) fueron curados durante una semana a una temperatura entre 25 y 40°C.

Una vez curados, los electrodos se pulieron (véase § 2.2.4.3) y se sometieron (en los casos en que se quiso evaluar este procedimiento) a ultrasonidos (véase §2.2.4.4). Posteriormente, se les colocó la membrana de diálisis (véase § 2.2.4.6).

La regeneración de la superficie (cuando fue necesario) se realizó mediante el mismo procedimiento de pulido.

Los electrodos se conservaron en lugar seco y limpio, a temperatura ambiente.

2.2.6.2 Evaluación del transductor grafito-epoxi modificado con ácido esteárico

La evaluación se realizó mediante calibrados con H_2O_2 en el sistema descrito en § 2.2.2. Los parámetros de calibración utilizados fueron los descritos en § 2.2.4.1.

2.2.7 COMPOSITE GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON MACROMOLÉCULAS CON FUNCIONES CARBOXÍLICAS

2.2.7.1 Sensores de composite grafito-epoxi modificado con carboximetilcelulosa

El procedimiento de preparación y curado del composite es idéntico al descrito en § 2.2.6.1, excepto que en el composite modificado se adicionó, en este caso, carboximetilcelulosa en lugar de ácido esteárico con el objeto de funcionalizar los sensores con grupos carboxílicos, provenientes de esta macromolécula. En este caso los porcentajes de carboximetilcelulosa fueron 2 y 3 % p/p.

Una vez curados, los electrodos se pulieron (véase § 2.2.4.3). En este caso no se les colocó membrana de diálisis.

La regeneración de la superficie (cuando fue necesario) se realizó mediante el mismo procedimiento de pulido.

Los electrodos se conservaron en lugar seco y limpio, a temperatura ambiente.

La evaluación se realizó mediante calibrados con H_2O_2 en el sistema descrito en § 2.2.2. Los parámetros de calibración utilizados fueron los descritos en § 2.2.4.1.

2.2.7.2 Sensores de composite grafito-epoxi modificado con CM Sephadex C50

El procedimiento de preparación del composite es idéntico al descrito en § 2.2.6.1, excepto que en el composite modificado se adicionó, en este caso, CM Sephadex C50 en lugar de ácido esteárico con el objeto de funcionalizar los sensores con grupos carboxílicos, provenientes de esta macromolécula. En este caso los porcentajes de CM Sephadex adicionados fueron de 2 % p/p de resina seca y de 4 % p/p de resina húmeda.

El curado y la conservación de los composites se realizaron de la misma manera a lo que se describió en § 2.2.6.1.

La evaluación se realizó mediante microscopía (véase § 2.2.4.5).

2.2.8 COMPOSITE DE PASTA DE GRAFITO MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO

El composite se preparó mezclando grafito en polvo y aceite mineral en una relación 70:30 partes en peso respectivamente²⁻¹³. Una vez que la pasta se homogeneizó correctamente, se agregó el ácido esteárico (para modificar con funciones carboxílicas al transductor), en un porcentaje en peso respecto a la masa total del composite de 4.5 % p/p. Finalmente, el material resultante fue

nuevamente homogeneizado e incorporado en el cuerpo de los transductores amperométricos, construídos según se ha descrito en § 2.2.3.

Se prepararon lotes de sensores con pasta de grafito modificado con ácido esteárico, y lotes de sensores con pasta de grafito únicamente (sensores no modificados) con el objeto de comparar los resultados entre estos lotes y observar el efecto en la respuesta amperométrica de la introducción de ácido esteárico en la pasta de carbono.

A diferencia de los sensores basados en composites rígidos, los composites de pasta de carbono no requieren un paso de curado. Una vez construídos, los sensores se pulieron directamente con papel de alúmina de 3 μm , debido a que el material es más sensible (desde el punto de vista mecánico) que los composites rígidos de polímeros. La regeneración de la superficie se realizó mediante el mismo procedimiento, cuando fue necesario.

Los electrodos se conservaron en lugar seco y limpio, a temperatura ambiente.

La evaluación de estos transductores se realizará en el capítulo 3, § 3.3.5.

2.2.9 SELECCIÓN DEL TRANSDUCTOR IDÓNEO PARA SU POSIBLE IMPLEMENTACIÓN EN GENOSENSORES CON DNA ADSORBIDO

El objeto de este experimento es la selección de un material transductor rígido –basándose en primera instancia fundamentalmente en sus propiedades electroquímicas– para su posible implementación como transductor en genosensores en los que el DNA se inmovilice por adsorción sobre dicho material.

Se seleccionó el material transductor idóneo entre los composites rígidos estudiados (grafito-epoxi y grafito-metacrilato) y carbono vitrificado, basándose en los siguientes criterios:

- Disponibilidad y coste del material
- Propiedades electroquímicas –i.e. sensibilidad del transductor–

La evaluación se realizó mediante calibrados con H_2O_2 en el sistema descrito en § 2.2.2. Los parámetros de calibración utilizados fueron descritos en § 2.2.4.1.

2.2.9.1 Preparación, curado y conservación del composite grafito-metacrilato

El procedimiento de construcción es idéntico al descrito en § 2.2.5.1, excepto que en este caso sólo se prepararon sensores de composite únicamente (los denominados sensores no modificados). El curado y la conservación de los composites se realizaron de la misma manera a lo descrito en § 2.2.5.1.

Una vez curados (véase § 2.2.5.1), los electrodos se pulieron (véase § 2.2.4.3). La regeneración de la superficie (cuando fue necesario) se realizó mediante el mismo procedimiento de pulido.

Los electrodos se conservaron en lugar seco y limpio, a temperatura ambiente.

2.2.9.2 Preparación, curado y conservación del composite grafito-epoxi

El procedimiento de construcción es idéntico al descrito en § 2.2.6.1, excepto que en este caso sólo se prepararon sensores de composite únicamente (los denominados sensores no

modificados). El curado y la conservación de los composites se realizaron de la misma manera a lo descrito en § 2.2.6.1.

Una vez curados (véase § 2.2.6.1), los electrodos se pulieron (véase § 2.2.4.3). La regeneración de la superficie (cuando fue necesario) se realizó mediante el mismo procedimiento de pulido.

Los electrodos se conservaron en lugar seco y limpio, a temperatura ambiente.

2.2.10 TRANSDUCTOR AMPEROMÉTRICO CON MEMBRANA DE NYLON HYBOND™ INTEGRADA A LA SUPERFICIE

2.2.10.1 Selección del composite idóneo para la transducción amperométrica

Los criterios de selección del mejor material transductor para la integración de la membrana de nylon HYBOND fueron los mismos que los que se describen en § 2.2.9. Se seleccionó el material transductor idóneo entre los composites rígidos estudiados (grafito-epoxi y grafito-metacrilato) y carbono vitrificado.

La preparación, curado y conservación de los composites grafito-metacrilato y grafito-epoxi se realizó según se explica en §§ 2.2.9.1 y 2.2.9.2, respectivamente.

La evaluación se realizó mediante calibrados con H_2O_2 en el sistema descrito en § 2.2.2. Los parámetros de calibración utilizados fueron descritos en § 2.2.4.1.

2.2.10.2 Integración de la membrana de nylon HYBOND™ al transductor grafito-epoxi

Este tipo de membranas es ampliamente utilizado en procedimientos de dot-blot²⁹ y southern blot⁵⁸ clásicos (§§ 1.2.3.1 y 1.2.3.2), sobre las cuales se absorbe el DNA.

En cuanto las características constitutivas de las membranas, son de nylon 66 soportadas sobre poliestireno y son microporosas (tamaño de poro de 0.45 μm). En cuanto a sus propiedades superficiales son hidrofílicas, con *potencial Z* superficial positivo entre pH 2.0 y 12.0. En cuanto a sus propiedades físicas, son mecánicamente resistentes.

El objetivo de este procedimiento consiste en evaluar si pueden integrarse a un transductor amperométrico, y si son capaces de ser permeables a las especies electroactivas, ya que es de suponer que, al igual que las membranas de diálisis, éstas actúen como barrera difusora.

Inmediatamente antes de la calibración del transductor, y después de su pretratamiento [pulido (§ 2.2.4.3), lavado y/o ultrasonificación (§ 2.2.4.4)], se recubrió la superficie del sensor con una membrana de nylon HYBOND™ cortada circularmente con un tróquer de 7 mm de diámetro aproximadamente. Las mismas fueron previamente lavadas con agua bidestilada filtrada, secadas y conservadas en lugar seco. Esta membrana circular se sujetó al transductor mediante una malla de nylon de poro grueso (que no actúa como barrera difusora, sino que su papel únicamente es de sujeción), de 2 x 2 cm. Ésta última se sujetó mediante una junta tórica al cuerpo del transductor y se selló con *parafilm*, como se puede ver en la Figura 2.4. Posteriormente, todo el conjunto se incorporó al sistema de detección amperométrica.

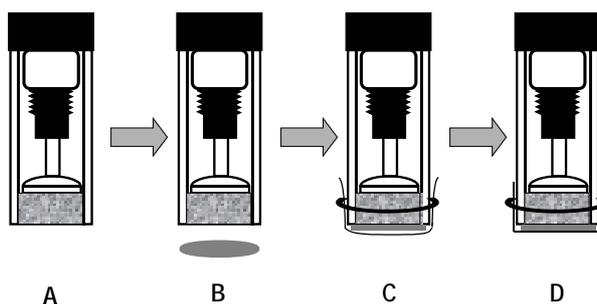


Figura 2.4. Procedimiento de montaje del transductor grafito-epoxi-membrana HYBOND™: al sensor recién construido (A), se le colocó por encima de la superficie una membrana circular HYBOND™ (B) y, posteriormente, se le colocó la membrana de sujeción de nylon de malla gruesa por sobre su superficie mediante una junta tórica (C). Aspecto del sensor luego de sujeta la membrana y recubierta la junta tórica con parafilm (D).

La evaluación se realizó mediante calibrados con $K_4[Fe(CN)_6]$ en el sistema descrito en § 2.2.2. Los parámetros de calibración utilizados fueron descritos en § 2.2.4.1.

Se espera que, al igual que las membranas de diálisis, la membrana HYBOND™ mejore la estabilidad de las lecturas obtenidas y que, además, mejore la reproducibilidad entre calibrados realizados sobre las mismas condiciones, estabilizando la señal y reduciendo el ruido.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 EVALUACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-METACRILATO MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO

2.3.1.1 Efecto de la incorporación de ácido esteárico al composite grafito-metacrilato

Al incorporar un nuevo componente al composite es necesario evaluar el nuevo material obtenido, que puede mostrar propiedades electroquímicas diferentes a las del composite sin modificar. En la Figura 2.5 se observa el efecto de la incorporación, en un porcentaje de 4 y 6 %, de ácido esteárico. Las respuestas amperométricas se deben a la oxidación de peróxido de hidrógeno al potencial de 1150 mV (vs Ag/AgCl). Para la obtención de cada una de las curvas de calibrado con cada transductor, se realizaron al menos 3 mediciones, puliendo la superficie cada vez (véase reproducibilidad del pulido en § 2.3.1.2)

Se puede deducir de la Figura 2.5 que al agregar ácido esteárico en un 4 % la sensibilidad aumenta (mayor respuesta), respecto al composite no modificado (la pendiente de la recta aumenta desde 11368 a 13936 $\mu A/mM$). Este hecho se puede explicar por un efecto de microelectrodos incrementado con la adición de ácido esteárico, respecto al composite sin modificar. El material conductor (grafito) se separa entre sí por material no conductor (polímero metacrilato y ácido

esteárico); en lugar de comportarse el transductor como una superficie continua conductora, el material así formado posee mayor conducción porque se comporta como haces de microelectrodos.

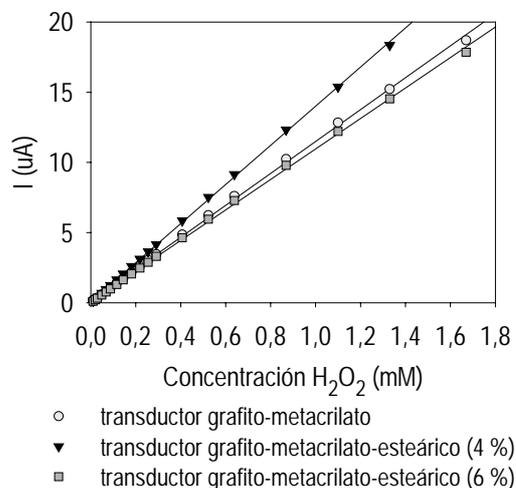


Figura 2.5. Comparación de la respuesta amperométrica de sensores basados en el composite grafito-metacrilato, modificados con 4 y 6 % de ácido esteárico. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: H₂O₂. Potencial aplicado: 1150 mV (vs Ag/AgCl).

Por otro lado, se observa una caída de la sensibilidad (en comparación con el transductor no modificado), cuando en el transductor se adiciona un 6 % de ácido esteárico (la pendiente de la recta cae a 10857 $\mu\text{A}/\text{mM}$). En este caso, predomina el efecto de la característica no conductora del ácido esteárico (caída óhmica). Por esto se seleccionó como cantidad óptima de ácido esteárico un porcentaje de 4 % de material.

2.3.1.2 Efecto del pulido en la superficie del transductor grafito-metacrilato modificado con ácido esteárico

En la Figura 2.6, se observa la reproducibilidad del pulido del transductor grafito-metacrilato-ácido esteárico.

Se observa una buena reproducibilidad de la respuesta, por lo que se puede deducir que el pulido es una metodología adecuada para renovar la superficie del sensor.

El pulido se consiguió comenzando con un papel de vidrio de manera de que sea más agresivo y más efectivo. Posteriormente, el papel de alúmina permite homogeneizar la rugosidad de la superficie, hecho que favorece la obtención de superficies reproducibles y evita el elevado ruido de fondo que se obtiene si la superficie es muy rugosa.

2.3.1.3 Pretratamiento de la superficie con ultrasonidos

El aspecto superficial de los composites después de someterlo a ultrasonidos es muy diferente a cuando no se lo ha sometido a este proceso, hecho que puede evidenciarse a simple vista.

En la Figura 2.7, se muestra el efecto del pretratamiento con ultrasonidos en la respuesta amperométrica sobre un mismo transductor grafito-metacrilato modificado con ácido esteárico (4 %), y su comparación con la curva obtenida por lavado previo de la superficie durante 30 minutos, en buffer

fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M a pH 7, en agitación (misma condiciones que los calibrados). Como puede observarse, la respuesta es similar en ambos casos.

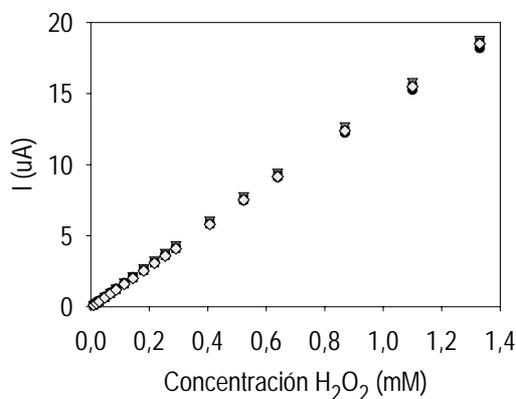


Figura 2.6. Evaluación de la reproducibilidad del pulido de un transductor grafito-metacrilato-esteárico (4 %). La respuesta amperométrica se debe a la oxidación de H₂O₂. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: H₂O₂. Potencial aplicado: 1150 mV (vs Ag/AgCl).

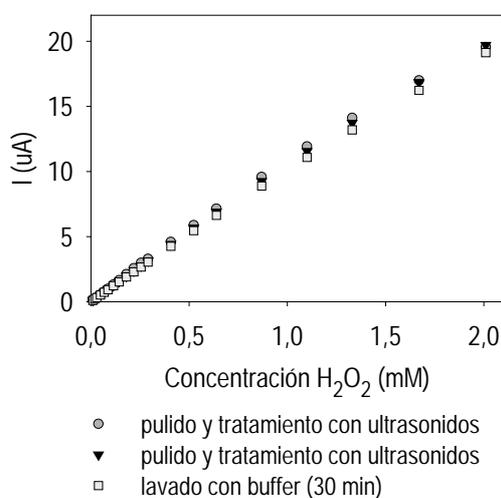


Figura 2.7. Efecto de la aplicación de ultrasonidos, como pretratamiento del composite grafito-metacrilato-ácido esteárico (4 %) previo a la calibración con H₂O₂. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: H₂O₂. Potencial aplicado: 1150 mV (vs Ag/AgCl).

Los valores obtenidos mediante el tratamiento de pulido-ultrasonidos son reproducibles y comparables al sometimiento de la superficie a un lavado en agitación. Además, las lecturas son más estables si el transductor se somete a este tratamiento. Sin embargo, si se comparan estos resultados con los obtenidos mediante simple pulido, se observa que la sensibilidad del material disminuye notablemente (la pendiente de la recta cae desde 13936 a 9919 a $\mu\text{A}/\text{mM}$). Además, la recta pierde algo de linealidad. En la Figura 2.8 se observan los resultados del mismo composite con y sin tratamiento con ultrasonidos. Por cada curva se realizaron al menos tres determinaciones.

Si se atribuye que el composite aumenta su sensibilidad debido al incremento de ácido esteárico hasta un porcentaje del 4 %, según lo que sugiere la Figura 2.5, estos resultados podrían indicar la pérdida de ácido esteárico de la superficie del sensor, teniendo en cuenta que:

- El tratamiento con ultrasonidos no afecta los valores del composite grafito-metacrilato no modificados.
- La respuesta del composite con 4 % de ácido esteárico posterior al tratamiento con ultrasonidos desciende hasta los valores del blanco del composite.

Los mismos resultados se obtuvieron con el transductor grafito-metacrilato-esteárico (6 %) (no mostrados).

Estas caracterizaciones electroquímicas no pueden asegurar la correcta modificación del transductor, por lo que se han realizado experimentos posteriores (véase capítulo 3) para poder concluir respecto a este punto.

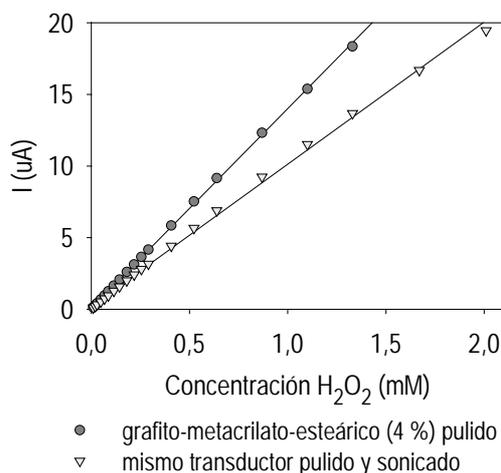


Figura 2.8. Pérdida de sensibilidad del composite grafito-metacrilato-ácido esteárico (4 %) con tratamiento de ultrasonidos. Los resultados sugieren la pérdida del ácido esteárico. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: H_2O_2 . Potencial aplicado: 1150 mV (vs Ag/AgCl).

2.3.1.4 Observación microscópica de la superficie

Antes de la aplicación de ultrasonidos en los blancos grafito-metacrilato se observa, con la ayuda de una lupa, una superficie rallada y reluciente, pero luego de la ultrasonificación, no se observa ningún tipo de marca y se distingue la orientación del grafito de tonalidad más opaca. Además, aparecen unos poros pequeños que anteriormente estarían ocupados por restos de material que no pudieron eliminarse por el lavado posterior al pulido y que se encontrarían mal adheridos a la superficie sensora.

Sin embargo, mediante el análisis con lupa no se puede observar ninguna diferencia adicional de los sensores modificados respecto a los no modificados, por lo que mediante esta metodología no se puede asegurar la pérdida de ácido esteárico.

2.3.2 EVALUACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO

2.3.2.1 Efecto de la incorporación de ácido esteárico al composite grafito-epoxi

Se ha evaluado el nuevo material obtenido con la adición de ácido esteárico en unos porcentajes de 1 y 2 % en el composite grafito-epoxi. La cantidad de ácido esteárico en este composite fue menor porque admite menos carga de material que el metacrilato ²⁵. Las respuestas amperométricas se deben a la oxidación de H₂O₂ a 1150 mV. Para la obtención de cada una de las curvas de calibrado se realizaron al menos 3 determinaciones con cada transductor.

Al igual que ocurriera con el composite grafito metacrilato, al aumentar la cantidad de ácido esteárico (en este caso hasta un 1 %), la sensibilidad del material aumenta respecto al blanco (la pendiente de la recta aumenta desde 15773 a 17933 $\mu\text{A}/\text{mM}$), hecho que se puede explicar por el efecto de microelectrodos (véase § 2.3.1.1). Por otro lado, también se observa una caída de la sensibilidad (la pendiente de la recta cae a 13637 $\mu\text{A}/\text{mM}$), cuando se adiciona al composite, en este caso, un 2 % de ácido esteárico. En este caso también predominaría la característica no conductora del ácido esteárico. Por esto se seleccionó como cantidad óptima un 1 % de ácido esteárico.

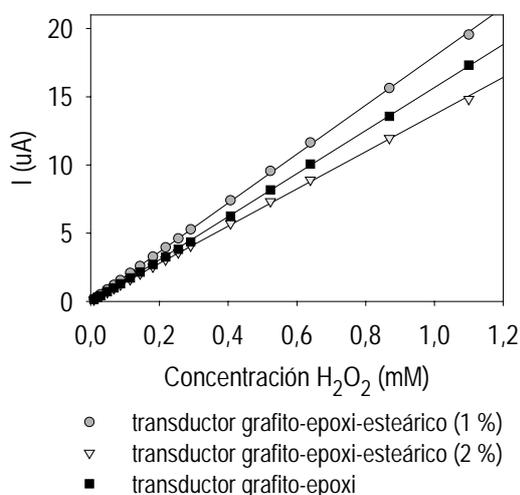


Figura 2.9. Comparación de la respuesta amperométrica de sensores basados en el composite grafito-epoxi, modificados con 1 y 2 % de ácido esteárico. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: H₂O₂. Potencial aplicado: 1150 mV (vs Ag/AgCl).

2.3.2.2 Efecto del pulido en la superficie del transductor grafito-epoxi modificado con ácido esteárico

En la Figura 2.10, se observa la reproducibilidad del pulido del transductor grafito-epoxi-esteárico.

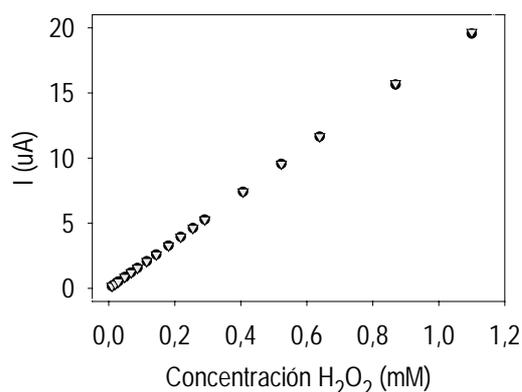


Figura 2.10. Evaluación de la reproducibilidad del pulido de un transductor grafito-epoxi-esteárico (1 %). La respuesta amperométrica se debe a la oxidación de H₂O₂. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: H₂O₂. Potencial aplicado: 1150 mV (vs Ag/AgCl).

Se observa una buena reproducibilidad de la respuesta, por lo que se puede deducir que el pulido es una metodología adecuada para renovar la superficie del sensor.

El pulido recomendado se consiguió comenzando con un papel de vidrio de manera de que sea más agresivo y más efectivo. Posteriormente, el papel de alúmina permite homogeneizar la rugosidad de la superficie, hecho que favorece la obtención de superficies reproducibles y evita el elevado ruido de fondo que se obtiene si la superficie es muy rugosa.

2.3.2.3 Pretratamiento de la superficie con ultrasonidos

El aspecto superficial de los composites después de someterlo a ultrasonidos es muy diferente a cuando no se lo ha sometido a este proceso.

En la Figura 2.11, se muestra el efecto del pretratamiento con ultrasonidos sobre un mismo transductor grafito-epoxi-ácido esteárico (1 %).

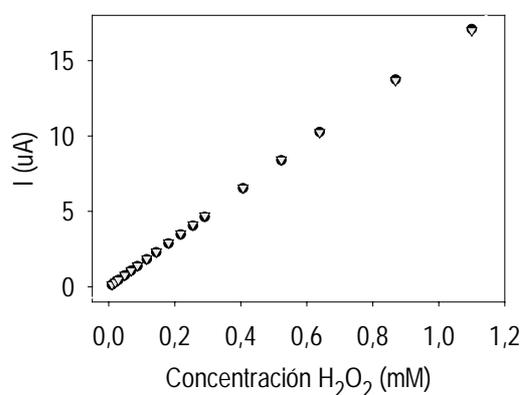


Figura 2.11. Efecto de la aplicación de ultrasonidos, como pretratamiento del composite grafito-epoxi-ácido esteárico (1 %) previo a la calibración con H₂O₂. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: H₂O₂. Potencial aplicado: 1150 mV (vs Ag/AgCl).

Los valores obtenidos mediante el tratamiento de ultrasonidos son reproducibles y comparables. Además, las lecturas son más estables cuando se aplica este tratamiento al transductor. Sin embargo, si se comparan estos resultados con los obtenidos mediante simple pulido, se observa que la sensibilidad del material se modifica notablemente y, al igual que lo que ocurre con el grafito-metacrilato, la sensibilidad disminuye (la pendiente de la recta cae desde 18034 a 15622 $\mu\text{A}/\text{mM}$). En la Figura 2.12 se observan los resultados del mismo transductor con y sin tratamiento con ultrasonidos. Por cada curva de calibrado se realizaron al menos tres determinaciones.

Si se atribuye que el composite aumenta su sensibilidad debido al incremento de ácido esteárico hasta un porcentaje del 1 %, según lo que sugiere la Figura 2.9, estos resultados podrían indicar la pérdida de ácido esteárico de la superficie del sensor, teniendo en cuenta que:

- El tratamiento con ultrasonidos no afecta los valores del composite grafito-epoxi no modificado.
- La respuesta del composite con 1 % de ácido esteárico posterior al tratamiento con ultrasonidos desciende hasta los valores del blanco del composite.

Los mismos resultados se obtuvieron con el transductor grafito-epoxi-ácido esteárico (2 %) (no se muestran).

Los resultados análogos obtenidos para el composite grafito-metacrilato modificado con ácido esteárico y grafito-epoxi modificado con ácido esteárico refuerzan la hipótesis de pérdida del ácido esteárico en ambos tipos de composites.

Estas caracterizaciones electroquímicas no pueden asegurar la correcta modificación del transductor, por lo que se han hecho experimentos posteriores (véase capítulo 3) para poder concluir respecto a este punto.

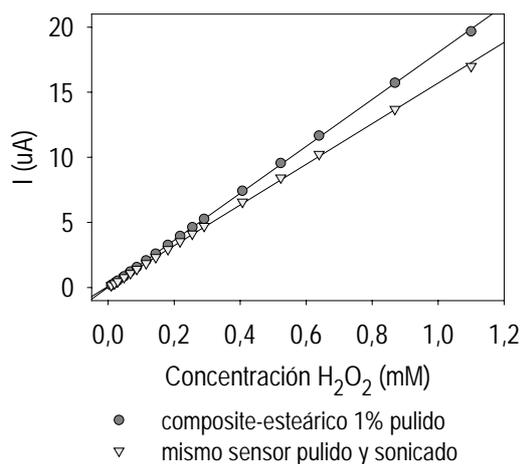


Figura 2.12. Pérdida de sensibilidad del composite grafito-epoxi-ácido esteárico (1 %) con tratamiento de ultrasonidos. Los resultados sugieren la pérdida del ácido esteárico. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: H_2O_2 . Potencial aplicado: 1150 mV (vs Ag/AgCl).

2.3.3 EVALUACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON CARBOXIMETILCELULOSA

2.3.3.1 Efecto del pulido en la superficie del transductor grafito-epoxi modificado con carboximetilcelulosa

Se observó que cuando se lavaba con agua el transductor después de los pulidos para eliminar restos del material mal adherido, se formaba sobre la superficie una película viscosa, que se estimó que se debía a la carboximetilcelulosa que se eliminaba del transductor. De todas formas, se calibró el transductor, sin utilizar membrana de diálisis.

En la Figura 2.13, se observa la reproducibilidad del pulido del transductor grafito-epoxi-carboximetilcelulosa.

Se observa una escasa reproducibilidad de la respuesta, que se debe a la pérdida inmediata de carboximetilcelulosa del transductor, en menor o mayor grado, hecho que hace imposible calibrados consecutivos con reproducibilidad.

Debido a estos resultados no se evaluaron los transductores con 2 % de carboximetilcelulosa.

2.3.3.2 Observación microscópica de la superficie

Para confirmar la pérdida de carboximetilcelulosa, se observó la superficie del transductor antes y después de lavar la superficie con buffer fosfato 0.1 M KCl 0.1 M pH 7 durante 10 minutos (tiempo que tarda en realizarse un calibrado). Antes de lavar, se observaba una superficie rallada y reluciente, con islas de material de diferente índice de refracción, pero luego del lavado, estas islas se transformaron en poros grandes y de tamaño irregular, y la superficie presentaba un aspecto muy heterogéneo. Se supuso que estos poros se formaron por desalojo de la carboximetilcelulosa, por lo que no se han realizado otros estudios de esta superficie.

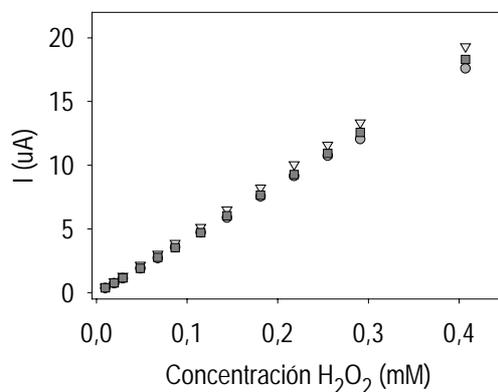


Figura 2.13. Evaluación de la reproducibilidad del pulido de un transductor grafito-epoxi-carboximetilcelulosa (3 %). La respuesta amperométrica se debe a la oxidación de H₂O₂. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: H₂O₂. Potencial aplicado: 1150 mV (vs Ag/AgCl).

2.3.4 EVALUACIÓN DEL TRANSDUCTOR GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON CM SEPHADEX

2.3.4.1 Efecto del pulido en la superficie del transductor grafito-epoxi modificado con CM Sephadex

En primer lugar se evaluó el composite con resina seca pero, al igual que en el caso anterior, se observó que cuando se lavaba con agua el transductor después del pulido para eliminar restos del material mal adherido, protuían hacia la superficie unas partículas esféricas, que se estimó que se trataba de la resina, y que podían observarse a simple vista. Debido a la alta capacidad de hinchamiento de la resina, al hidratarse el polímero no podría contenerla en su interior por lo que se desprendía del transductor (Figura 2.14). Se consideró que no tenía sentido evaluar este transductor, y se prepararon unos nuevos con un 4 % de resina húmeda. La idea era que durante el curado, ocurriría la polimerización del composite conservando el tamaño de los poros hidratados, mientras se deshidrataría la resina. Al volverse a hidratar, las partículas de resina se encontrarían con tamaños de poros con capacidad para alojarlas. Sin embargo, debido que al hidratarse la resina aumenta más de 100 veces su peso, la cantidad de material que quedaba en la superficie era insignificante. No se realizaron otros estudios sobre esta superficie.

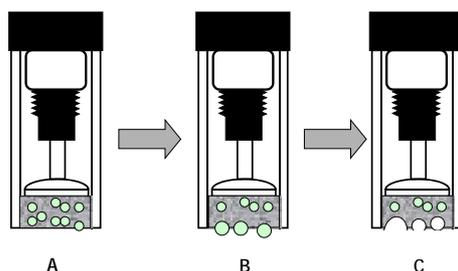


Figura 2.14. Aspecto del composite grafito-epoxi-CM Sephadex C50 antes de humectarse (A), después de humectada (B), y luego de agitación vigorosa en buffer, en donde quedan huecos en el composite que fueran ocupados por la resina antes de desprenderse (C).

2.3.5 EVALUACIÓN DE TRANSDUCTORES DE GRAFITO NO MODIFICADOS PARA SU POSIBLE IMPLEMENTACIÓN EN GENOSENSORES CON DNA ADSORBIDO

La selección del material idóneo para su posible implementación como transductor en genosensores en los que el DNA se inmovilice por adsorción sobre dicho material se realizó entre transductores rígidos basados en composites (grafito-epoxi y grafito-metacrilato no modificados) y en carbono vitrificado. Ya se ha explicado que el composite de pasta de carbono se descartó debido a sus propiedades físico-mecánicas indeseables.

Esta selección en primera instancia se basó fundamentalmente en la evaluación de las propiedades electroquímicas de dichos materiales

La evaluación se realizó mediante calibrados con H_2O_2 en el sistema descrito en § 2.2.2. Los parámetros de calibración utilizados fueron descritos en § 2.2.4.1.

Una vez elegido el mejor transductor en cuanto a sus propiedades electroquímicas, se evaluó la reproducibilidad de fabricación y la reproducibilidad en la obtención de superficies del material renovadas mediante el tratamiento de pulido.

En las secciones siguientes se muestran los resultados de cada uno de estos experimentos.

2.3.5.1 Comparación de las propiedades electroquímicas de distintos transductores rígidos

El primer criterio es evaluar cual de los tres posee mayor respuesta amperométrica, debido a que implicará una mayor sensibilidad del transductor, hecho clave para el desarrollo de genosensores.

En la Figura 2.15 se puede observar que el transductor que posee mayor sensibilidad eléctrica y que, por lo tanto, ofrecerá mayor sensibilidad en la respuesta amperométrica es el transductor grafito-epoxi.

En este punto es importante destacar que el composite grafito-metacrilato admite un mayor porcentaje de material conductor (un 50 % de grafito en polvo), respecto al composite grafito-epoxi (que admite un 20 % de grafito en polvo), por lo que se esperaba que el composite grafito-metacrilato mostrara una mayor respuesta amperométrica. Pero, sin embargo, y pese a que admite menos material conductor, el composite grafito-epoxi mostró mayor sensibilidad que el composite grafito-metacrilato (con pendientes de recta de 18067 y de 11261 $\mu A/mM$, respectivamente).

Este hecho sugiere la importancia de proseguir el estudio hacia nuevos materiales basados en composites rígidos, ya que sus propiedades eléctricas pueden, a veces, resultar imprevisibles.

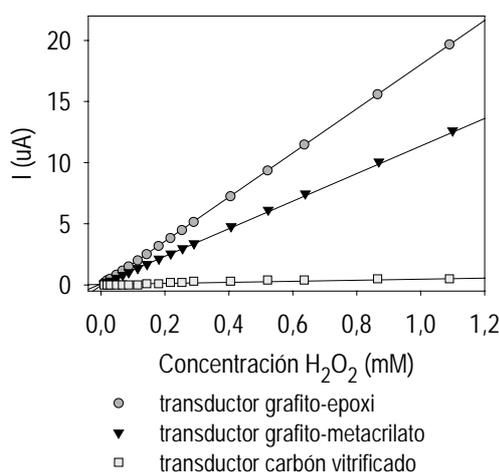


Figura 2.15. Selección del transductor óptimo para su posible implementación como transductor en genosensores en los que el DNA se inmovilice por adsorción sobre dicho material. La respuesta amperométrica se debe a la oxidación de H_2O_2 . Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: H_2O_2 . Potencial aplicado: 1150 mV (vs Ag/AgCl).

Otro hecho destacable es la marcada ganancia en sensibilidad de los composites frente al carbono vitrificado (con una pendiente de recta de 438 $\mu A/mM$), pese a que este último es un material ampliamente utilizado en genosensores amperométricos. Estos resultados confirman la mejora de las

propiedades electroquímicas por el efecto de microelectrodos (§ 2.1.1) debido al carácter dual de la superficie del composite, compuesta de partículas de grafito en un medio polimérico, respecto a superficies continuas de materiales conductores, tal como el carbono vitrificado.

En este punto es importante destacar que pese a que el diámetro interno de los sensores basados en el composite grafito-epoxi es de 7 mm, éste tiene una superficie electroactiva del 20 % – ya que, como se dijo, admite un 20 % de material conductor– (§ 2.2.6.1).

Como el sensor basado en carbono vitrificado es de 3 mm y está compuesto íntegramente por material conductor, ambos sensores presentan geoméricamente la misma superficie electroactiva, con lo cual la ganancia de respuesta amperométrica se debe presumiblemente al efecto de microelectrodos o a una diferencia en la rugosidad de la superficie conductora (véase § 2.3.3.2).

Debido a estos resultados, el composite grafito-epoxi se seleccionó como el material más idóneo –de entre los materiales estudiados– para su utilización en genosensores en el cual el DNA se inmovilizaría por adsorción. Mientras que el carbono vitrificado se ha utilizado en la construcción de genosensores electroquímicos, no se ha reportado el uso de composites rígidos en este tipo de dispositivos. Las excelentes propiedades electroquímicas que han mostrado los composites animan a la investigación de nuevas matrices poliméricas para su implementación en genosensores electroquímicos.

En los siguientes apartados se estudia, por tanto, la reproducibilidad en la fabricación de los sensores basados en composite grafito-epoxi y de la renovación de su superficie mediante pulido.

2.3.5.2 Observación microscópica de la superficie

Las superficies de los electrodos de grafito-epoxi así como el de carbono vitrificado fueron observados por microscopía electrónica de barrido (Figura 2.16).

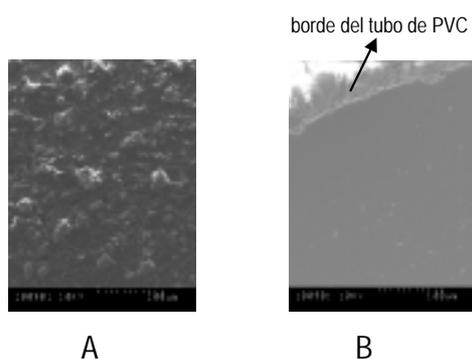


Figura 2.16. *Microscopía electrónica de barrido de las superficies de un electrodo grafito-epoxi (A) y de carbono vitrificado (B). Las superficies fueron pulidas según § 2.2.4.3. Se ha aplicado para ambas el mismo voltaje de aceleración (10 KV) y la misma resolución (100 μ m).*

Como puede observarse en estas imágenes, la superficie del transductor grafito-epoxi parece tener grupos de material acumulados en áreas aleatorias. Desde el punto de vista topográfico, parecerían tener distintas alturas debido a sus profundidades aparentes.

Sin embargo, la superficie del transductor de carbono vitrificado se caracteriza por su aspecto pulido y por la ausencia de grupos de material.

La presencia de estos acúmulos de material en el transductor grafito-epoxi resulta en un aumento en su área superficial comparado con el carbono vitrificado. Este hecho implica una mayor capacidad de adsorción física de materiales sobre su superficie. Estos grupos de material podrían explicar también su comportamiento como arreglos de microelectrodos.

2.3.5.3 Reproducibilidad de la fabricación de los sensores basados en un composite grafito-epoxi

A la hora de fabricar un genosensor es muy importante tener una buena reproducibilidad de la fabricación de los sensores, de cara a una futura implementación comercial.

Para tal fin, se compararon dos lotes de sensores fabricados en dos días distintos (con 120 días de diferencia, aproximadamente), y utilizando un reactivo comercial Epo-Tek H77 distinto (es decir, de distinto lote).

Cada uno de estos lotes –compuesto de tres sensores cada uno– fue construido con la misma pasta, es decir, con la proporción de componentes del composite exactamente idéntica y homogeneizados de la misma manera. La única diferencia entre los sensores de cada lote consistía en la construcción del cuerpo del sensor (véase Figura 2.2, pasos A a D).

La Figura 2.17 muestra la reproducibilidad en la construcción de los sensores de un mismo lote, y de lotes diferentes.

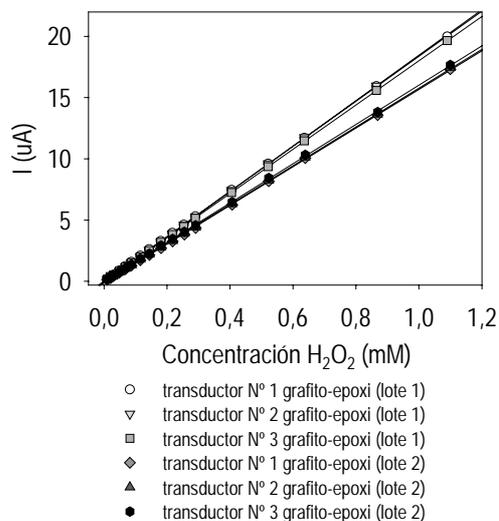


Figura 2.17. Estudio de la reproducibilidad en la construcción de los sensores de un mismo lote, y de lotes diferentes. La respuesta amperométrica se debe a la oxidación de H₂O₂. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: H₂O₂. Potencial aplicado: 1150 mV (vs Ag/AgCl).

Como puede observarse, la reproducibilidad de los sensores para una mismo lote (es decir, preparados con la misma pasta) es excelente. Sin embargo, en la figura se observa que la reproducibilidad de sensores preparados en días diferentes, con otra pasta y con otro reactivo comercial es menor. La primera causa atribuible a esta diferencia es la utilización de otro reactivo de polímero comercial. Sin embargo, también puede deberse a la diferencia en la homogeneización de la pasta, antes del curado.

Debido a estos resultados, es importante a la hora de comparar resultados, utilizar sensores de un mismo lote.

2.3.5.4 Reproducibilidad del pulido de la superficie del transductor grafito-epoxi

Una buena reproducibilidad en el pulido de un mismo transductor es fundamental si se pretende reutilizar el mismo electrodo para nuevas mediciones.

Como puede observarse en la Figura 2.18, se observa una buena reproducibilidad de la respuesta, por lo que se puede deducir que el pulido es una metodología adecuada para renovar la superficie del sensor basado en un composite grafito-epoxi.

La metodología de pulido recomendado se consigue comenzando con un papel de vidrio de manera de que sea más agresivo y más efectivo. Posteriormente, el papel de alúmina permite homogeneizar la rugosidad de la superficie, hecho que favorece la obtención de superficies reproducibles.

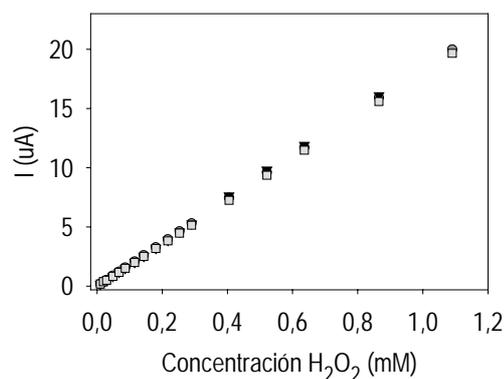


Figura 2.18. Evaluación de la reproducibilidad del pulido de un transductor grafito-epoxi. La respuesta amperométrica se debe a la oxidación de H_2O_2 . Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: H_2O_2 . Potencial aplicado: 1150 mV (vs Ag/AgCl).

2.3.6 TRANSDUCTOR AMPEROMÉTRICO CON MEMBRANA DE NYLON HYBOND™ INTEGRADA A LA SUPERFICIE

2.3.6.1 Selección del composite idóneo para la transducción amperométrica

La selección del material idóneo para su implementación en genosensores en los que el DNA se inmovilice por adsorción sobre una membrana de nylon HYBOND™ integrada al transductor se realizó entre materiales rígidos basados en composites (grafito-epoxi y grafito-metacrilato no modificados) y en carbono vitrificado.

El criterio de selección es el mismo que se explicara en § 2.3.5. Esta selección en primera instancia se basó fundamentalmente en la evaluación de las propiedades electroquímicas de dichos materiales.

La evaluación se realizó mediante calibrados con H_2O_2 en el sistema descrito en § 2.2.2. Los parámetros de calibración utilizados fueron descritos en § 2.2.4.1.

El primer criterio que se evaluó fue cual de los tres posee mayor respuesta amperométrica, debido a que implicará una mayor sensibilidad del transductor, hecho clave para el desarrollo de biosensores.

En la Figura 2.15 se puede observar que el transductor que posee mayor sensibilidad eléctrica y que, por lo tanto, ofrecerá mayor sensibilidad es el transductor grafito-epoxi. Por esto se seleccionó para posteriores estudios con la membrana HYBOND™ este transductor.

Además, el composite grafito-epoxi demostró tener una excelente reproducibilidad en la fabricación de los sensores en lotes iguales (véase § 2.3.5.3) y en la obtención de superficies del material renovadas mediante el tratamiento de pulido (véase § 2.3.5.4).

2.3.6.2 Comparación de la respuesta amperométrica de los transductores grafito-epoxi y grafito-epoxi con una membrana de nylon HYBOND™ integrada a la superficie

La integración de la membrana de nylon al transductor grafito-epoxi se realizó como se describe en § 2.2.10.2.

Como ya se explicara, este tipo de membranas es ampliamente utilizado en procedimientos de dot-blot y southern blot clásicos (§§ 1.2.3.1 y 1.2.3.2), sobre las cuales se absorbe el DNA.

El hecho de evaluar la posibilidad de integración de estas membranas sobre un transductor grafito-epoxi consiste en que los protocolos de inmovilización sobre estas membranas son ampliamente conocidos y descritos en la literatura.

La idea sería proponer una manera de medida del evento de hibridación mediante una metodología analítica alternativa (la amperometría), en lugar de los métodos ópticos ampliamente utilizados en las metodologías de análisis clásicos de DNA, mediante la construcción de biosensores de membranas recambiables.

El objetivo de este procedimiento consiste en evaluar si pueden integrarse a un transductor amperométrico y si son capaces de ser permeables a las especies electroactivas. La Figura 2.19 muestra que, como era de suponer y al igual que en el caso de las membranas de diálisis, la membrana de nylon actúa como barrera difusora. Así, la interposición de la membrana de nylon entre el transductor y las especies electroactivas de la solución provoca una disminución en la sensibilidad de la respuesta amperométrica. La pendiente de la recta cae desde $264697 \mu\text{A}/\text{mM}$, para el transductor grafito-epoxi desnudo, a $2335 \mu\text{A}/\text{mM}$ para el transductor grafito-epoxi con la membrana de nylon HYBOND™ integrada, según el procedimiento que se explica en § 2.2.10.2.

Como puede observarse en la figura, la reproducibilidad de la renovación de la superficie mediante pulido es excelente, tanto para el transductor grafito-epoxi desnudo evaluado mediante otra sustancia electroactiva (véase también § 2.3.5.4), y para el transductor grafito-epoxi- HYBOND™.

Pese a estos resultados, el transductor grafito-epoxi-HYBOND™ muestra funcionar correctamente y ser permeable a especies electroactivas. Esto augura la posibilidad de la construcción de biosensores de membranas recambiables, mediante una transferencia tecnológica directa. En este caso, el protocolo de hibridación del DNA se podría llevar a cabo tal como en los métodos clásicos –y que están ampliamente descritos en la literatura–, con la única diferencia en la detección, que en lugar de óptica sería electroquímica. Las membranas modificadas mediante

protocolos conocidos se integrarían al composite grafito-epoxi, mediante un esquema de sensores de membranas recambiables.

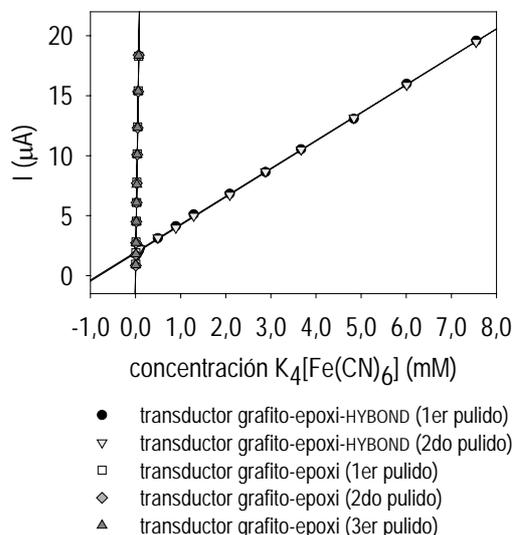


Figura 2.19. Comparación de los transductores grafito-epoxi y grafito-epoxi-HYBOND. Evaluación de la reproducibilidad del pulido de dichos transductores. La respuesta amperométrica se debe a la oxidación de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Medio: fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Sustrato: $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Potencial aplicado: 280 mV (vs Ag/AgCl).

2.4 CONCLUSIONES

1. El efecto de la incorporación de ácido esteárico a un composite grafito-metacrilato es el aumento de la sensibilidad del transductor hasta un porcentaje de 4 % (*efecto de microelectrodos*), mientras que una carga mayor de ácido esteárico (6 %) provoca una disminución en la sensibilidad debido a que predomina el efecto no conductor de este componente (efecto de caída óhmica).
2. Se obtienen superficies reproducibles de grafito-metacrilato-ácido esteárico si se pulen antes del calibrado; el pulido se puede considerar una metodología efectiva para renovar la superficie del transductor.
3. El tratamiento con ultrasonidos por 2 min o el lavado (con agitación) por 30 min del transductor grafito-metacrilato-ácido esteárico (4 y 6 %) produce lecturas más estables, pero provoca una disminución de la sensibilidad del transductor que puede deberse a la pérdida de ácido esteárico. La observación microscópica no ayuda a confirmar este hecho.
4. El mismo efecto que se explica en 1 (para grafito-metacrilato) se observa con la incorporación de ácido esteárico a un composite grafito-epoxi, pero en este caso el aumento de la sensibilidad ocurre hasta un porcentaje de 1 % de esteárico. La disminución de la respuesta se observa a un contenido de ácido esteárico del 2 %.

5. Se obtienen superficies reproducibles de grafito-epoxi-ácido esteárico si se pulen antes del calibrado por lo que esta metodología se puede considerar efectiva para renovar la superficie de este transductor.
6. El tratamiento con ultrasonidos por 2 min del transductor grafito-epoxi -ácido esteárico (1 y 2 %) produce lecturas más estables, pero provoca la disminución de la sensibilidad del transductor que puede deberse a la pérdida de ácido esteárico. La observación microscópica no ayuda a confirmar este hecho.
7. El composite de metacrilato acepta mayor carga de ácido esteárico que el composite de epoxi.
8. Los resultados obtenidos de la caracterización electroquímica de los composites grafito-epoxi y grafito-metacrilato con ácido esteárico no confirman una correcta modificación del transductor. Por esto, se realizarán experiencias posteriores (véase capítulo 3), para confirmar este hecho.
9. El transductor grafito-epoxi-carboximetilcelulosa (3 %) presenta una escasa reproducibilidad en la respuesta luego de pulidos consecutivos de la superficie, que se debe a la pérdida inmediata de carboximetilcelulosa del transductor, hecho que hace imposible calibrados consecutivos con reproducibilidad. La observación microscópica de la superficie recién pulida y sometida a lavado en las mismas condiciones que durante un calibrado, confirma que la carboximetilcelulosa se elimina del transductor dejando poros irregulares en su lugar. Esta manera de funcionalizar la superficie no es óptima.
10. El mismo efecto se observa al intentar funcionalizar el composite grafito-epoxi con CM Sephadex C50, por lo que este material tampoco puede utilizarse con eficacia.
11. El transductor rígido que ha mostrado mejores propiedades electroquímicas para su posible implementación en genosensores con DNA adsorbido directamente sobre el material es el composite grafito-epoxi, frente a grafito-metacrilato y carbono vitrificado.
12. Los composites han mostrado una respuesta amperométrica sensiblemente superior al carbono vitrificado. Esta mayor sensibilidad puede justificarse por el efecto de microelectrodos o por una mayor porosidad de la superficie (confirmado por microscopía electrónica de barrido), que incrementaría el área electroactiva de los composites respecto al carbono vitrificado. Mientras que el carbono vitrificado se ha utilizado en la construcción de genosensores electroquímicos, no se ha reportado el uso de composites rígidos en este tipo de dispositivos.
13. Los sensores basados en composites grafito-epoxi muestran una buena reproducibilidad en la construcción, siempre y cuando se preparen con el mismo composite, es decir, que pertenezcan al mismo lote. La disparidad en la reproducibilidad entre lotes puede deberse a la utilización de otro lote de reactivo comercial, o a diferencias en la homogeneización de la pasta, previo a su curado.
14. La reproducibilidad en la renovación de la superficie mediante el procedimiento de pulido de los transductores grafito-epoxi es muy buena.
15. Como transductor para integrar la membrana de nylon HYBOND™ se seleccionó grafito-epoxi, debido a que posee mayor respuesta amperométrica que grafito-metacrilato y carbono vitrificado, hecho que hace esperar que la sensibilidad del dispositivo final sea mayor.

16. Se ha comprobado la viabilidad de integrar la membrana de nylon HYBOND™ al transductor grafito-epoxi. El transductor así construido podría ser utilizado en un futuro en genosensores de membranas recambiables en las que el DNA se inmoviliza sobre la membrana de nylon mediante protocolos ampliamente descritos en la bibliografía.

17. Pese a que el transductor grafito-epoxi-membrana de nylon HYBOND™ funciona correctamente, el hecho de interponer una membrana en la interfase del transductor provoca la disminución de la sensibilidad, respecto al transductor grafito-epoxi desnudo.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ M. Yang, M. E. McGovern, M. Thompson. *Anal. Chim. Acta* 1997, 346, 259-275.
- ² J. Wang, X. Cai, C. Jonsson, M. Balakrishnan. *Electroanalysis* 1996, 8, 20-24.
- ³ J. Wang, X. Cai, J. R. Fernandes, D. H. Grant, M. Ozsoz. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4056-4059.
- ⁴ J. Wang, G. Rivas, X. Cai, E. Palecek, P. Nielsen, H. Shirishi, N. Dontha, D. Luo, C. Parrado, M. Chicharro, P. A. M. Farias, F. S. Valera, D. H. Grant, M. Ozsoz, M. N. Flair. *Anal. Chim. Acta* 1997, 347, 1-8.
- ⁵ J. Wang, G. Rivas, J. R. Fernandes, J. L. Lopez Paz, M. Jiang, R. Waymire. *Anal. Chim. Acta* 1998, 375, 197-203.
- ⁶ J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P. A. M. Farias, N. Dontha. *Anal. Chem.* 1996, 68, 2629-2634.
- ⁷ J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi. *Anal. Chim. Acta* 1996, 326, 141-147.
- ⁸ J. Wang, E. Palecek, P. E. Nielsen, G. Rivas, X. Cai, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, P. A. M. Farias. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7667-7670.
- ⁹ J. Wang, G. Rivas, X. Cai, M. Chicharro, C. Parrado, N. Dontha, A. Begleiter, M. Mowat, E. Palecek, P. E. Nielsen. *Anal. Chim. Acta* 1997, 344, 111-118.
- ¹⁰ S. R. Mikkelsen. *Electroanalysis* 1996, 8, 15-19.
- ¹¹ K. M. Millan, S. R. Mikkelsen. *Anal. Chem.* 1993, 65, 2317-2323.
- ¹² K. M. Millan, A. Saraullo, S. R. Mikkelsen. *Anal. Chem.* 1994, 66, 2943-2948.
- ¹³ J. Wang, J. R. Fernandes, L. T. Kubota. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3699-3702.
- ¹⁴ R. N. Adams. *Anal. Chem.* 1958, 30, 1576.
- ¹⁵ J. Labuda, M. Bucková, M. Vanicková, J. Mattusch, R. Wennrich. *Electroanalysis* 1999, 11, 101-107.
- ¹⁶ A. M. Oliveira Brett, S. H. P. Serrano, I. Gutz, M. A. La-Scalea, M. L. Cruz. *Electroanalysis* 1997, 9, 1132-1137.
- ¹⁷ A. M. Oliveira Brett, T. R. A. Macedo, D. Raimundo, M. H. Marques, S. H. P. Serrano. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 861-867.
- ¹⁸ K. M. Millan, A. J. Spurmanis, S. R. Mikkelsen. *Electroanalysis* 1992, 4, 929-932.
- ¹⁹ K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori. *Anal. Chim. Acta* 1994, 286, 219-224.
- ²⁰ D-W. Pang, H. D. Abruña. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3162-3169.
- ²¹ I. Moser, T. Schalkhammer, F. Pittner, G. Urban. *Biosens. Bioelectron.* 1997, 12, 729-737.
- ²² Z. Li, H. Wang, S. Dong, E. Wang. *Analytical Sciences* 1997, 13, 305-310.
- ²³ F. Céspedes, E. Martínez Fàbregas, S. Alegret. *Trends in Anal. Chem.* 1996, 15, 296-304.
- ²⁴ S. Alegret. *Analyst* 1996, 120, 1029-1045.
- ²⁵ Marta Santandreu i Vilajosana. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona, 1998.
- ²⁶ K. B. Oldham. *J. Electroanal. Chem.* 1981, 122, 1-17.
- ²⁷ D. E. Tallman, S. L. Petersen. *Electroanalysis* 1990, 2, 499-510.
- ²⁸ K. E. Creasy, B. R. Shawn. *Anal. Chem.* 1989, 61, 1460-1465.
- ²⁹ F. C. Kafatos, C. W. Jones, A. Efstratiadis. *Nucleic Acids Res.* 1979, 7, 1541-1552.
- ³⁰ E. Southern, K. Mir, M. Shchepinov. *Nature Genetics Supp.* 1999, 21, 5-9.
- ³¹ J. Van Ness, S. Kalbfleisch, C. R. Petrie, M. W. Reed, J. C. Tabone, N. M. J. Vermeulen. *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 3345-3350.
- ³² A. C. Syvanen, M. Laaksonen, H. Soderlund. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14, 5037-5048.
- ³³ S. S. Ghosh, G. F. Musso. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5353-5372.
- ³⁴ X. Sun, P. He, S. Liu, J. Ye, Y. Fang. *Talanta* 1998, 47, 487-495.
- ³⁵ J. N. Kremsky, J. L. Dougherty, R. E. Meyers, M. Collins, E. L. Brown. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2891-2909.
- ³⁶ V. Lund, R. Schmid, D. Rickwood, E. Hornes. *Nucleic Acids Res.* 1988, 22, 10861-10880.

- ³⁷ S. F. Wolf, L. Haines, J. Fisch, J. N. Kremsky, J. P. Dougherty, K. Jacobs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2911-2926.
- ³⁸ S. Liu, J. Ye, P. He, Y. Fang. *Anal. Chim. Acta* 1996, 335, 239-243.
- ³⁹ S. R. Rasmussen, M. R. Larsen, S. E. Rasmussen. *Anal. Biochem.* 1991, 198, 138-142.
- ⁴⁰ B. C. F. Chu, G. M. Wahl, L. E. Orgel. *Nucleic Acids Res.* 1983, 11, 6513-6529.
- ⁴¹ P. A. E. Piunno, U. J. Krull, R. H. E. Hudson, M. J. Damha, H. Cohen. *Anal. Chim. Acta* 1994, 288, 205-214.
- ⁴² L. Henke, P. A. E. Piunno, A. C. McClure, U. J. Krull. *Anal. Chim. Acta* 1997, 344, 201-213.
- ⁴³ F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, K. Niikura, Y. Okahata. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2043-2049.
- ⁴⁴ D. Sehgal, I. K. Vijay. *Anal. Biochem.* 1994, 218, 87-91.
- ⁴⁵ M. C. Desai, L. M. Stephens Stramiello. *Tetrahedron Letters* 1993, 34, 7685-7688.
- ⁴⁶ A. Previero, J. Derancourt, M. A. Coletti Previero. *Febs Letters* 1973, 33, 135-138.
- ⁴⁷ B. Johnsson, S. Lofas, G. Lindquist. *Anal. Biochem.* 1991, 198, 268-277.
- ⁴⁸ J. Meinkoth, G. Wahl. *Anal. Biochem.* 1984, 138, 267-284.
- ⁴⁹ R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6230-6234.
- ⁵⁰ K. C. Reed, D. A. Mann. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 7207-7221.
- ⁵¹ G. M. Church, W. Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 1991-1995.
- ⁵² J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2th ed.*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.
- ⁵³ M. Solanas, R. Moral, E. Escrich. *Biotechnol. Lett.* 2001, 23, 263-266.
- ⁵⁴ A. K. Lockley, C. G. Jones, J. S. Bruce, S. J. Franklin, R. G. Bardsley. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 1313-1314.
- ⁵⁵ K. B. Register, R. M. Lee, C. Thomson. *J. Clin Microbiol.* 1998, 36, 3342-3346.
- ⁵⁶ L. J. Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Techniques*; Academic Press, Inc.: San Diego, 1992.
- ⁵⁷ L. T. Kirby. *DNA Fingerprinting*; Stockton Press: New York, 1990.
- ⁵⁸ E. M. Southern. *J. Mol. Biol.* 1975, 98, 503-517.

CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA PEROXIDASA

ESTUDIO DE SU IMPLEMENTACIÓN COMO SISTEMA DE MARCACIÓN EN EL DESARROLLO DE GENOSENSORES.

EVALUACIÓN DE NUEVOS TRANSDUCTORES ELECTROQUÍMICOS MODIFICADOS QUÍMICAMENTE MEDIANTE LA INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE LA PEROXIDASA

3.1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un genosensor, como se ha comentado en §§ 1.4.7 y 2.1 implica, una vez seleccionado el tipo de transducción y el material transductor (véase Capítulo 2), la selección de un sistema adecuado de detección de la reacción de hibridación, acorde al tipo de transducción seleccionado ¹.

Una de las grandes carencias en los genosensores electroquímicos desarrollados hasta el momento consiste, justamente, en el tipo de detección. Según el punto de vista de los autores del presente trabajo, este hecho imposibilita la aplicación de este tipo de dispositivo a muestras reales con resultados fiables.

Los sistemas de detección aplicados hasta el momento en genosensores electroquímicos [que en la mayoría de los casos utilizan la adsorción electroquímica (Figura 3.1, A) y la hibridación a potencial controlado ((Figura 3.1, B)] se basan en el uso de indicadores electroactivos (complejos metálicos o compuestos orgánicos que se preconcentran en el dúplex con mayor o menor selectividad) ²⁻¹¹ (Figura 3.1, C2) o a la señal de oxidación de residuos de guanina ¹²⁻¹⁴ (Figura 3.1, C1). La ventaja de estas metodologías consiste en que no requieren la utilización de sondas de DNA funcionalizadas. Sin embargo, tanto una como la otra detectan el evento de hibridación con escasa sensibilidad y altos límites de detección ^{9,10,15}. La señal neta de hibridación que deviene de algunos indicadores electroactivos es pequeña, debido a que no sólo interactúan con el dsDNA, sino también con el ssDNA –sonda no hibridada–, y con el mismo transductor mediante adsorciones de tipo físicas ⁹. La oxidación de otras especies presentes en la matriz de la muestra también puede

afectar los resultados de este tipo de genosensores, y la utilización de agentes bloqueantes puede comprometer la reproducibilidad de la señal de hibridación ¹³. La detección basada en la señal de oxidación de los residuos de guanina tiene como principal inconveniente que cuando existe hibridación, la señal electroquímica disminuye ¹².

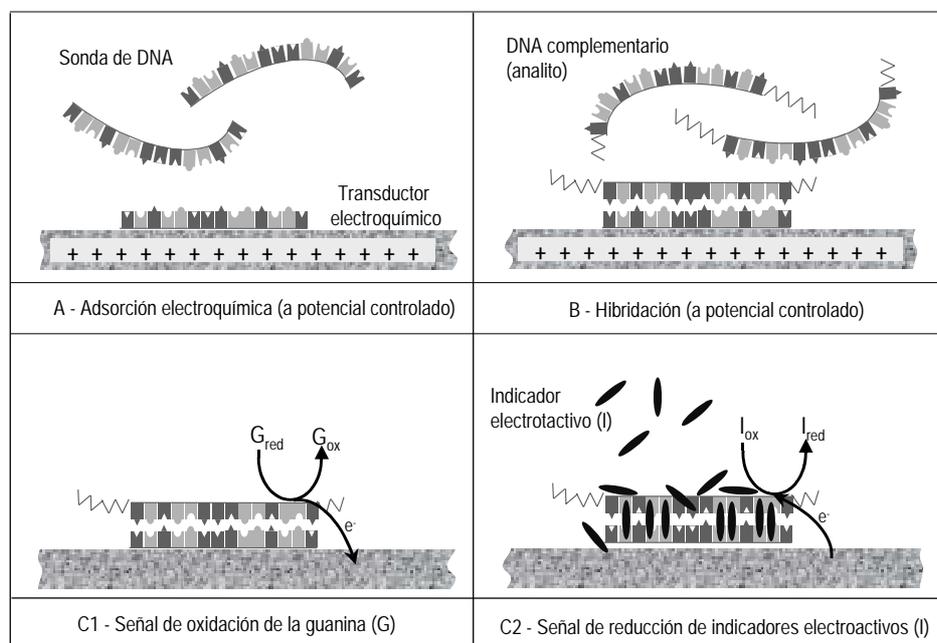


Figura 3.1. Estrategias más frecuentes de inmovilización (A), hibridación (B) y marcación (C1 y C2) utilizadas en genosensores basados en transducción electroquímica.

Es fundamental en este punto aportar nuevas posibilidades de sistemas de marcación del evento de hibridación en genosensores electroquímicos.

Para tal fin, en el presente capítulo se propone como sistema de marcación un procedimiento enzimático mediante la enzima peroxidasa y se evalúa la posibilidad de su utilización en genosensores amperométricos.

En el presente capítulo se estudiarán y establecerán las condiciones óptimas de trabajo de la peroxidasa. Para tal fin se describe la evaluación del mediador más adecuado para la regeneración de la enzima peroxidasa (HRP) y se definirán las variables del sistema enzima-mediador-sustrato para su funcionamiento óptimo: potencial de trabajo, pH, concentración y conservación del mediador.

Esta caracterización enzimática se lleva a cabo utilizando distintos transductores como electrodos de trabajo: grafito-epoxi, grafito-epoxi/HYBOND™ y carbono vitrificado. Los resultados obtenidos permiten completar la caracterización de estos transductores –respecto a los resultados previos obtenidos en el capítulo 2 (§§ 2.3.5 y 2.3.6)– y obtener conclusiones respecto a la viabilidad de la utilización de estos transductores en el desarrollo de genosensores.

Estas condiciones optimizadas del funcionamiento de la enzima serán las utilizadas a lo largo de todo el trabajo.

Una vez definidas las variables del sistema enzimático, se procedió a completar la caracterización de los nuevos transductores construidos en el capítulo 2: grafito-epoxi y grafito metacrilato, ambos modificados con ácido esteárico.

En el capítulo 2 se realizó la caracterización electroquímica, y los resultados obtenidos sugerían la pérdida de ácido esteárico de los mismos (§§ 2.3.1 y 2.3.2). En el presente capítulo se pretende confirmar o descartar la correcta modificación de los transductores con ácido esteárico mediante la evaluación de la presencia de funciones –COOH.

Para tal fin, se intentó confirmar la modificación de dichos transductores mediante la inmovilización covalente de la enzima HRP (peroxidasa) a través de residuos –NH₂ de sus aminoácidos básicos, sobre la superficie de los transductores a través de los grupos –COOH de éstos, mediante acoplamiento de ambas funciones con una carbodiimida soluble: EDC. Si la enzima se inmoviliza covalentemente sobre el transductor es porque existen funciones –COOH en el transductor.

Estos resultados se compararon con los obtenidos al realizar el mismo procedimiento en electrodos de pasta de grafito modificados con ácido esteárico (metodología ya descrita en la bibliografía sobre este transductor) ⁶⁻⁸.

Asimismo, estos resultados permitieron estudiar la viabilidad de la reacción de inmovilización covalente basada en EDC-NHS que se pretende utilizar para la inmovilización de DNA.

Los objetivos del presente capítulo, por tanto, son variados y se encuentran interrelacionados entre sí.

Los objetivos centrales consisten, por tanto, en:

- evaluar la viabilidad de utilizar la peroxidasa como marcador del evento de hibridación en un genosensor amperométrico y definir las variables para su funcionamiento óptimo;
- completar la selección y evaluación de los transductores amperométrico más idóneos de entre los construidos en el capítulo 2 para el desarrollo de un dispositivo genosensor;
- evaluar la viabilidad de la reacción de inmovilización covalente basada en EDC-NHS sobre composites rígidos modificados químicamente con funciones –COOH.

3.2 EXPERIMENTAL

3.2.1 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

3.2.1.1 Equipamiento

Para las medidas amperométricas se utiliza la misma instrumentación analítica y electrodos descritos en § 2.2.2.

Las voltamperometrías cíclicas se realizan con el Autolab PGSTAT20 (Eco Chemie, Holanda) utilizando como sistema de electrodos el mismo que se describiera para las medidas amperométricas.

3.2.1.2 Reactivos y materiales

Los composites se prepararon con grafito en polvo de tamaño de partícula de 50 µm (BDH), resina epoxi Epo-Tek H77 (Epoxy Technology, USA), metacrilato comercial Sealer-Healer 1540

(monómero QM-57T-D) (Rohm & Hass), peróxido de benzoílo hidratado (25 %) (Fluka, Suiza) como catalizador del metacrilato, y aceite mineral (Aldrich)

Las modificaciones de los composites se realizaron con ácido esteárico 99 % (Aldrich).

Para las inmovilizaciones se utilizó EDC (Fluka) y NHS (Fluka).

Las membranas de nylon integradas al composite grafito-epoxi fueron HYBOND™ N(+) (Amersham). Para la preparación del transductor se utilizó también nylon de apertura de malla de 40 (DIN 130-40 tup 2221).

Los pulidos de la superficie de los composites se realizaron con papel de alúmina de 3 μm (polishing strips 301044-001, Orion). Los pulidos del electrodo de carbono vitrificado se realizaron con solución de polvo de alúmina (polishing alumina CF-1050, BAS) sobre un soporte de pulido (alumina polish pads MF-1040, BAS).

Los calibrados se realizaron con peróxido de hidrógeno (Merck), utilizando hidroquinona (Sigma) como mediador.

Las enzimas utilizadas fueron peroxidasa de rábano picante (HRP) de 1100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Sigma) y el conjugado estreptavidina-peroxidasa (HRP, 1.11.1.7) (Roche Molecular Biochemicals). La estreptavidina del conjugado se obtiene de *Streptomyces avidinii*, que se conjuga con la β -peroxidasa de rábano picante utilizando el método del periodato

El resto de los reactivos utilizado fue de calidad proanálisis o similar. Las soluciones acuosas se prepararon con agua bidestilada.

3.2.2 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA PEROXIDASA

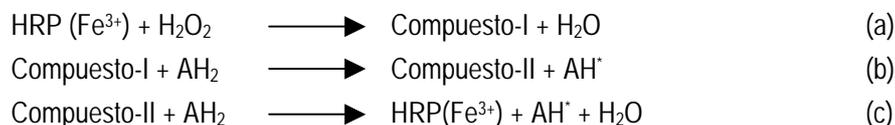
La necesidad de marcadores para evaluar el evento de hibridación en las técnicas clásicas de biología molecular y la tendencia de utilización de marcaje no radiactivo ¹⁶⁻¹⁸ determinan la posibilidad de utilizar una enzima como marcador en el diseño de un genosensor amperométrico.

La selección de peroxidasa en el presente trabajo como agente marcador del evento de hibridación se debe a varios factores:

- su facilidad de conjugación con otras moléculas, que permite acoplarla a formatos de marcaje tanto directos como compuestos (como puede ser mediante el sistema biotina-estreptavidina) ¹⁶;
- su posibilidad de manipulación, tanto de la propia enzima como de algunos de sus substratos;
- su elevada actividad y afinidad por el correspondiente substrato;
- su elevada estabilidad.

Hay numerosa bibliografía que utiliza este marcador en ensayos clásicos ¹⁶⁻²¹. Cabe destacar que muchos *kits* comerciales de marcas reconocidas se han decantado hacia este sistema de marcaje enzimático. Paralelamente a nuestro trabajo, otros grupos están investigando sobre el uso de las peroxidases para evidenciar la reacción de hibridación sobre transductores electroquímicos ²²⁻²⁴.

Las peroxidasas son enzimas definidas como oxidorreductasas que utilizan hidroperóxidos como aceptores de electrones ^{25,26}. La peroxidasa de rábano picante (HRP de *horseradish peroxidase*) ha sido la más ampliamente utilizada y se ha detallado el ciclo de reacción enzimática como ^{27,28}:



AH₂ representa una molécula donadora de electrones, como pueden ser aminas aromáticas y compuestos fenólicos, que se oxidan a radicales libres AH[·]. Cuando la reacción (a) tiene lugar sobre la superficie de un electrodo, el compuesto-I puede reducirse directamente gracias a la transferencia directa de electrones desde la superficie del electrodo. Sin embargo, en este caso la transferencia electrónica es lenta y se debe recurrir al uso de mediadores.

Los mediadores son moléculas de dimensiones reducidas con actividad redox caracterizadas por su capacidad de transferir o captar electrones a elevada velocidad ²⁹.

En este caso, el mediador tendría la función de transportar los electrones desde la superficie del electrodo hasta los compuestos I y II ²⁷. Entre los muy diversos mediadores citados en la bibliografía, cabe destacar la hidroquinona ³⁰, la fenildiamina ^{31,32}, el catecol ³³, la dopamina ³⁴ y colorantes como el azul o el verde de metileno ^{35,36}, entre otros.

El comportamiento de la enzima peroxidasa cuando ésta se encuentra inmovilizada en un biocomposite grafito-epoxi se ha descrito previamente por nuestro grupo de trabajo ³⁷⁻⁴⁰.

Parte de las conclusiones de estos estudios son las siguientes:

- La HRP se oxida al entrar en contacto con el peróxido de hidrógeno. H₂O₂ se utilizará como sustrato enzimático.
- La enzima no puede regenerarse por reducción directa en la superficie del electrodo a un potencial de -0.3 V respecto a un electrodo de calomelanos saturados, por lo que se debe recurrir a un agente mediador.
- La hidroquinona puede regenerar eficazmente la peroxidasa, dando un producto que puede monitorizarse amperométricamente por reducción a -0.1 V (vs Ag/AgCl).
- El medio óptimo de trabajo de la enzima es el proporcionado por una solución amortiguadora fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M a pH 7.0.
- La concentración de hidroquinona óptima en el medio donde se lleva a cabo las medidas (solución amortiguadora fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M a pH 7.0), es de 1.8 mM.

Estas conclusiones fueron extrapoladas al presente trabajo, por los que se utilizó H₂O₂ como sustrato enzimático de la peroxidasa, el medio de trabajo fue una solución amortiguadora fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M a pH 7.0 y se utilizó como mediador hidroquinona en una concentración de 1.8 mM; el potencial aplicado debe ser estudiado y determinado por voltamperometría cíclica para un nuevo transductor.

3.2.2.1 Utilización de agentes mediadores

El mediador es el encargado de transferir electrones desde la superficie del electrodo hasta los centros electroquímicamente activos de la enzima ^{29,41}.

Los requerimientos para que la utilización de un mediador sea efectiva en un biosensor electroquímico son:

- Acoplamiento electroquímico efectivo del sistema biomolécula-mediador, juntamente con una elevada actividad de la enzima, para poder conseguir bajos límites de detección del biosensor, amplio rango de linealidad y tiempos cortos de respuesta.
- Estabilidad física y química del mediador, para poder obtener reproducibilidad en la respuesta

Es posible colocar el mediador en el composite, es decir, integrarlo al mismo transductor, pero con el objeto de que el mismo se encuentre en el máximo contacto con la enzima, se optó por la utilización de un agente mediador que pueda adicionarse al medio ²⁹. Este hecho condiciona la solubilidad del mediador. Éste debe ser soluble en agua, tanto en su forma oxidada como en la reducida.

En nuestro grupo de trabajo se han estudiado los siguientes mediadores ⁴⁰: ioduro, ferricianuro e hidroquinona y se ha encontrado que la hidroquinona es el mediador óptimo para la regeneración de la HRP ²⁹.

La hidroquinona, nombre con el que se conoce al 1,4-benzenodiol, es una especie soluble en agua. En solución acuosa se descompone progresivamente en contacto con el oxígeno ambiental volviéndose la solución marrón oscura debido a su polimerización. Las soluciones de hidroquinona deben conservarse en atmósfera de nitrógeno y protegida de la luz.

3.2.2.2 Caracterización electroquímica del mediador hidroquinona. Definición del potencial de trabajo

Previamente se ha determinado –mediante estudios en nuestro grupo– que el potencial de reducción del mediador hidroquinona, si se utiliza como electrodo de trabajo un transductor grafito-metacrilato o grafito-epoxi es de -0.1 V, mientras que el de oxidación es de $0.2/0.25$ V, frente a electrodo de calomelanos saturado ⁴⁰.

En este caso, se quiso evaluar cuales son estos valores si se utilizan como transductores los que previamente se habían seleccionado en §§ 2.3.5 y 2.3.6, es decir, grafito-epoxi y grafito-epoxi/membrana HYBOND™. Los resultados se compararon con los obtenidos para un electrodo de carbono vitrificado.

La actividad redox de hidroquinona se evaluó por voltamperometría cíclica. La celda de medida fue una solución de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M a pH 7.0 y se utilizaron como electrodos de trabajo los transductores grafito-epoxi, grafito-epoxi/membrana HYBOND™ y carbono vitrificado. La concentración de hidroquinona en el medio fue de 1.8 mM. La velocidad de barrido fue de 0.05 V/s.

3.2.2.3 Evaluación de la estabilidad de la solución de hidroquinona

Como se viera en § 3.2.2.1, la solución acuosa de hidroquinona se descompone en contacto con el oxígeno ambiental. Las soluciones de hidroquinona se deben conservar en atmósfera de nitrógeno y protegida de la luz ⁴⁰.

Para poder evaluar si las soluciones de hidroquinona se conservan de manera adecuada, se preparó una solución acuosa de hidroquinona (40 g/l) que se mantuvo durante 8 h en atmósfera de nitrógeno y protegida de la luz. Luego de este tiempo (que se considera el suficiente si se quiere

preparar la solución diariamente) se realizaron voltamperogramas cíclicos con el objeto de evaluar la existencia de productos de oxidación.

El objeto de esta experiencia fue evaluar si durante este lapso de tiempo se puede conservar la solución de hidroquinona y si el procedimiento de conservación es el idóneo.

La caracterización de esta solución se realizó de manera idéntica a lo expresado en § 3.2.2.2 utilizando como transductor grafito-epoxi/membrana HYBOND™.

3.2.2.4 Evaluación de la respuesta amperométrica de la enzima HRP con el potencial de trabajo seleccionado en presencia del mediador

El conjunto de reacciones electroquímicas que tendrán lugar en la superficie del electrodo se muestran en la Figura 3.2.

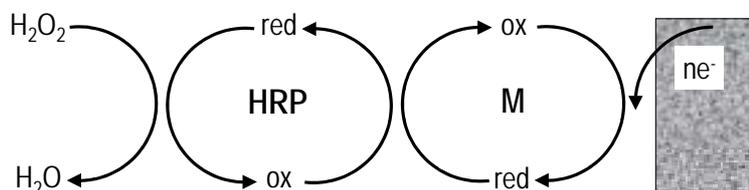
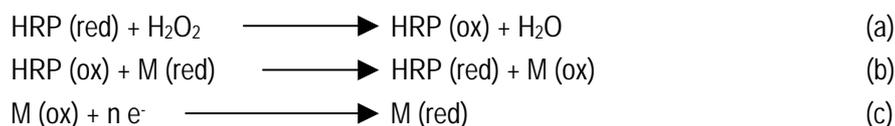


Figura 3.2. Mecanismo enzimático de la enzima HRP en la superficie de un transductor electroquímico, utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato e hidroquinona como mediador

Este esquema puede interpretarse como ⁴¹:



Como se utilizará posteriormente un conjugado enzimático estreptavidina-HRP en el sistema de marcación de un genosensor, en la evaluación no se utilizó la enzima solamente, sino el conjugado con estreptavidina.

Para la evaluación de la respuesta electroquímica del comportamiento de la hidroquinona como agente mediador en presencia de la enzima, se modificaron los transductores grafito-epoxi y grafito-epoxi- HYBOND™ mediante adsorción física del conjugado enzimático HRP-estreptavidina.

Para la modificación con la enzima del transductor grafito-epoxi, se colocaron 4 μl de una solución que contenía 0.13 μg del conjugado HRP-estreptavidina sobre la superficie del transductor grafito-epoxi, y se dejó evaporar hasta sequedad. Posteriormente, se colocó una membrana de diálisis sobre el electrodo. La modificación con la enzima del transductor grafito-epoxi- HYBOND™ se realizó con la misma cantidad de conjugado enzimático pero, en este caso, se adicionó sobre la superficie de la membrana HYBOND™ y se dejó evaporar hasta sequedad. Posteriormente, se integró la membrana de nylon al transductor grafito-epoxi –según se muestra en la Figura 2.4, § 2.2.10.2–, colocando la membrana de nylon sobre el electrodo con la cara en la que se adsorbiera la enzima hacia el lado del transductor.

Para esta evaluación se utilizó el sistema amperométrico descrito en § 2.2.2. La celda de medida fue una solución de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M a pH 7.0 y se utilizaron como electrodo de trabajo los transductores grafito-epoxi y grafito-epoxi/membrana HYBOND™, ambos modificados con el conjugado enzimático. La concentración de hidroquinona en el medio fue de 1.8 mM. El H₂O₂ es adicionado al medio de calibración, al cual se aplica el potencial de reducción de la hidroquinona (§ 3.2.2.2), es decir, -100 mV (vs Ag/AgCl), que provoca la reacción (c).

Para poder realizar comparaciones, se evaluaron –para cada transductor– su correspondiente blanco. El blanco consistió en el mismo transductor sin enzima adsorbida. En estos dispositivos no debería obtenerse respuesta amperométrica.

3.2.2.5 Disminución de la sensibilidad del transductor

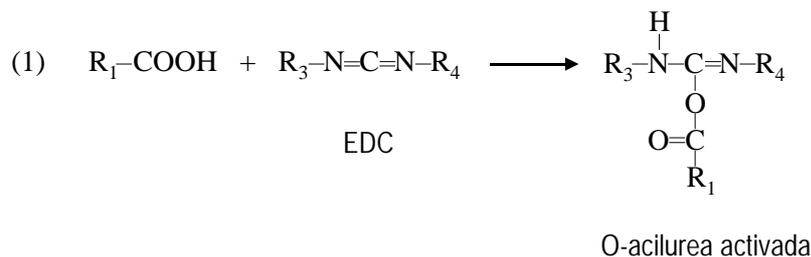
Previamente se ha determinado –mediante estudios en nuestro grupo– que el transductor grafito-epoxi, si se emplea en la realización de calibraciones sucesivas de hidroquinona sin pulir, presenta una disminución de la sensibilidad como consecuencia de su pasivación⁴⁰, resultado de la adsorción superficial de subproductos no conductores procedentes de la oxidación de la hidroquinona^{42,43}. Sin embargo, este fenómeno no fue una limitación a la hora de desarrollar el procedimiento analítico que implica la utilización de hidroquinona como mediador, debido a que por pulido se puede regenerar la superficie del sensor obteniéndose, antes de cada nuevo calibrado, una superficie fresca. Como ya se ha visto (§ 2.3.5.4) el procedimiento de pulido presenta superficies del composite grafito-epoxi reproducibles. Si el mismo fenómeno ocurriera en la membrana HYBOND, tampoco sería una limitación ya que las mismas, debido a su bajo coste, serán de un solo uso.

3.2.3 INMOVILIZACIÓN SUPERFICIAL COVALENTE DE PEROXIDASA EN COMPOSITOS RÍGIDOS MODIFICADOS CON ÁCIDO ESTEÁRICO

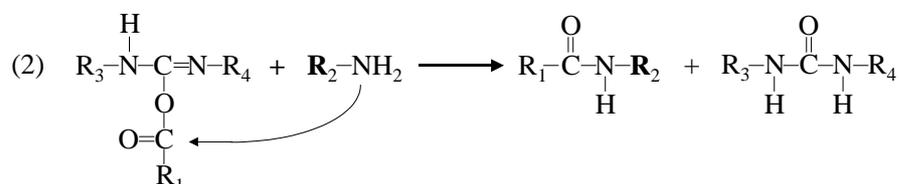
De las metodologías de inmovilización más desarrolladas en la bibliografía, la que se consideró más conveniente, debido a su posibilidad de adaptación a sondas génicas, es la que se basa en superficies derivatizadas con grupos carboxílicos y que utilizan una función con característica nucleofílica en el material que se desea inmovilizar, mediante el uso de EDC [1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida] y NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) como reactivos activadores de los grupos carboxílicos salientes^{1,5-8,44-58}.

El reactivo que lleva a cabo la reacción de formación de la amida entre el grupo –COOH de la superficie y el de características nucleofílicas del material a inmovilizar (que en el caso de una enzima como es la peroxidasa son los residuos –NH₂ de los aminoácidos básicos), es la carbodiimida, es decir, la EDC⁵⁵. El NHS se agrega a la reacción para asistir a la carbodiimida en su función, obteniéndose mayores rendimientos⁵⁴.

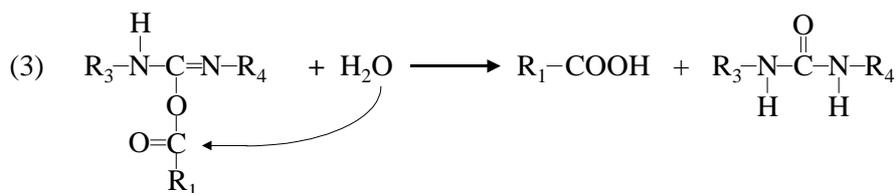
El conjunto de reacciones de la carbodiimida sin la asistencia de NHS consiste en primer lugar en la activación de las funciones carboxílicas con la carbodiimida, formándose, en principio, pares iónicos⁵⁷ y, posteriormente, un intermediario que es una O-acilurea activada⁵⁴ derivada de la carbodiimida (1).



Este intermediario sufre del ataque nucleofílico del nitrógeno primario de un compuesto aminado (como puede ser un grupo -NH_2 de una proteína) para generar una función amida con la liberación de una urea soluble sustituida derivada de la carbodiimida (2).

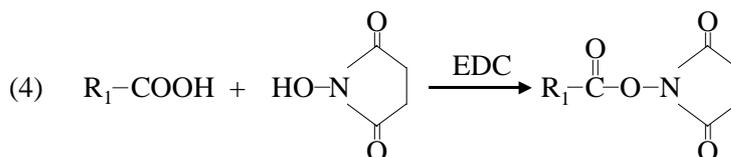


La formación del intermediario O-acilurea ocurre de manera óptima a pH 4-5⁵⁴. A este pH, el nucleófilo se encuentra protonado y, por tanto, es bastante inactivo. Además, cabe destacar que la O-acilurea tiene una vida media muy corta y rápidamente se hidroliza o reordena para dar un aducto N-acilurea. La reacción de hidrólisis⁵⁷ del intermediario vuelve a generar el ácido y da una urea sustituida derivada de la carbodiimida (3).

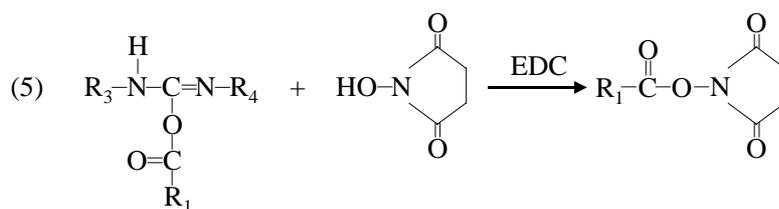


Estas limitaciones provocan un bajo rendimiento de la reacción.

La utilización, por tanto, de NHS (N-hidroxisuccinimida), o su derivado más polar (N-hidroxisulfosuccinimida) como asistente de la reacción se fundamenta en que estos compuestos reaccionan con compuestos con funciones -COOH para dar un éster aminoacílico bajo condiciones más sencillas (4).

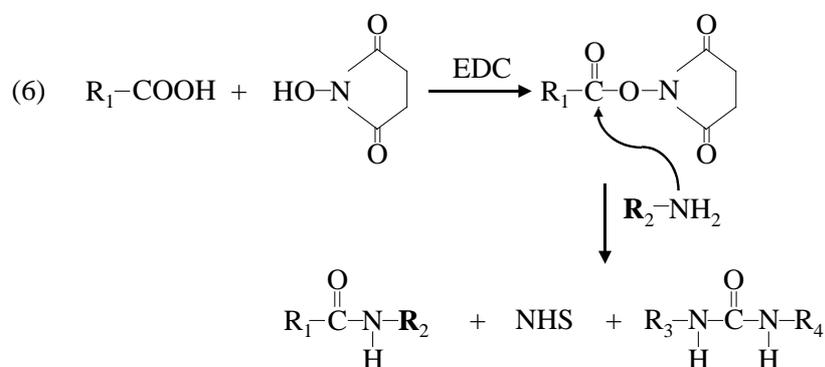


NHS también puede reaccionar con el intermediario inestable (O-acilurea) (5).



Este éster activo es más estable y se hidroliza lentamente en solución acuosa y puede, por tanto incrementar la eficiencia de acoplamiento de funciones $-\text{COOH}$ y $-\text{NH}_2$ mediada por la carbodiimida.

Las reacciones finales pueden simplificarse, por tanto, en la siguiente reacción (6):



El pH óptimo del acoplamiento a temperatura ambiente utilizando ambos reactivos (NHS y EDC) es de 6.5, obteniéndose un 80 % de rendimiento de la reacción ⁵⁴.

Esta reacción clásica, como se ha dicho, se ha aplicado en la inmovilización de proteínas a través de grupos $-\text{NH}_2$ de los residuos amino de los aminoácidos básicos. Los grupos $-\text{COOH}$ de la superficie se activan con un mejor grupo saliente mediante el uso de los dos reactivos: NHS y EDC.

Además, también se ha reportado la utilización de esta metodología de inmovilización para ssDNA modificado en 5' con un grupo $-\text{NH}_2$ ^{1,44,45,58}. En este caso, R_1 representaría al soporte, mientras que R_2 sería un oligonucleótido sintético.

Esta misma reacción se pretende utilizar para la inmovilización de sondas génicas no modificadas químicamente. Se ha reportado que, para este tipo de compuesto, son necesarias ciertas características en el mismo de manera que la inmovilización covalente pueda llevarse a cabo con éxito ⁵⁻⁸:

- Presencia de residuos de guanina en la sonda a inmovilizar: se debe a que el mejor grupo nucleofílico reportado en el DNA es el N7 de los residuos de guanina.
- Estos residuos deben encontrarse repetidos n veces y situados de manera consecutiva. La causa de este requerimiento no queda clara y provoca que, cuando se quiera inmovilizar una sonda cualquiera, deba ser primero elongada enzimáticamente con residuos de guanina

Como se explicara en el capítulo 2, § 2.1, se optó por el desarrollo de transductores modificados con grupos carboxílicos debido a que, como la metodología de inmovilización será adaptada a DNA, este tipo de superficie presenta menor adsorción inespecífica del material genético

^{44,45}. Este hecho viene determinado a que, al pH de trabajo (7.0), la superficie derivatizada con –COOH se encontrará con un potencial superficial Z negativo (las funciones serán –COO⁻). A este mismo pH, el DNA es un polianión, con lo cual habrá repulsión electrostática y menor posibilidad de adsorción inespecífica sobre la superficie funcionalizada.

Antes de proceder a la inmovilización del DNA sobre los transductores electroquímicos modificados, se probó la reacción utilizando como material la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP).

El objeto de esta experiencia fue doble: por un lado, evaluar la reacción de inmovilización basada en NHS y EDC y, por otro lado, confirmar si los nuevos transductores construidos en el capítulo 2 (epoxi-grafito y metacrilato-grafito modificados con ácido esteárico) se encuentran funcionalizados de manera correcta.

En las próximas secciones se mostrarán los resultados de estos intentos.

3.2.3.1 Construcción del cuerpo del sensor amperométrico

El procedimiento fue idéntico al descrito en § 2.2.3.

3.2.3.2 Preparación, curado y conservación de los composites rígidos modificados con ácido esteárico

El procedimiento de preparación del composite grafito-metacrilato-ácido esteárico fue idéntico al descrito en § 2.2.5.1. El sensor utilizado posee un 4 % de ácido esteárico, cantidad que se optimizara tal como se ha descrito en § 2.3.1.1.

Para el composite grafito-epoxi-ácido esteárico, el procedimiento fue idéntico al descrito en § 2.2.6.1. El sensor utilizado es el que posee un 1 % de ácido esteárico, cantidad que se optimizara tal como se ha descrito en § 2.3.2.1.

3.2.3.3 Procedimiento de inmovilización

Se colocó una alícuota (50 µl) de reactivo inmovilizante (8 mM de NHS, 5 mM de EDC, en solución amortiguadora fosfato 0.02 M pH 6,9) sobre la superficie del sensor modificado a evaluar (grafito-metacrilato-ácido esteárico 4 % y grafito-epoxi-ácido esteárico 1 %) y se dejó evaporar hasta sequedad. Posteriormente, se dispensó sobre la superficie una alícuota de enzima peroxidasa que contenía 1 mg de enzima (1100 unidades).

El mismo tratamiento se realizó sobre transductores no modificados con ácido esteárico (grafito-metacrilato y grafito-epoxi), con el objeto de evaluar en estos últimos la adsorción inespecífica de la enzima.

Se lavaron las superficies con tampón fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0, en agitación, durante 30 minutos, para eliminar la enzima adsorbida (no inmovilizada de manera covalente).

Otros controles fueron realizados mediante la adición de reactivo inmovilizante únicamente, en transductores no modificados y modificados con ácido esteárico.

Estos sensores se incorporaron al sistema amperométrico.

3.2.3.4 Evaluación de la respuesta

Para esta evaluación se utilizó el sistema amperométrico descrito en § 2.2.2. La celda de medida fue una solución de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M a pH 7.0 y se utilizó como electrodo de trabajo el transductor modificado con la enzima (§ 3.2.3.3). La concentración de hidroquinona en el medio fue de 1.8 mM. El H₂O₂ era adicionado al medio de calibración, al cual se aplicaba el potencial de reducción de la hidroquinona (§ 3.2.2.2), es decir, -100 mV (vs Ag/AgCl).

3.2.4 INMOVILIZACIÓN SUPERFICIAL COVALENTE DE PEROXIDASA EN UN TRANSDUCTOR DE PASTA DE CARBONO-ÁCIDO ESTEÁRICO

El mismo procedimiento de inmovilización que se intentara en los transductores grafito-epoxi y grafito-metacrilato modificados con ácido esteárico, se evaluó en un transductor de pasta de carbono-ácido esteárico.

En este transductor se logró inmovilizar DNA elongado con residuos de guanina mediante esta metodología ⁷. En este caso se intentó la inmovilización de la peroxidasa, para en un futuro inmovilizar DNA.

Por comparación de los nuevos transductores con los de pasta de carbono modificados –en los cuáles la reacción de inmovilización covalente ha sido llevada a cabo con éxito previamente ⁷–, se puede concluir si la reacción covalente funciona y si los composites rígidos se encuentran correctamente funcionalizados.

3.2.4.1 Construcción del cuerpo del sensor amperométrico

El procedimiento seguido fue idéntico al descrito en § 2.2.3.

3.2.4.2 Preparación y conservación del composite

El procedimiento seguido fue idéntico al descrito en § 2.2.8. El sensor utilizado posee un 4.5 % de ácido esteárico, cantidad que se optimizara previamente en la literatura ⁷.

3.2.4.3 Procedimiento de inmovilización

El procedimiento de inmovilización fue idéntico al descrito en § 3.2.3.3.

3.2.4.4 Evaluación de la respuesta

Para esta evaluación se utilizó el sistema amperométrico descrito en § 2.2.2. La celda de medida fue una solución de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M a pH 7.0 y se utilizó como electrodo de trabajo el transductor modificado con la enzima (§ 3.2.4.3). La concentración de hidroquinona en el medio fue de 1.8 mM. El H₂O₂ era adicionado al medio de calibración, al cual se aplicaba el potencial de reducción de la hidroquinona (§ 3.2.2.2), es decir, -100 mV (vs Ag/AgCl).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA PEROXIDASA

3.3.1.1 Caracterización electroquímica del mediador hidroquinona. Definición del potencial de trabajo

En la Figura 3.3 se muestra la actividad redox de la hidroquinona, cuando se utiliza como transductores grafito-epoxi-membrana HYBOND™ (Figura 3.3, A), grafito-epoxi (Figura 3.3, B) y carbono vitrificado (Figura 3.3, C).

A partir de estos voltamperogramas cíclicos se puede determinar el potencial de reducción de la hidroquinona en cada uno de los transductores estudiados.

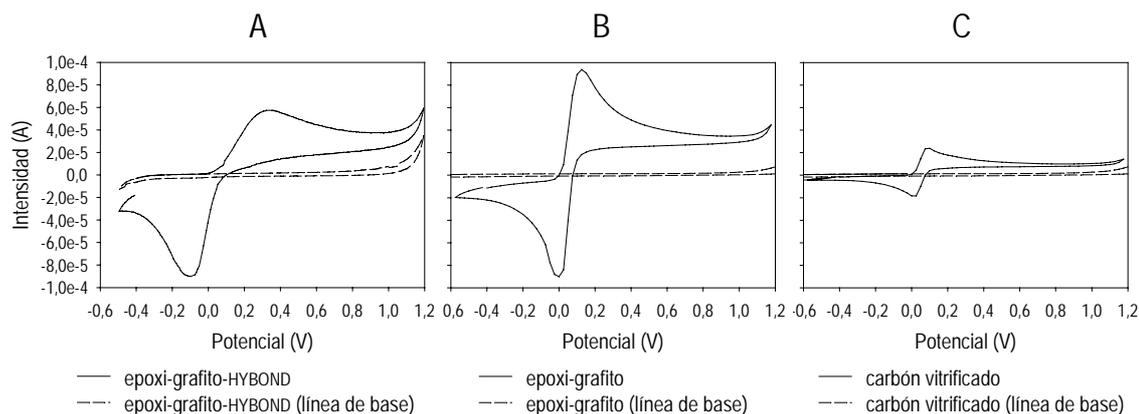


Figura 3.3. Voltamperogramas cíclicos correspondiente a fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0 (línea de base) al que se le ha adicionado hidroquinona 1.81 mM empleando como electrodo de trabajo grafito-epoxi/membrana HYBOND™ (A), grafito-epoxi (B) y carbono vitrificado (C). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Mediante la aplicación del potencial de reducción se pretende regenerar el agente mediador, que fuera oxidado por la enzima (véase § 3.2.2.4, reacción a, b, y c).

Para el caso del transductor grafito-epoxi-membrana HYBOND™ (Figura 3.3, A), el voltamperograma cíclico se comenzó a un potencial de -0.4 V , llegando a un potencial ($+0.35 \text{ V}$) correspondiente a un máximo de oxidación; el barrido de potenciales se siguió hasta $+1.2 \text{ V}$, punto en el cual el barrido revierte en el sentido negativo. La hidroquinona que fuera oxidada a $+0.35 \text{ V}$, presenta un pico de reducción a un valor de -0.1 V . El voltamperograma se continuó hasta -0.5 V y se terminó al mismo potencial que el inicial. A partir de este voltamperograma cíclico se determinó el potencial de reducción de la hidroquinona en este transductor (-0.1 V), mientras que el potencial de oxidación es en este caso de $+0.35 \text{ V}$. El potencial de reducción de -100 mV fue el seleccionado para

regenerar el mediador en todos los ensayos posteriores en los que se utilizó como transductor grafito-epoxi-membrana HYBOND™.

Para el caso del transductor grafito-epoxi (Figura 3.3, B), el voltamperograma cíclico se comenzó a un potencial de -0.4 V, llegando a un potencial ($+0.13$ V) correspondiente a un máximo de oxidación; el barrido de potenciales se siguió hasta $+1.2$ V, punto en el cual el barrido revierte en el sentido negativo. La hidroquinona que fuera oxidada a $+0.13$ V, presenta un pico de reducción a un valor de 0 V. El voltamperograma se continuó hasta -0.5 V y se terminó al mismo potencial que el inicial. A partir de este voltamperograma cíclico se determinó el potencial de reducción de la hidroquinona en este transductor, que es de 0 V, mientras que el potencial de oxidación es en este caso de $+0.13$ V. Sin embargo, y al igual que en el caso anterior, se seleccionó un potencial de reducción de -100 mV, debido a que los picos de oxidación y de reducción del mediador en este transductor se encuentran demasiado próximos entre sí. A -100 mV se asegura que todo el mediador oxidado se reduzca, por lo que este valor de potencial fue el seleccionado para regenerar el mediador en todos los ensayos posteriores en los que se utilizó como transductor grafito-epoxi, de manera de poder comparar los resultados con el transductor grafito-epoxi-membrana HYBOND™.

Para el caso del transductor de carbono vitrificado sin ningún tratamiento superficial (Figura 3.3, C), el voltamperograma cíclico se comenzó a un potencial de -0.4 V, llegando a un potencial ($+0.1$ V) correspondiente a un máximo de oxidación; el barrido de potenciales se siguió hasta $+1.2$ V, punto en el cual el barrido revierte en el sentido negativo. La hidroquinona que fuera oxidada a $+0.1$ V, presenta un pico de reducción a un valor de 0 V. El voltamperograma se continuó hasta -0.5 V y se terminó al mismo potencial que el inicial. A partir de este voltamperograma cíclico se determinó el potencial de reducción de la hidroquinona en este transductor (0 V), mientras que el potencial de oxidación es en este caso de $+0.1$ V.

Mediante la observación de las intensidades de corriente obtenidas con los voltamperogramas, se pueden confirmar las conclusiones obtenidas en § 2.3.5.1, es decir, la remarcable sensibilidad de los composites frente al carbono vitrificado. Estos resultados confirman la mejora de las propiedades electroquímicas por el efecto de microelectrodos (§ 2.1) debido al carácter dual de la superficie del composite, compuesta de partículas de grafito en un medio polimérico, respecto a superficies continuas de materiales conductores, tal como el carbono vitrificado, o por una mayor porosidad del transductor (§ 2.3.5.2).

3.3.1.2 Evaluación de la estabilidad de la solución de hidroquinona

En la Figura 3.4 se muestra la actividad redox de una solución acuosa (40 g/l) de hidroquinona, conservada bajo atmósfera de nitrógeno y protegida de la luz durante 8 horas, utilizando como transductor grafito-epoxi/membrana HYBOND™.

El objeto de esta experiencia es evaluar si durante este lapso de tiempo se generan productos de oxidación, y si el procedimiento de conservación es el idóneo.

La caracterización de esta solución se realizó en las mismas condiciones que en § 3.3.1.1, pero en este caso el sentido de barrido del voltamperograma fue el contrario. El voltamperograma cíclico se comenzó a un potencial de 0 V y el barrido se siguió en el sentido de la reducción. De esta forma, si existiesen productos de oxidación de la hidroquinona, debería observarse un pico en -0.1 V generado por la reducción de estos productos oxidados provenientes de la inadecuada conservación

de la hidroquinona. Este hecho no ocurre, por lo que se puede estimar que el procedimiento de conservación de la hidroquinona fue el idóneo.

El barrido se continuó hasta un potencial de -0.8 V. A partir de aquí, el barrido se revierte en el sentido de la oxidación, llegando a un pico de potencial ($+0.35$ V) en el cual la hidroquinona en contacto con el transductor se oxida; el barrido de potenciales se siguió hasta $+1.2$ V, punto en el cual el barrido revierte nuevamente hacia el sentido negativo. El voltamperograma se terminó a un potencial de 0.1 V.

A partir de este voltamperograma cíclico se pudo concluir que el procedimiento de conservación en atmósfera de nitrógeno y protegida de la luz es adecuado, y que, bajo estas condiciones, la solución puede conservarse durante 8 h.

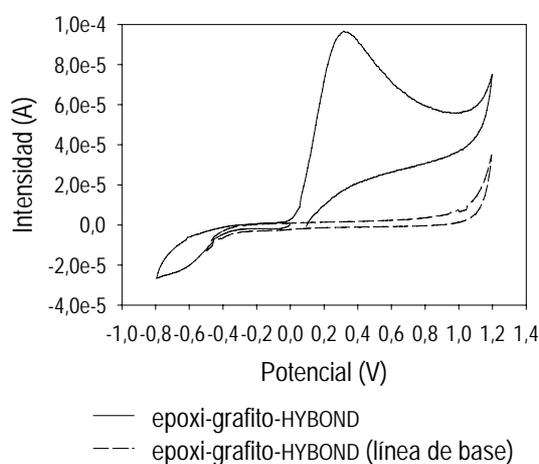


Figura 3.4. Voltamperograma cíclico correspondiente a fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0 (línea de base) al que se le ha adicionado hidroquinona 1.81 mM que fuera mantenida durante 8 h en atmósfera de nitrógeno y protegida de la luz. Se empleó como electrodo de trabajo grafito-epoxi/membrana HYBOND™. $v = 50$ mV s⁻¹.

3.3.1.3 Evaluación de la respuesta amperométrica de la enzima HRP con el potencial de trabajo seleccionado en presencia del mediador

Para la evaluación de la respuesta electroquímica del comportamiento de la hidroquinona como agente mediador en presencia del conjugado enzimático, se modificaron los transductores grafito-epoxi y grafito-epoxi/membrana HYBOND™ con 0.13 μ g del conjugado HRP-estreptavidina (véase § 3.2.2.4). Para esta evaluación se utilizó el sistema amperométrico descrito en § 2.2.2. La celda de medida fue una solución de fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M a pH 7.0 y se utiliza como electrodo de trabajo los transductores modificados con el conjugado enzimático. La concentración de hidroquinona en el medio fue de 1.8 mM. El H₂O₂ era adicionado al medio de calibración, al cual se aplicaba el potencial de reducción de la hidroquinona (§ 3.3.1.1), es decir, -100 mV.

Para poder realizar comparaciones, se realizó la misma determinación pero utilizando los transductores (grafito epoxi y grafito-epoxi/membrana HYBOND™) sin enzima absorbida.

En la Figura 3.5 se observa que se obtienen corrientes de reducción aplicando un potencial de -100 mV al medio de calibración. La respuesta amperométrica muestra una respuesta típica de saturación enzimática. A partir de estos resultados se puede concluir que:

- La hidroquinona es un mediador eficaz en la regeneración del conjugado estreptavidina-HRP, cuando éste se inmoviliza por adsorción física sobre los transductores grafito-epoxi y grafito-epoxi/membrana HYBOND™.
- El potencial de trabajo seleccionado es el correcto.
- La respuesta amperométrica a las adiciones de H_2O_2 cuando no está presente la HRP es despreciable respecto a cuando está presente.

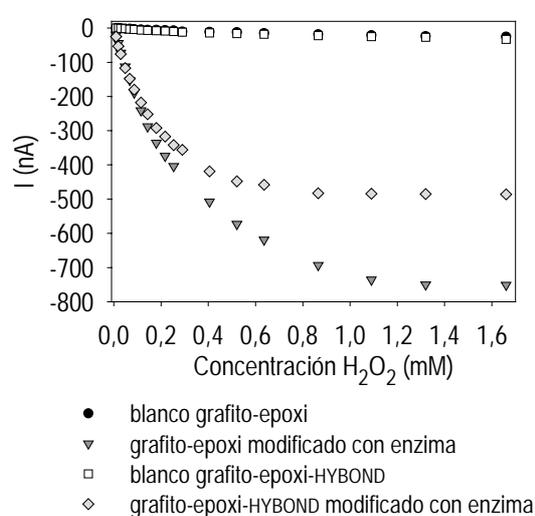


Figura 3.5. Efecto de la hidroquinona (1.8 mM) como agente mediador cuando está o no presente el conjugado estreptavidina-HRP en la superficie de los transductores grafito-epoxi y grafito-epoxi/membrana HYBOND™. Medio fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Potencial aplicado = -100 mV (vs Ag/AgCl).

3.3.2 EVALUACIÓN DE LOS TRANSDUCTORES GRAFITO-EPOXI Y GRAFITO-EPOXI/HYBOND™

Los resultados obtenidos en la experiencia realizada en § 3.3.1 se utilizaron para evaluar la utilidad de los transductores grafito-epoxi y grafito-epoxi/HYBOND™.

Los resultados indican que las membranas HYBOND™ pueden integrarse a transductores electroquímicos y que pueden obtenerse respuestas electroquímicas, es decir, que la porosidad de estas membranas (tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$) permite que las especies electroactivas generadas en la superficie del transductor puedan detectarse con suficiente sensibilidad.

Los resultados obtenidos en la experiencia que se describe en § 3.3.1.3, se utilizaron para evaluar el tipo de respuesta electroquímica obtenida, en cuanto a magnitud, tiempo de respuesta y estabilidad de la misma.

Estas membranas, al igual que las membranas de diálisis, actúan como barrera difusora, por lo que su presencia provoca una disminución en la señal amperométrica obtenida, si se compara con

el mismo transductor sin membrana (véase § 2.3.6.2, Figura 2.19). Este es su punto desfavorable, ya que disminuiría la sensibilidad del transductor.

Sin embargo, el uso de estas membranas mejora la estabilidad de las lecturas obtenidas y, además, mejora la reproducibilidad entre calibrados realizados sobre las mismas condiciones, estabilizando la señal y reduciendo el ruido, e incrementa el rango lineal de respuesta.

Los tiempos de respuesta son mayores a los obtenidos sin la utilización de la membrana, pero de todas maneras son cortos (2 minutos para la experiencia realizada en § 3.3.1.3, aunque depende de la cantidad de enzima inmovilizada).

De esta última experiencia se puede también concluir que la actividad enzimática no se ve afectada por su adsorción en la membrana HYBOND™ o por su adsorción directa sobre el transductor grafito-epoxi.

3.3.3 INMOVILIZACIÓN SUPERFICIAL COVALENTE DE PEROXIDASA EN UN COMPOSITE GRAFITO-EPOXI MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO

La Figura 3.6 muestra los resultados de tratar los transductores grafito-epoxi (no modificados) y grafito-epoxi-ácido esteárico (1 %) con NHS-EDC solamente (reactivos de inmovilización covalente) y con NHS-EDC y enzima HRP.

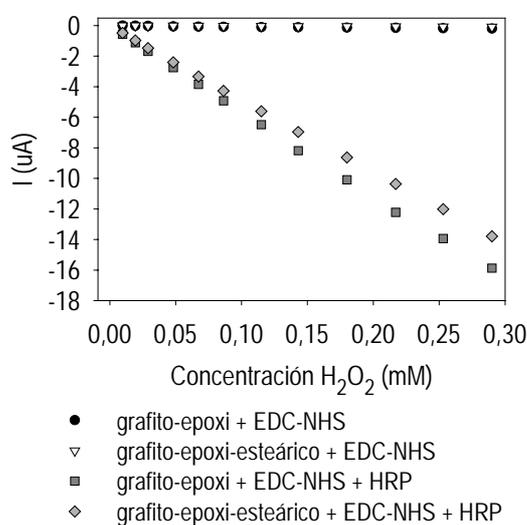


Figura 3.6. Evaluación de la inmovilización covalente de HRP (1 mg) sobre el transductor grafito-epoxi-ácido esteárico (1 %). Comparación con el transductor no modificado grafito-epoxi (que evalúa la adsorción de la enzima) y con ambos transductores sometidos sólo al tratamiento inmovilizante (EDC-NHS). Medio amortiguador fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Hidroquinona: 1.8 mM. Potencial aplicado = -100 mV (vs Ag/AgCl).

Los resultados muestran que los transductores grafito-epoxi (no modificados) y grafito-epoxi-ácido esteárico (1 %) sometidos al tratamiento de inmovilización solamente presentan una respuesta amperométrica insignificante respecto a los mismos transductores tratados con posterioridad con la

enzima. Esto demuestra que no hay una contribución significativa a la respuesta amperométrica de los reactivos NHS y EDC.

Por otro lado, la Figura 3.6 evalúa la adsorción de la enzima peroxidasa sobre el transductor no modificado previamente sometido a tratamiento con NHS-EDC y la inmovilización covalente de la misma enzima en el transductor grafito-epoxi-ácido esteárico (1 %) sometido a idéntico tratamiento que el transductor no modificado. Los resultados demuestran que la respuesta amperométrica de los transductores se debe a la adsorción de la enzima que contribuye más que la inmovilización covalente, si es que ésta realmente existe en alguna medida.

Esta falta de inmovilización covalente puede deberse a que en realidad la superficie del transductor grafito-epoxi-ácido esteárico (1 %) carece de funciones carboxílicas, ya que en § 2.3.2.3 los resultados sugirieron la posibilidad de la pérdida de ácido esteárico por lavado intensivo o por tratamiento con ultrasonido (que acelera este proceso).

Otra posibilidad es que la inmovilización covalente no funcione. Esta diferenciación podrá realizarse una vez que se comparen los resultados del mismo tratamiento con el transductor pasta de grafito-ácido esteárico.

3.3.4 INMOVILIZACIÓN SUPERFICIAL COVALENTE DE PEROXIDASA EN UN COMPOSITE GRAFITO-METACRILATO MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO

La Figura 3.7 muestra los resultados de tratar los transductores grafito-metacrilato (no modificados) y grafito-metacrilato-ácido esteárico (4 %) con NHS-EDC y enzima HRP.

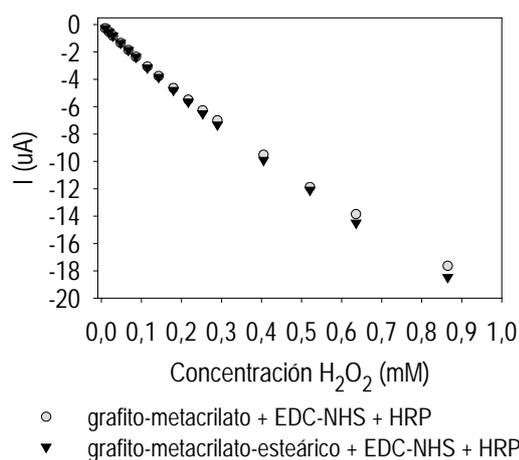


Figura 3.7. Evaluación de la inmovilización covalente de HRP (1 mg) sobre el transductor grafito-metacrilato-ácido esteárico (4 %). Comparación con el transductor no modificado grafito-metacrilato (que evalúa la adsorción de la enzima). Medio amortiguador fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Hidroquinona: 1.8 mM. $E_{aplicado} = -0.1$ V (vs Ag/AgCl).

Al igual que en § 3.3.3 para el transductor grafito-epoxi-ácido esteárico, los resultados demuestran que la respuesta amperométrica se debe fundamentalmente a la adsorción de la enzima

que contribuye más que la inmovilización covalente, si es que esta realmente existe en alguna medida.

Esta falta de inmovilización covalente puede deberse a que en realidad la superficie del transductor grafito-metacrilato-ácido esteárico (4 %) carece de funciones carboxílicas, ya que en § 2.3.1.3 los resultados sugirieron la posibilidad de la pérdida de ácido esteárico por lavado intensivo o por tratamiento con ultrasonido (que acelera este proceso).

Otra posibilidad es que la inmovilización covalente en realidad no haya tenido lugar.

3.3.5 INMOVILIZACIÓN SUPERFICIAL COVALENTE DE PEROXIDASA EN UN SENSOR DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON ÁCIDO ESTEÁRICO

La Figura 3.8 muestra los resultados de tratar los transductores de pasta de carbono (no modificados) y pasta de carbono-esteárico (4.5 %) con NHS-EDC y enzima HRP.

Los resultados muestran en este caso una diferencia en la respuesta amperométrica entre el transductor no modificado y el modificado con ácido esteárico. La respuesta en el sensor no modificado se debe a la adsorción de la enzima mientras que el transductor pasta de carbono-ácido esteárico (4.5 %) evalúa la inmovilización covalente que, en este caso, contribuye más que la adsorción. Sin embargo, el fenómeno de adsorción es importante, y puede deberse a la cantidad de enzima, que es alta, respecto a la cantidad de reactivo inmovilizante y de funciones carboxílicas en la superficie. No se han optimizado estas variables porque, como ya se ha mencionado, no se ha pensado en trabajar con pasta de carbono por sus propiedades físicas indeseables.

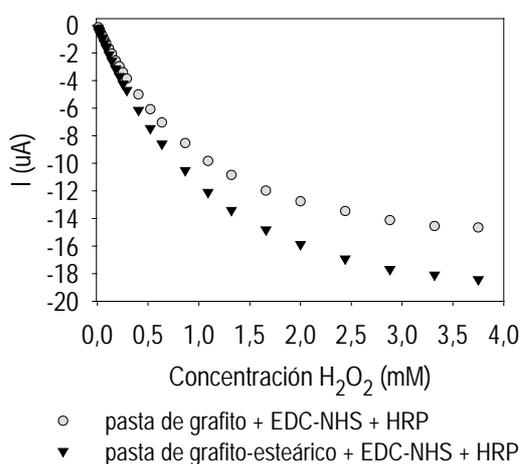


Figura 3.8. Evaluación de la inmovilización covalente de HRP (1 mg) sobre el transductor pasta de carbono-ácido esteárico (4.5 %). Comparación con el transductor blanco pasta de carbono (que evalúa la adsorción de la enzima). Medio amortiguador fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M pH 7.0. Hidroquinona: 1.8 mM. $E_{aplicado} = -0.1 V$ (vs Ag/AgCl).

En este caso se demuestra que la inmovilización covalente funciona sobre estos transductores, como ya había sido reportado con anterioridad ⁶⁻⁸. Sin embargo, se seguirá en la dirección de conseguir una inmovilización adecuada sobre transductores más robustos basados en

composites rígidos, ya que los basados en pasta de carbono son sumamente delicados y mecánicamente inadecuados.

Pese a todo, sobre este transductor se prueba que los reactivos inmovilizantes son adecuados. Esto implica que los transductores basados en composite rígidos (grafito-epoxi y grafito-metacrilato) modificados con ácido esteárico no se han logrado funcionalizar de manera adecuada mientras que esto si se consiguió en el transductor pasta de grafito-ácido esteárico.

3.4 CONCLUSIONES

1. El potencial de reducción de la hidroquinona determinado en un transductor grafito-epoxi/HYBOND™ es de -100 mV (vs Ag/AgCl), mientras que para el transductor grafito-epoxi es de 0 mV.
2. La conservación óptima de una solución de hidroquinona consiste en mantener la misma bajo atmósfera de nitrógeno y protegida de la luz. Esta metodología asegura la conservación en un lapso de 8 h de preparada.
3. La hidroquinona es un mediador eficaz para la regeneración de la peroxidasa, aplicando un potencial de -100 mV (vs Ag/AgCl), tanto en un transductor grafito-epoxi, como en grafito-epoxi/HYBOND™. La respuesta a H_2O_2 –a dicho potencial– de ambos transductores es despreciable cuando HRP no está presente.
4. Las variables para el funcionamiento óptimo del sistema enzima-substrato-mediador (HRP- H_2O_2 -hidroquinona) son:
 - Potencial de trabajo: -100 mV, vs Ag/AgCl (potencial de reducción de la hidroquinona)
 - Medio de trabajo: tampón fosfato 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 7.0
 - Concentración del mediador: 1.8 mM
5. Las membranas HYBOND™ pueden integrarse a transductores electroquímicos. Con su uso, las señales amperométricas son menores respecto a que si no se utilizan, pero generan respuestas más estables, más reproducibles y con menor ruido. Los tiempos de respuesta son mayores, así también como el rango dinámico de respuesta.
6. La inmovilización covalente de la peroxidasa utilizando EDC y NHS sobre transductores grafito-epoxi y grafito-metacrilato funcionalizados con funciones $-COOH$ no es adecuada. Puede deberse a la pérdida de éstas funciones del transductor, hecho que se sugirió en el Capítulo 2. La adsorción (en seco) de la enzima sobre estos transductores es muy importante. Los reactivos inmovilizantes EDC y NHS no contribuyen en la respuesta amperométrica.
7. La inmovilización covalente de la peroxidasa utilizando EDC y NHS se consiguió sobre el transductor de pasta de grafito modificado con ácido esteárico. La adsorción sobre este transductor es también muy importante. Sin embargo, se proseguirá con el desarrollo de composites rígidos funcionalizados para lograr la inmovilización covalente, ya que el material pasta de grafito es mecánicamente inadecuado.
8. Los transductores escogidos, por lo tanto, para el desarrollo de genosensores, de entre los que se han construido y evaluado, son los basados en el composite rígido grafito-epoxi. En primera instancia, en los capítulos 4 a 8 se integra a la superficie del composite grafito-epoxi

una membrana HYBOND™, en un modelo de genosensores de membranas recambiables. En este caso, la inmovilización del material genético se lleva a cabo por adsorción mediante protocolos clásicos descritos en la bibliografía. Posteriormente, a partir del capítulo 9 se intentará inmovilizar directamente el DNA sobre el composite grafito-epoxi.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ M. Yang, M. E. McGovern, M. Thompson. *Anal. Chim. Acta* 1997, 346, 259-275.
- ² J. Labuda, M. Bucková, M. Vanicková, J. Mattusch, R. Wennrich. *Electroanalysis* 1999, 11, 101-107.
- ³ D-W. Pang, H. D. Abruña. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3162-3169.
- ⁴ M. T. Carter, M. Rodriguez, A. J. Bard. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8901-8911.
- ⁵ K. M. Millan, A. J. Spurmanis, S. R. Mikkelsen. *Electroanalysis* 1992, 4, 929-932.
- ⁶ K. M. Millan, S. R. Mikkelsen. *Anal. Chem.* 1993, 65, 2317-2323.
- ⁷ K. M. Millan, A. Saraullo, S. R. Mikkelsen. *Anal. Chem.* 1994, 66, 2943-2948.
- ⁸ S. R. Mikkelsen. *Electroanalysis* 1996, 8, 15-19.
- ⁹ K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori. *Anal. Chim. Acta* 1994, 286, 219-224.
- ¹⁰ G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 43-51.
- ¹¹ E. Palacek, M. Fojta, M. Tomschik, J. Wang. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 621-628.
- ¹² J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, N. Dontha. *Biosens. Bioelectron.* 1997, 12, 587-599.
- ¹³ J. Wang, G. Rivas, J. R. Fernandes, J. L. Lopez Paz, M. Jiang, R. Waymire. *Anal. Chim. Acta* 1998, 375, 197-203.
- ¹⁴ P. Singhal, W. G. Kuhr. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4828-4832.
- ¹⁵ K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori. *Anal. Chem.* 1994, 66, 3830-3833.
- ¹⁶ L. J. Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Techniques*; Academic Press, Inc.: San Diego, 1992.
- ¹⁷ L. T. Kirby. *DNA Fingerprinting*; Stockton Press: New York, 1990.
- ¹⁸ T.A. Brown. *Molecular Biology*; Bios Scientific Publishers: Oxford, 1991.
- ¹⁹ R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6230-6234.
- ²⁰ M. Renz, C. Kurz. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 3435-3444.
- ²¹ S. Girotti, E. Ferri, S. Ghini. *Anal. Chim. Acta* 1991, 255, 387-394.
- ²² T. De Lumley-Woodyear, C. N. Campbell, E. Freeman, A. Freeman, G. Georgiou, A. Heller. *Anal. Chem.* 1999, 71, 535-538.
- ²³ C. N. Campbell, D. Gal, N. Cristler, C. Banditrat, A. Heller. *Anal. Chem.* 2002, 74, 158-162.
- ²⁴ F. Azek, C. Grossiord, M. Joannes, B. Limoges, P. Brossier. *Anal. Biochem.* 2000, 284, 107-113.
- ²⁵ J. S. White, D. C. White. *Source book of enzymes*; CRC Press: Boca Ratón, 1997.
- ²⁶ Y-L. Zhang, C-Z. Zhang, H-X. Shen. *Anal. Lett.* 2000, 33, 2425-2439.
- ²⁷ T. Ruzgas, E. Csöregi, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga. *Anal. Chim. Acta* 1996, 330, 123-138.
- ²⁸ C. Degrand, B. Limoges, A-M. Martre, B. Schöllhorn. *Analyst* 2001, 126, 887-891.
- ²⁹ T. Ohgaru, H. Tatsumi, K. Kano, T. Ikeda. *J. Electroanal. Chem.* 2001, 496, 37-43.
- ³⁰ P. Domínguez Sánchez, P. Tuñón Blanco, J. M. Fernández Álvarez, M. R. Smyth, R. O'Kennedy. *Electroanalysis* 1990, 2, 303-308.
- ³¹ O. Adeyoju, E. I. Iwuoha, M. R. Smyth. *Electroanalysis* 1995, 7, 924-929.
- ³² J. Wang, M. S. Lin. *Electroanalysis* 1989, 1, 43-48.
- ³³ P. Pantano, T. H. Morton, W. G. Kuhr. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 1832-1833.
- ³⁴ X. Yang, G. G. Guilbault, A. A. Suleiman. *Talanta* 1996, 43, 1109-1115.
- ³⁵ C. Lei, J. Deng. *Anal. Chem.* 1996, 68, 3344-3349.
- ³⁶ Y. Liu, H. Liu, J. Qian, J. Deng, T. Yu. *Anal. Chim. Acta* 1995, 316, 65-72.
- ³⁷ Adriana Morales. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona. 1993.
- ³⁸ A. Morales, F. Céspedes, J. Muñoz, E. Martínez Fàbregas, S. Alegret. *Anal. Chim. Acta* 1996, 332, 131-138.

-
- ³⁹ S. Alegret, F. Céspedes, E. Martínez Fàbregas, D. Martorell, A. Morales, E. Centelles, J. Muñoz, *Biosens. Bioelectron.* 1996, 11, 35-44.
- ⁴⁰ Marta Santandreu i Vilajosana. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona. 1998.
- ⁴¹ P. C. Pandey, S. Upadhyay, B. Upadhyay, *Anal. Biochem.* 1997, 252, 136-142.
- ⁴² M. Poon, R. L. McCreery, *Anal. Chem.* 1987, 59, 1615-1620.
- ⁴³ D. Huet, C. Bourdillon, *Anal. Chim. Acta* 1993, 272, 205-212.
- ⁴⁴ S. S. Ghosh, G. F. Musso, *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5353-5372.
- ⁴⁵ V. Lund, R. Schmid, D. Rickwood, E. Hornes, *Nucleic Acids Res.* 1988, 22, 10861-10880.
- ⁴⁶ X. Sun, P. He, S. Liu, J. Ye, Y. Fang, *Talanta* 1998, 47, 487-495.
- ⁴⁷ S. Liu, J. Ye, P. He, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta* 1996, 335, 239-243.
- ⁴⁸ S. R. Rasmussen, M. R. Larsen, S. E. Rasmussen, *Anal. Biochem.* 1991, 198, 138-142.
- ⁴⁹ P. A. E. Piuino, U. J. Krull, R. H. E. Hudson, M. J. Damha, H. Cohen, *Anal. Chim. Acta* 1994, 288, 205-214.
- ⁵⁰ B. C. F. Chu, G. M. Wahl, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* 1983, 11, 6513-6529.
- ⁵¹ S. F. Wolf, L. Haines, J. Fisch, J. N. Kremsky, J. P. Dougherty, K. Jacobs, *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 2911-2926.
- ⁵² L. Henke, P. A. E. Piuino, A. C. McClure, U. J. Krull, *Anal. Chim. Acta* 1997, 344, 201-213.
- ⁵³ F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, K. Niikura, Y. Okahata, *Anal. Chem.* 1997, 69, 2043-2049.
- ⁵⁴ D. Sehgal, I. K. Vijay, *Anal. Biochem.* 1994, 218, 87-91.
- ⁵⁵ M. C. Desai, L. M. Stephens Stramiello, *Tetrahedron Letters* 1993, 34, 7685-7688.
- ⁵⁶ A. Previero, J. Derancourt, M. A. Coletti Previero, *FEBS Letters* 1973, 33, 135-138.
- ⁵⁷ B. Johnsson, S. Lofas, G. Lindquist, *Anal. Biochem.* 1991, 198, 268-277.
- ⁵⁸ I. Moser, T. Schalkhammer, F. Pittner, G. Urban, *Biosens. Bioelectron.* 1997, 12, 729-737.