

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Biomedicina

Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica

Tesis Doctoral

Desarrollo de nuevas estrategias de detección de ácidos nucleicos para diagnóstico molecular

Candidato doctoral

Agustín Robles Remacho

Directores de Tesis

Dra. Rosario María Sánchez Martín

Dr. Juan José Díaz Mochón

Granada, 26 de mayo de 2021



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales Autor: Agustín Robles Remacho ISBN: 978-84-1306-955-5 URI: http://hdl.handle.net/10481/69897

A mis padres, hermanas y sobrinos, por estar siempre ahí y acompañarme en todo momento.

"Lo más importante es no dejar de cuestionar. La curiosidad tiene su propia razón de existir"

Albert Einstein

Agradecimientos

No sabría por dónde empezar para agradecer a las personas que me han acompañado durante la tesis doctoral. Sin esas personas que han estado ahí, esto no hubiera sido posible. Son tantas las vivencias, el crecimiento, los momentos compartidos en estos años, que no podré agradecerlo lo suficiente. Me gustaría empezar dando las gracias a Rosario y Juanjo, por la confianza que depositaron en mi para realizar la tesis. Por abrirme las puertas y darme un lugar en vuestro grupo, y por la calidad humana con la que nos tratáis a todos nosotros. Gracias. Quiero agradecer a mis compañeros de NanoChemBio: A Victoria, Javi, Jose Laz, Jose Espejo, Belén, Antonio Delgado, Araceli, Antonio Marín, Carmen, Jose Lucas, Mónica, Mª Paz, por que habéis sido un gran apoyo durante estos años. Gracias por todas las vivencias, horas de trabajo compartidas, comidas, desayunos (ipróximamente unos churros Javi! Jaja), que nos han hecho el día a día tan feliz. Sois como una segunda familia, y haber trabajado a vuestro lado ha sido de los mejores regalos que he tenido. Con vosotros he compartido alegrías, los pormenores de la ciencia, dudas, y muchos buenos ratos. Gracias. Quiero agradecer a toda la gente de DESTINA, por ayudarme cuando lo he necesitado. Y en especial quiero agradecer a Angélica, que ha sido una persona muy importante en esta etapa, con la que he compartido risas, confidencias y muchos buenos momentos, ha sido todo un lujo que hayas sido mi posdoc. ¡No me olvido que te debo una cena!

He tenido la suerte de poder realizar la tesis en un lugar como Genyo, lleno de amigos y compañeros con los que he compartido el día a día y grandes momentos. En primer lugar, quiero agradecer a todos los que forman y han formado la Sala 1 por hacer los días tan maravillosos: A Inma y Silvia (por todos los buenos momentos vividos juntos), a Carlos Peris (ino es baladí, hombre!), a Jose Heavy (por todas esas charlas desestresantes), a Marina, Alba Rodríguez, Jorge, Mari, Gabi, hacéis de la sala un lugar especial. Quiero hacer especial mención a los Genyo Gamers, que consiguieron que las tardes de confinamiento fueran increíbles con cada partida. A Goncho, Gonzalo, Alberto, Diego y Manu, los caballeros del Age ¡Espero que no sean las últimas partidas que echamos! Gracias a Joan, el Bizantino por excelencia, por esas buenas tardes del día de Joan con una cerveza y hablando de todo con ese atardecer, ¡Espero que disfrutemos muchas más tardes! A Amador e Iris, por abrirme las puertas de su casa tantas veces, por las risas, confidencias y todos los momentos compartidos. A los Genyos que habéis sido tan importantes en esta etapa, por todas las sonrisas en el trabajo, fiestas, rutas, esas tardes de vóley y tantas experiencias juntos: Vicky, Pili, Dani, Juansan, Mariadel, Kris, Fran, Maribotis, Abel, Juan Carlos, Clara, Elena, Marisa, Carlos, Julia, Lola, Ana, Víctor, Alba, Adri, Rita, Juanro,

Kala, Araceli, Alex, Mati, Ana Pérez, Félix. Hacéis que Genyo y esta etapa sean increíbles. Quiero agradecer a Raquel todas las horas de microscopio, todos los conejos recibidos y la paciencia.

Quiero agradecer a personas que me han acompañado durante la tesis. A Miri y Cristi, sois mi pack favorito. Habéis estado desde el principio hasta el final, a pesar de mis muchas ausencias, pero siempre lo he pasado en grande con vosotras. Especialmente me gustaría agradecer a Ali. Es muy bonito que hayas formado parte de esta etapa. Una buena amiga con la que he compartido cientos de momentos buenos y malos, hemos tenido muchas confidencias y has sido una parte muy importante de todo esto. Gracias Ali.

Gracias a Eli, llevamos un largo recorrido juntos, llenos de historias, amistad y apoyo. Después de tanto tiempo, desde que empezamos la carrera, estamos aquí, compartiendo una nueva etapa juntos. ¡Que ganas tengo de vernos a los dos como doctores!

Gracias a la gente de Estocolmo, que me acogió de la forma más cálida posible. Thanks to Nara and Ruben, for directing me during the stay in an incredible way. Gracias Alberto, Antía y Nuria, por hacer una familia tan lejos de casa, por todos los momentos compartidos iy todas esas barbacoas! Especialmente a Laura, por todas las conversaciones que hemos tenido, creo que la palabra es placer, como un largo café que no se acaba charlando sobre la vida dando paseos, con un escenario tan bonito como Estocolmo, es una experiencia que no está pagada.

Quiero agradecer especialmente a mi familia, que ha estado ahí siempre, me han apoyado incondicionalmente. A mis padres, por ser ejemplo de sacrificio por sus hijos, por apoyarme y darme toda la fuerza necesaria. A mis hermanas: Hermi, por ser un ejemplo para mí y por todos los momentos vividos juntos, Alicia, otro gran ejemplo para mí y por ser un apoyo tan importante en incontables ocasiones. A mi hermana María, por todo su cariño, a la que le deseo mucha suerte en su nueva etapa. A mi sobrino Álvaro, que nos llena a todos de alegría con su personalidad. Y a mi sobrino Salva, que llega en el mejor momento, después de una pandemia y tiempos raros, dándonos a todos mucha alegría e ilusión. Gracias a vosotros por hacerme sentir tan afortunado.

Y por último especialmente me gustaría dar las gracias a Alberto. Me has acompañado durante parte de esta etapa de la mejor forma posible. Eres un gran compañero en el camino. He aprendido mucho de ti. Y lo mejor de todo, te he admirado y sigo admirando. Gracias.

A todos vosotros, gracias.

Criterios de calidad para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Publicación de un artículo científico aceptado en revistas relevantes en el campo de conocimiento de la tesis doctoral, firmada por el doctorando, incluyendo parte de los resultados de la tesis

-<u>Agustín Robles-Remacho</u>; María Angélica Luque-González; Roberto Ángel González-Casín; María Victoria Cano-Cortés; Francisco Javier López-Delgado; Juan José Guardia-Monteagudo; Mario Antonio-Fara; Rosario María Sánchez-Martín; Juan José Díaz-Mochón. Development of a nanotechnology-based approach for capturing and detecting nucleic acids by using flow cytometry. Talanta. 2021 May 1;226:122092. doi: 10.1016/j.talanta.2021.122092

Criterios de calidad para optar al grado de Doctor Internacional por la Universidad de Granada

Estancia doctoral en un centro de investigación extranjero

-Abril-Junio 2019. Estancia en Science for Life Laboratory, University of Stockholm, Sweden. Laboratorio de Mats Nilsson de diagnóstico molecular. Proyecto: "Aplicación de C2CA para diagnóstico del virus del Zika y evaluación de fármacos anti-flavivirales", bajo la supervisión del Dr. Mats Nilsson. Ayudas a la movilidad predoctoral FPU para realizar estancias breves en centros de I+D extranjeros 2018. EST18/00746.

Idioma de la tesis doctoral

La tesis doctoral ha sido escrita en español y será defendida en español. Adicionalmente y siguiendo los requerimientos de la Universidad de Granada, parte de la tesis doctoral ha sido escrita en inglés (resumen, objetivos, conclusiones), como idioma vehicular de la ciencia, así como las conclusiones serán defendidas en inglés.

Artículos adicionales durante el periodo de tesis doctoral

(1) Antonio Marín-Romero; <u>Agustín Robles-Remacho</u>; Mavys Tabraue Chávez; Bárbara López-Longarela; Rosario María Sánchez-Martín; Juan José Guardia-Monteagudo; Mario Fara; Francisco Javier López-Delgado; Salvatore Pernagallo; Juan José Díaz-Mochón. A PCR-free technology to detect and quantify microRNAs directly from human plasma. Analyst. 2018 Nov 19;143(23):5676-5682. doi: 10.1039/c8an01397g

(2) Antonio Delgado González; <u>Agustín Robles-Remacho</u>; Antonio Marín Romero; Simone Detassis; Bárbara López Longarela; Francisco Javier López Delgadocv; Diego de Miguel Pérez; Juan José Guardia Monteagudo; Mario Fara; Mavys Tabraue Chavez; Salvatore Pernagallo; Rosario María Sánchez Martín; Juan José Díaz Mochón. PCR-free and chemistry-based technology for miR-21 rapid detection directly from tumour cells. Talanta. 2019 Aug 1;200:51-56.. Epub 2019 Mar 8. doi: 10.1016/j.talanta.2019.03.039

(3) Ruben R.G. Soares; Aleksandra Pettke; <u>Agustín Robles-Remacho</u>; Sahar Zeebaree; Sibel Ciftci; Marianna Tampere; Aman Russom; Marjo-Riitta Puumalainen; Mats Nilsson; Narayanan Madaboosi. Sensors and Actuators. Circle-to-circle amplification coupled with microfluidic affinity chromatography enrichment for in vitro molecular diagnostics of Zika fever and analysis of anti-flaviviral drug efficacy. Sensors and Actuators B: Chemical. Volume 336 - 129723. 1 Junio 2021. doi: 10.1016/j.snb.2021.129723

(4) Diego de Miguel Pérez; Alba Rodríguez Martínez; Alba Ortigosa Palomo; Mayte Delgado Ureña; Jose Luis García Puche; <u>Agustín Robles Remacho</u>; José Expósito Hernández; José Antonio Lorente Acosta; Francisco Gabriel Ortega Sánchez; María José Serrano Fernández. Extracellular vesicle-microARNs as liquid biopsy biomarkers for disease identification and prognosis in metastatic colorectal cancer patients. Scientific Reports. 2020 Mar 4;10(1):3974. doi: 10.1038/s41598-020-60212-1

Becas y financiación

El candidato doctoral Agustín Robles Remacho agradece las fuentes de financiación que han hecho posible esta tesis doctoral:

-Beca para contratos predoctorales Formación de Profesorado Universitario (FPU) 2015. Ministerio de Educación de España. FPU15/06418.

-Ayudas a la movilidad predoctoral FPU para realizar estancias breves en centros de I+D extranjeros 2018. EST18/00746.

-Este trabajo de investigación ha recibido financiación del Ministerio de Economía y Competitividad de España (Programa Nacional de Investigación Orientada a los Retos de la Sociedad, BIO2016-80519-R); y de la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía (Convocatoria de Proyectos de Investigación de Excelencia 2012, Proyecto referencia BIO-1778).

Índice

Compromiso o	de respeto de los derechos de autor/a3
Criterios de ca	ilidad para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada11
Artículos adici	onales durante el periodo de tesis doctoral12
Becas y financ	iación13
Resumen	
Abstract	
Objetivos	
Objectives	
Abreviaciones	
Capítulo 1. In detección de a	troducción general: Ácidos nucleicos en diagnóstico molecular. Tecnologías de ácidos nucleicos. Marcaje por química dinámica (DCL)
1.1. Imp	ortancia de los ácidos nucleicos en el diagnóstico molecular
1.1.1.	Detección de marcadores genéticos asociados a cáncer
1.1.2.	Detección de micro-ARNs
1.1.3.	Nucleic Acid Testing (NAT) de enfermedades infecciosas
1.2. Tecr	nologías de amplificación, hibridación y detección de ácidos nucleicos40
1.2.1.	Química de detección de RT-qPCR40
1.2.2.	Métodos de amplificación isotermal42
1.2.3.	<i>Técnicas</i> de hibridación <i>in situ</i> (ISH)
1.2.4.	Microarrays de ADN51
1.2.5.	Next-Generation Sequencing (NGS). RNA-seq. Nanostring
1.3. Aná	logos de ácidos nucleicos
1.3.1.	Ácidos nucleicos bloqueados (LNAs)56
1.3.2.	Ácidos nucleicos peptídicos (PNAs)57
1.4. Mar	caje por Química Dinámica (DCL)60
1.4.1.	Sondas DGL [®] , SMART-Nucleobases y química dinámica60
1.4.3.	Aplicaciones DCL
Capítulo 2. De para capturar	sarrollo de un enfoque basado en nanotecnología y marcaje por química dinámica y detectar ácidos nucleicos mediante citometría de flujo (Objetivo 1)69
2.1. Intro	oducción69
2.1.1.	Justificación
2.1.2.	Nanopartículas de poliestireno (PS-NPs)70
2.1.3.	KRAS como ácido nucleico diana74
2.1.4.	MiR-122 como ácido nucleico diana75

2.1.5. nucleicos	Combinación de nanotecnología y química dinámica para la detección de ácidos con resolución de una base mediante citometría de flujo
2.2. Resu	ultados
2.2.1.	Preparación de nanopartículas bifuncionales Strep-FAM-NPs (13)79
2.2.2.	Caracterización de las nanopartículas bifuncionales Strep-FAM-NPs (13) 81
2.2.3. espectro	Determinación de la concentración de Strep-FAM-NPs (13) usando un método fotométrico
2.2.4. FAM-NPs	Determinación de la concentración de estreptavidina conjugada en las Strep- (13)
2.2.5. para la de	Ácidos nucleicos diana, diseño de sondas PNA, sondas DGL y SMART-Nucleobases etección de KRAS
2.2.6. FAM-NPs	Optimización y validación de la captura del heterodúplex PNA:ADN por las Strep- 6 (13)
2.2.7.	Evaluación de la estabilidad de la estreptavidina en las Strep-FAM-NPs (13) 89
2.2.8.	Detección de productos DCL por las Strep-FAM-NPs (13)90
2.2.9. DCL form	Optimización del número de Strep-FAM-NPs (13) usado para capturar el producto ado en solución
2.2.10. humano	Curva de calibración de detección de KRAS con resolución de una base en plasma
2.2.11. mutacior	Discriminación la presencia de variaciones de nucleótido correspondientes a nes puntuales en el codón 12 de KRAS: detección de KRAS G12C
2.2.12.	Detección de productos de PCR KRAS96
2.2.13. miR-122	Validación de las Strep-FAM-NPs (13) para capturar el heterodúplex PNA:ssDNA-
2.2.14. resolució	Detección de productos DCL por Strep-FAM-NPs (13): detección de miR-122 con n de base única
2.3. Disc	usión
Capítulo 3. Par mediante mar	rte I. Detección de secuencias ADN α-satélite humanas con resolución de una base caje por química dinámica y FISH (Objetivo 2)105
3.1. Intro	oducción
3.1.1.	Justificación
3.1.2.	El problema de la secuenciación de secuencias genómicas repetidas106
3.1.3.	Secuencia ADN $\alpha\text{-satélite}\dots\dots107$
3.1.4.	PNA-FISH: Aplicación de sondas PNA en FISH109
3.1.5. resolució	Aplicación de química dinámica <i>in situ</i> para detectar secuencias repetidas con n de una base
3.2. Resu	ultados
3.2.1. secuencia	Validación de sondas PNA neutrales y sondas γPNA para la detección de la a α-satélite humana y secuencias teloméricas

	3.2.2. secuen	Validación de marcaje por química dinámica <i>in situ</i> para la detección de la cia α-satélite humana con resolución de una base mediante FISH
	3.2.3. químic	Optimización de reactivos y condiciones para la aplicación de marcaje por a dinámica <i>in situ</i>
	3.2.4. Estrept	Validación de química dinámica <i>in situ</i> mediante el uso de SMART-C-Biotina y avidina-Alexa Fluor 647
	3.2.5. mediar	Detección de la secuencia α-satélite humana con resolución de una base nte marcaje por química dinámica <i>in situ</i> 129
	3.2.6.	Especificidad de incorporación de SMART-Nucleobases
	3.2.7.	Especificidad de detección de secuencias humanas137
	3.2.8.	Análisis citogenético, cuantificación de señales y sensibilidad de la técnica138
	3.2.9.	Limitaciones
3.	3. Di	scusión
3.	4. Fu	turas aplicaciones: Secuenciación por química dinámica in situ
Capí línea	tulo 3. as celula	Parte II. Detección de mutaciones puntuales <i>in situ</i> en ARN mensajero de KRAS en res tumorales mediante marcaje por química dinámica (Objetivo 2)
3.	5. In	troducción
	3.5.1.	Justificación
	3.5.2.	Single-cell RNA-seq y sus limitaciones150
	3.5.3.	RNA-FISH y detección de ARN in situ con resolución de una base
	3.5.4.	Imagen de ARN mediante FLAPs y microscopía de super-resolución153
	3.5.5. resoluc	Aplicación de química dinámica <i>in situ</i> para detectar ARNm de KRAS con ión de una base
3.	6. Re	esultados
	3.6.1. KRAS n	Validación de la detección de la secuencia de transcrito de ARN mensajero de nediante sondas PNA y co-localización de señales (Estrategia 1)
	3.6.2. mensa	Set de sondas PNA para la validación de la detección de la secuencia de ARN ero de KRAS <i>in situ</i> (Estrategia 2)161
	3.6.3. KRAS c	Marcaje por Química Dinámica <i>in situ</i> para la detección de ARN mensajero de on resolución de una base (Estrategia 3)166
3.	7. Di	scusión
Capí eval	tulo 4. uación (Circle-to-circle Amplification para diagnóstico molecular del virus del Zika y de la eficacia de fármacos antiflavivirales (Objetivo 3)
4.	1. In	troducción
	4.1.1.	Justificación
	4.1.2.	Rolling Circle Amplification (RCA)178
	4.1.3.	Circle-To-Circle amplification (C2CA)181
	4.1.4.	Biología, epidemiología y diagnóstico del virus del Zika

4.1.5.	Aplicación de C2CA para detectar el virus del Zika en PBMC infectadas
4.2. Re	sultados
4.2.1. fluorese	Cuantificación de RCPs obtenidos por RCA y C2CA mediante microscopía cente
4.2.2.	Validación de RCA para detectar secuencias sintéticas del virus del Zika 188
4.2.3.	Evaluación de la interferencia de los oligos DO y CO191
4.2.4. región (Curva de calibración 1RCA para la diana sintética correspondiente a ADNc de la codificante de la proteína C del virus del Zika
4.2.5. de la pr	Curva de calibración C2CA para la diana sintética ADNc de la región codificante oteína C del virus del Zika195
4.2.6. virus de	Aplicación de C2CA y análisis por microscopía para diagnóstico molecular del el Zika y evaluación de la eficacia de fármacos antiflavivirales
4.2.7. molecu	Breve reseña: Aplicación de C2CA y análisis por microfluídica para el diagnóstico lar de la fiebre del Zika y la evaluación de fármacos antiflavivirales
4.2.8.	Exploración de un método de RCA cuantitativo en tiempo real (RT-qRCA) 211
4.2.9.	Aplicación de RCA en superficie
4.3. Dis	scusión
Capítulo 5. C	Conclusiones
Chapter 5. C	onclusions219
Capítulo 6. N	Aetodología
6.1. M	etodología Marcaje por química dinámica
6.1.1.	Marcaje por química dinámica (DCL). Información general
6.1.2.	Resuspensión de sondas PNA y DGL liofilizadas
6.2. M	etodología capítulo 2
6.2.1.	Citometría de flujo
6.2.2.	Síntesis y preparación de Strep-FAM-NP (13)
6.2.3.	Caracterización de las Strep-FAM-NPs (13) 229
6.2.4.	Diseño de oligonucleótidos diana, diseño sondas PNA, diseño sondas DGL 231
6.2.5.	Ensayos de hibridación PNA:ADN en solución
6.2.6.	Ensayos de hibridación DGL:ADN en solución231
6.2.7.	Reacción DCL en plasma humano. Curva de calibración en plasma humano 232
6.2.8.	Extracción de ARN, síntesis de ADNc y end-point PCR
6.3. M	etodología capítulo 3
6.3.1.	Microscopía confocal y de epifluorescencia
6.3.2.	Cultivos celulares
6.3.3.	Choque hipotónico, fijación Carnoy, preparación de metafases
6.3.4.	Hibridación in situ Fluorescente (FISH) con sondas PNA

6.3.5.	FISH y reacción química dinámica <i>in situ</i>	235
6.3.6.	Tyramide Signal Amplification (TSA)	235
6.3.7.	RNA-FISH con sondas PNA. RNA-FISH con química dinámica in situ	236
6.3.8.	Ensayo de especificidad, sensibilidad y cuantificación de señales	237
6.4. Me	todología capítulo 4	237
6.4.1.	Síntesis de ADNc	237
6.4.2.	Sondas Padlock	238
6.4.3.	Curva de calibración mediante Rolling Circle Amplification (RCA)	238
6.4.4. virus del	Circle-To-Circle Amplification (C2CA). Curva de calibración. Análisis de AF Zika. Evaluación eficacia de fármacos antiflavivirales	₹N del 239
6.4.5.	Cuantificación de productos de amplificación por círculo rodante (RCPs)	240
Apéndices		241
Apéndice 5	i. Derechos y permisos	247
Referencias		251

Resumen

El diagnóstico molecular basado en ácidos nucleicos ha mostrado ser de vital importancia en la salud pública, especialmente en el diagnóstico de enfermedades como el cáncer o el diagnóstico de enfermedades infecciosas y control de epidemias. El desarrollo de sistemas que permitan detectar ácidos nucleicos y que confieran ciertas ventajas sobre los sistemas actualmente disponibles es de gran interés. Algunas de los retos actuales son desarrollar sistemas fácilmente aplicables y de reducido coste, evitando el uso de instrumentación compleja, sistemas que permitan análisis a nivel de célula única o sistemas que permitan la detección de ácidos nucleicos en formato portátil y en el punto de atención del paciente. Con el objeto de aportar nuevos enfoques y contribuir a algunos de estos retos, en esta tesis doctoral se exploran diferentes métodos para la detección de ácidos nucleicos: el marcaje por química dinámica (DCL, del inglés *"Dynamic Chemistry Labelling"*), la nanotecnología, la hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés *"Fluorescent in situ Hybridization"*) y el método de amplificación isotermal *Circle-To-Circle Amplification* (C2CA).

El marcaje por química dinámica es un método de lectura de ácidos nucleicos con el uso de sondas de ácidos nucleicos peptídicos (PNA, del inglés "Peptide Nucleic Acid"), que presentan un esqueleto peptídico modificado químicamente con una posición abásica frente a un nucleótido bajo estudio. En esta posición abásica se incorpora de forma específica una SMART-Nucleobase (nucleobase modificada químicamente) con marcaje y complementaria al nucleótido bajo estudio, por tanto, permitiendo la lectura de ácidos nucleicos con resolución de una sola base. En primer lugar, en esta tesis se ha integrado el marcaje por química dinámica junto con nanotecnología para capturar ácidos nucleicos en fluidos biológicos tales como plasma humano. Las nanopartículas de poliestireno destacan por su estabilidad en el medio biológico y por la capacidad de ser conjugadas con cargas de diferente naturaleza, lo que permite su uso en diferentes aplicaciones en biomedicina. Combinando ambas tecnologías los ácidos nucleicos son detectados con resolución de una sola base mediante citometría de flujo, una plataforma disponible y accesible en todos los laboratorios clínicos y de investigación. Con este enfoque se ha llevado a cabo el estudio de variaciones de nucleótido correspondientes a mutaciones puntuales en secuencias sintéticas que contienen el codón 12 de KRAS, un oncogén en el que la aparición de mutaciones puntuales provoca el desarrollo de procesos tumorales. Así mismo, se ha validado la versatilidad del método empleando como diana sintética el miR-122, un micro-ARN relacionado con el daño hepático.

En segundo lugar, en esta tesis se ha llevado a cabo la combinación del marcaje por química dinámica con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para la detección de ácidos nucleicos preservando su localización celular. Concretamente esta aplicación se ha llevado a cabo detectando la secuencia α-satélite humana *in situ* con resolución de una base en líneas celulares tumorales, abriendo la posibilidad de estudiar polimorfismos en secuencias repetidas difíciles de secuenciar. Además, se ha estudiado la sensibilidad y especificidad de la detección del nucleótido bajo estudio y se ha planteado como esta nueva aplicación podría ser utilizada para desarrollar Secuenciación por Química Dinámica *in situ* de ácidos nucleicos. Así mismo, se han llevado a cabo varias estrategias para la detección de mutaciones puntuales presentes en el ARN mensajero de KRAS *in situ* en líneas tumorales humanas. Sin embargo, el límite de detección y la existencia de señales inespecíficas han dificultado el desarrollo de esta aplicación, planteándose las futuras posibilidades para aplicar química dinámica en combinación con técnicas FISH como herramienta de diagnóstico de mutaciones presentes en ARN mensajero de oncogenes *in situ*.

Finalmente, en esta tesis se ha aplicado el método isotermal de amplificación de ácidos nucleicos *Circle-To-Circle Amplification (C2CA)* para detectar ARN viral del virus del Zika, causante de la fiebre del Zika y varios brotes epidemiológicos. C2CA es un método basado en varias rondas de amplificación *Rolling Circle Amplification (RCA)* con el uso de sondas *Padlock* que permite la detección de cantidades mínimas de ácidos nucleicos y facilita su implementación en sistemas de microfluídica y portátiles de detección. En esta tesis se establecen los límites de detección de RCA y C2CA para detectar secuencias sintéticas correspondientes a ADN complementario del virus del Zika, se analiza la capacidad de un set de sondas *Padlock* para detectar el virus del Zika en células sanguíneas periféricas mononucleares infectadas y se realiza un ensayo para evaluar la eficacia de dos fármacos anti-flavivirales.

En definitiva, en esta tesis doctoral se aplican métodos y técnicas de detección de ácidos nucleicos alternativas al *gold-standard* de análisis de ácidos nucleicos, la RT-qPCR, con el objeto de aportar nuevos enfoques y mejoras en la detección de ácidos nucleicos y con el objetivo final de contribuir al diagnóstico molecular.

Abstract

Nucleic acid-based molecular diagnosis has gained special importance in public health, especially in the diagnosis of diseases such as cancer, or in the diagnosis of infectious diseases and control of epidemic outbreaks. The development of systems that allow the detection of nucleic acids and that confer certain advantages over those currently existing is of great interest. Some of the current challenges are to develop easily applicable systems that avoid the use of complex instrumentation, low-cost assays, specific assays that allow analysis at single-cell level, or assays that are applicable to portable nucleic acid detection systems. In order to provide new approaches and contribute to some of these challenges, this doctoral thesis explores different methods for the detection of nucleic acids: dynamic chemistry labeling (DCL), nanotechnology, Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) and Circle-To-Circle Amplification (C2CA) isothermal amplification method.

Dynamic Chemistry Labeling (DCL) allows the reading of nucleic acids using peptide nucleic acid (PNA) probes with a chemically modified backbone that contains an abasic position in front of the nucleotide under study. In this abasic position, a SMART-Nucleobase (chemically modified nucleobase) with different labelling and complementary to the nucleotide under study, is specifically incorporated, therefore, allowing the reading of nucleic acids with single-base resolution. First, DCL has been combined with nanotechnology to capture nucleic acids in solution in human plasma. Polystyrene nanoparticles outstand for their stability among biological media and their capacity to be conjugated with cargoes of different nature, taking part in multiple applications in biomedicine. Combining both technologies, nucleic acids are detected with one-base resolution by flow cytometry, a platform available and accessible in all clinical and research laboratories. With this approach, we studied the detection of nucleotide variations corresponding to point mutations in synthetic sequences that contain the codon 12 of KRAS, an oncogene in which the appearance of point mutations leads to the development of tumorigenesis. In addition, we also studied the detection of a synthetic sequence corresponding to miR-122, a microRNA associated with liver damage.

Secondly, in this thesis DCL is combined with the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique for the detection of nucleic acids while preserving its cellular location. Specifically, this application was carried out for detecting the human α -satellite sequence *in situ* with single-base resolution in human tumor cell lines, opening the possibility of studying polymorphisms in repeated sequences.

23

In addition, the sensitivity and specificity has been studied and it has been proposed how this new application could be used to develop *in situ* Dynamic Chemistry Sequencing of nucleic acids.

Next, several strategies were tested for the detection of point mutations present in KRAS messenger RNA *in situ* in human tumor cell lines. However, the detection limit and the existence of nonspecific signals in the biotin-streptavidin detection system prevented such detection, raising a discussion about the possibilities of applying dynamic chemistry in combination with FISH techniques as a diagnostic tool for mutations present in messenger RNA of oncogenes *in situ*.

Finally, in this thesis the isothermal method of amplification of nucleic acids Circle-To-Circle Amplification (C2CA) is validated for the detection of viral RNA. C2CA is a precise method based on several rounds of Rolling Circle Amplification (RCA) using Padlock probes that allow the detection of minimal amounts of nucleic acid and facilitates its implementation with microfluidic and portable detection systems. In this thesis, the detection limits of RCA and C2CA were established to detect synthetic sequences corresponding to Zika virus complementary DNA, and an assay was carried out to validate both the capacity of a set of probes to detect the virus, and the efficacy of two anti-flaviviral drugs in samples of infected peripheral blood mononuclear cells.

In short, this doctoral thesis applies different methods and techniques for the detection of nucleic acids alternative to the gold-standard for nucleic acid analysis, RT-qPCR, in order to provide new approaches and improvements in the detection of nucleic acids, and with the ultimate goal of contributing to molecular diagnostics.

Objetivos

Objetivo 1. Combinar nanopartículas de poliestireno bifuncionalizadas (Strep-FAM-NPs (13)) con marcaje por química dinámica (DCL) para capturar y detectar secuencias de KRAS y miR-122 con resolución de una base mediante citometría de flujo.

1.1. Preparar y caracterizar de las Strep-FAM-NPs (13).

1.2. Diseñar sondas PNA y DGL para detección de KRAS y miR-122.

1.3. Validar la capacidad de las Strep-FAM-NPs (**13**) para capturar heterodúplex PNA:DNA y productos DCL en solución, detectando las dianas sintéticas KRAS y miR-122 con resolución de una base mediante citometría de flujo.

1.4. Capturar secuencias KRAS en plasma humano, establecimiento una curva de calibración y límite de detección (LoD) de la técnica.

1.5. Discriminar desajustes en la secuencia correspondientes a la mutación KRAS G12C.

Objetivo 2. Aplicar el marcaje por química dinámica junto con Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) para detectar secuencias génicas con resolución de una base y detectar mutaciones puntuales en ARN mensajero preservando su localización celular.

2.1. Diseñar sondas PNA y sondas DGL para detección de secuencias α -satélite mediante FISH. Validar métodos directos e indirectos de detección de secuencias α -satélite y ARN mensajero mediante sondas PNA en líneas celulares tumorales.

2.2. Optimizar el marcaje por química dinámica *in situ* para la detección de secuencias α -satélite humanas con resolución de una base mediante sondas DGL y FISH en líneas celulares.

2.3. Establecer la sensibilidad y especificidad de incorporación de SMART-Nucleobases biotiniladas. Cuantificar de señales, analizar la eficiencia de detección y realizar un análisis cariotípico comparativo de las señales.

2.4. Desarrollar estrategias para detección de ARN mensajero de KRAS mediante sondas PNA y co-localización de señales. 2.5. Aplicar el marcaje por química dinámica *in situ* para detectar mutaciones puntuales presentes en ARN mensajero de KRAS en líneas celulares tumorales.

Objetivo 3. Aplicar el método de amplificación isotermal *Circle-To-Circle* para detección de ARN del virus del Zika, establecer de LoD de la técnica y realizar una evaluación preliminar de la eficacia de fármacos anti-flavivirales.

3.1. Validar el protocolo de detección de secuencias sintéticas correspondientes al ADN complementario del virus del Zika mediante 1RCA y C2CA.

3.2. Establecer una curva de calibración 1RCA y C2CA para detección de la región codificante de la proteína C del virus del Zika. Establecer el límite de detección (LoD) de 1RCA y C2CA.

3.3. Aplicar C2CA para el análisis por microscopía para detectar el virus del Zika. Realizar una evaluación de la eficacia de fármacos anti-flavivirales mediante C2CA y realizar una comparación con el *gold-standard* RT-qPCR.

3.4. Analizar sistemas alternativos para detección de secuencias virales mediante 1RCA y C2CA.

Objectives

Objective 1. To combine bifunctionalized polystyrene nanoparticles (Strep-FAM-NPs (13)) with dynamic chemistry labeling (DLC) in order to capture and detect KRAS and miR-122 sequences with one-base resolution by flow cytometry.

1.1. Preparation and characterization of the Strep-FAM-NPs (13).

1.2. Design of the PNA and DGL probes for the detection of KRAS and miR-122.

1.3. Validation of the capability of Strep-FAM-NPs (**13**) to capture PNA:DNA heteroduplex and DCL products, detecting KRAS and miR-122 synthetic targets with one-base resolution by flow cytometry.

1.3. Capture of KRAS sequences in human plasma, establishing a calibration curve and determining the limit of detection (LoD) of the technique.

1.4. Discrimination of mismatches corresponding to KRAS G12C in human plasma.

Objective 2. Application of DCL together with Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) for the detection of gene sequences with one-base resolution, and the detection of point mutations in messenger RNA while preserving its cellular location.

2.1. Design of PNA probes and DGL probes for the detection of α -satellite sequences by FISH. Validation of direct and indirect methods of detection of α -satellite sequences and messenger RNA using PNA probes in tumor cell lines.

2.2. In situ dynamic chemistry labeling optimization for the detection of human α -satellite sequences with one-base resolution with DGL probes by FISH in tumor cell lines.

2.3. Determination of the sensitivity and specificity of the incorporation of biotinylated SMART-Nucleobases. Quantification of signals and detection efficiency. Performance of a comparative karyotypic analysis of signals.

2.4. Development of strategies for the detection of KRAS messenger RNA using PNA probes and signal co-localization.

2.5. Application of *in situ* DLC to detect point mutations present in KRAS messenger RNA in tumor cell lines.

Objective 3. Application of Circle-To-Circle isothermal amplification method for detection of Zika virus RNA, determination of LoD and evaluation of the efficacy of anti-flaviviral drugs.

3.1. Validation of the detection protocol of synthetic sequences corresponding to the Zika virus complementary DNA using 1RCA and C2CA.

3.2. Establishment of 1RCA and C2CA calibration curve for the detection of the coding region of Zika virus protein C. Determination of the limit of detection (LoD) of 1RCA and C2CA.

3.3. Application of C2CA and analysis by microscopy for the detection of the Zika virus. Preliminary evaluation of the efficacy of anti-flaviviral drugs and gold-standard RT-qPCR comparison.

3.4. Analysis of alternative systems for the detection of viral sequences by 1RCA and C2CA.

Abreviaciones

ADNc	ADN complementario
aM	Attomolar
ARNr	ARN ribosómico
ARNsi	ARN interferente pequeño
ARNt	ARN transferente
C2CA	Circle-To-Circle Amplification
Cglu/Gglu/Aglu/Tglu	glu = nucleobase que contiene una cadena lateral de ácido propanóico en la posición gamma.
CISH	Chromogenic In Situ Hybridization
СО	Oligonucleótido de captura
CRC	Cáncer colorectal
DCL	Dynamic Chemical Labelling
Dde	Etil 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)
DILI	Drug-Induced Liver Injury
DLS	Dynamic Light Scattering
dNTPs	Desoxynucleotidos trifosfato
DO	Oligonucleótido de detección
DVB	Divinilbenceno
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FAM	5(6)-carboxifluoresceína
FDA	Food and Drug Administration of United States
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FISSEQ	Fluorescent in situ sequencing
fM	Fentomolar
Fmoc	9H-fluoren-9-il-metoxicarbonilo
GFP	Green Fluorescent Protein
HDA	Helcase-Dependent Amplification
HOR	High Order Repeat
HRCA	Hyperbranched RCA
HRP	Horseradish Peroxidase
HT-Q-FISH	high throughput Q-FISH
ISH	In Situ Hybridization
IVTA	In Vitro Transcription Amplification
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LNA	Locked Nucleic Acid
Lnc-ARNs	ARNs largos no codificantes

LoD	Limit of Detection
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight
MDA	Multidisplacement Amplification
MFI	Median Intensity Fluorescence
mM	Milimolar
NAAT	Nucleic Acid Amplification Testing
NASBA	Nucleic Acid Sequence-Based Amplification
NAT	Nucleic Acid Testing
NDV	Virulent Newcastle Disease
NGS	Next-Generation Sequencing
nM	Nanomolar
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PDI	Polydispersity Index
PLP	Padlock probe
рМ	Picomolar
PNA	Peptide Nucleic Acid
POC	Point Of Care
PS-NPs	Polyestirene Nanoparticles
Q-FISH	Quantitative FISH
RCA	Rolling Circle Amplification
RCR	Rolling Circle Replication
RO	Renstriction oligo
RPA	Recombinase Polymerase Amplification
RT-qPCR	Real-Time Quantitative PCR
SA	SMART-A
SA-PE	Streptavidin-R-ficoeritrina
SC	SMART-C
scRNA-seq	single-cell RNA sequencing
SDA	Strand-Displacement Amplification
SEM	scanning electron microscopy
SG	SMART-G
SHERLOCK	Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing
SINEs	Short Interdispersed
SKY-FISH	Spectral Kariotyping Fluorescence In Situ Hybridization
SMART-A-Biotina	SMART-Adenina-Deaza-PEG ₁₂ -Biotin

SMART-C-Biotina	SMART-Citosina-PEG ₁₂ -Biotin SMART-Citosina-Rex-PEG ₁₂ -biotina
SMART-G	SMART-Guanina-deaza-enol-PEG ₁₂ -biotina
SMART-T	SMART-Timina-Rex-PEG ₁₂ -biotina
SMLM	Single-Molecule Localization Microscopy
smRNA-FISH	Single molecule RNA FISH
SNF	Single Nucleotide Fingerprint
SNP	Single Nucleotide Polimorphisim
SNV	Single Nucleotide Variations
SPPS	Solid-Phase Peptide Synthesis
ssDNA	Single-strand DNA
ST	SMART-T
Strep	Estreptavidina
TEM	transmisión electron microscopy
Tm	Melting Temperature
ТМА	Transcription Mediated Amplification
TSA	Tyramide Signal Amplification
WGA	Whole Genome Amplification
WTS	Whole Transcriptome Sequencing
xx	Mini-PEG
YFP	Yellow Fluorescent Protein

*Las siglas ADN y ARN se han mantenido en español, sin embargo, cuando estas palabras aparecen como parte de una abreviatura o técnica reconocida en inglés, se mantiene como DNA o RNA (por ejemplo, RNA-seq, scRNA-seq, RNA-FISH o ssDNA).



Introducción general: Ácidos nucleicos en diagnóstico molecular. Tecnologías de detección de ácidos nucleicos. Marcaje por Química Dinámica (DCL)

Capítulo 1. Introducción general: Ácidos nucleicos en diagnóstico molecular. Tecnologías de detección de ácidos nucleicos. Marcaje por química dinámica (DCL)

1.1. Importancia de los ácidos nucleicos en el diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular comprende aquellas pruebas realizadas para identificar una enfermedad a través del estudio de moléculas como marcadores presentes en una muestra biológica. Estos marcadores pueden ser genéticos (ácidos nucleicos -ADN o ARN-, o bien proteínas [1]. Las técnicas de diagnóstico basadas en la detección de ácidos nucleicos destacan especialmente debido al amplio (y en constante crecimiento) conocimiento genético de las enfermedades y debido a la especificidad, sensibilidad y reproducibilidad que caracteriza a estas técnicas [2]. El diagnóstico y tecnologías basadas en ácidos nucleicos ha permitido abordar importantes retos en la salud pública global, como son el diagnóstico del cáncer, tratamiento personalizado del cáncer, el diagnóstico de enfermedades infecciosas o el control de brotes epidemiológicos [3,4]. La técnica gold-standard para analizar la expresión genética o la detección de ADN o ARN patógeno es la RT-qPCR debido a su sensibilidad y especificidad, si bien otras técnicas son utilizadas dependiendo del objetivo, como son las técnicas de amplificación isotermal, las técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS, del inglés "Next-Generation Sequencing"), técnicas de hibridación in situ (ISH, del inglés "In Situ Hybridization"), microarrays de ADN, detección de SNPs, o el uso de análogos de ácidos nucleicos, como ácidos nucleicos peptídicos (PNAS, del inglés "Peptide Nucleic Acids") o ácidos nucleicos bloqueados (LNAs, del inglés "Locked Nucleic Acids") [2].

La investigación en diagnóstico molecular y tecnologías de ADN tienen un importante impacto en la práctica médica. Las investigaciones actuales tratan de mejorar la tecnología basada en ADN de modo que sean accesibles, fáciles de usar, interpretar y que orienten la medicina personalizada y de precisión como estándar para una mejor atención médica futura [5]. Además, el diagnóstico molecular cuenta con un amplio mercado en constante crecimiento, empujado principalmente por la necesidad de realizar diagnóstico temprano de enfermedades infecciosas y empujado por el aumento en la prevalencia de pacientes afectados por cáncer, la aceptación de la medicina personalizada, así como por el alto crecimiento del mercado en países emergentes [1,6,7].

1.1.1. Detección de marcadores genéticos asociados a cáncer

El cáncer es una enfermedad en la que interactúan factores genéticos, ambientales y de hábitos de vida que pueden desembocar en el desarrollo de un tumor maligno. En el tumor maligno, las células comienzan a dividirse sin control causando daños en los tejidos cercanos y eventualmente pueden diseminar hacia otros tejidos distintos dando lugar a la metástasis. Los tumores aparecen por combinaciones de factores genéticos y exposición a factores de riesgo ambientales. Una pequeña porción (en torno al 5 %) de los tumores tiene carácter hereditario como consecuencia de mutaciones germinales que se transmiten entre los miembros de la familia [8].

El diagnóstico del cáncer se realiza principalmente a través de pruebas de laboratorio o pruebas de imagen, o por combinación de ambas. Las pruebas de laboratorio consisten en la detección de marcadores en una muestra de tejido tumoral o bien fluidos biológicos (como sangre, plasma u orina) que revelan marcadores asociados al cáncer [9]. Entre los test de laboratorio que se realizan para el diagnóstico y durante el tratamiento incluyen analíticas de sangre, contaje linfocitario, análisis histopatológicos y detección de mutaciones genéticas. El diagnóstico molecular permite detectar y clasificar el tumor como tumor primario, nódulo o tumor metastásico, así como identificar el estadio en el que se encuentra.

Todos los procesos tumorales tienen su origen en la aparición de mutaciones genéticas, que son variaciones en la secuencia de nucleótidos u organización del ADN que pueden tener efectos beneficiosos, neutrales o nocivos (como es el caso de la aparición de un tumor). Las mutaciones pueden dividirse en genómicas (cuando afecta al juego cromosómico de una célula), cromosómicas (cuando afecta a una región cromosómica, como son reordenamientos, translocaciones, inserciones o deleciones) o puntuales (afecta a un solo nucleótido pudiendo alterar o no el marco de lectura de dicha secuencia). También existen mutaciones en la composición química del ADN, llamadas mutaciones epigenéticas [10]. Dependiendo del tipo de mutación, existen numerosos métodos y kits validados para su detección (en la siguiente referencia se incluye una lista de kits aprobados por la FDA (The United States Food and Drug Administration) para detectar mutaciones genéticas [11]). Las mutaciones genómicas o cromosómicas son detectadas generalmente mediante kits basados en técnicas ISH. Las mutaciones que afectan a un número reducido de nucleótidos, mutaciones puntuales o SNPs son estudiados mediante técnicas basadas en RT-qPCR, en combinación con diferentes tipos de química y sondas de detección, dependiendo de la frecuencia de mutación (Tabla 1), mediante técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS) o mediante microarrays de ADN [12].
Tabla 1. Diferentes técnicas de detección de mutaciones puntuales presentes en oncogenes.Adaptadode la referencia [13] con permiso de Elsevier.

Técnicas disponibles	Sensibilidad (% ADN mutado)	Características
Secuenciación directa:		
Método Sánger	25 %	-Requiere mayor cantidad de ADN mutado para su detección
Pirosecuenciación	5 – 10 %	-Detecta cualquier mutación -Equipamiento especial: pirosecuenciador
PCR cuantitativa en tiempo real:		
Sondas TaqMan	10 %	-Detección de mutaciones específicas
Scorpions ARMS	1 %	-Requiere un termociclador en tiempo real
Técnicas de enriquecimiento del alelo mutado:		
PNA-LNA PCR clamp	1 - 0.1 %	-Se precisan sondas PNA o LNA que no son comerciales
COLD-PCR	1-0.1 %	-Amplia experiencia en biología molecular -Sólo detecta mutaciones específicas
PCR-RLFP (análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción)	5 %	-Sólo detecta mutaciones que generan lugar de restricción
dHPLC (Denaturing High- Performance Liquid Chromatografy)	5 %	-Detecta cualquier mutación. -Instrumentación: HPLC -Requiere experiencia en HPLC
HRM (High Resolution Melting)	1 %	-Requiere experiencia en biología molecular -Requiere equipamiento especial

Por otro lado, los marcadores genéticos pueden utilizarse para tener información individual del estado mutacional de genes claves en determinados cánceres y guiar la aplicación de una terapia concreta [5]. Un ejemplo lo constituyen los fármacos trastuzumab y cetuximab que están indicados en pacientes de cáncer de mama con mutaciones de sobre-expresión en el oncogén HER2 y en pacientes de cáncer colorectal con mutaciones en el oncogén KRAS y sobreexpresión del oncogén EGFR.

1.1.2. Detección de micro-ARNs

Los micro-ARNs son pequeños ARNs no codificantes de 21-25 nucleótidos que generalmente inhiben la traducción de ARN mensajero (ARNm) guiando la unión de proteínas argonauta (AGO) a regiones 3' UTR de los ARNm. Un único microARN puede asociarse a cientos de ARNm y un ARNm puede estar regulado por numerosos microARNs. A través de este silenciamiento génico los microARNs participan en la regulación de la expresión génica y por tanto cumplen importantes funciones en distintos procesos biológicos de mamíferos, como son el desarrollo embrionario, diversas funciones fisiológicas, funciones en el sistema inmune o en el metabolismo [14,15].

La desregulación de los microARNs puede afectar en estos procesos biológicos, causando patologías, incluida la iniciación de un tumor, su progresión o la aparición de metástasis. Los mecanismos que pueden llevar a cabo la desregulación de los microARNs son numerosos, por ejemplo, la expresión anormal de microARNs en células tumorales comparadas con células sanas normalmente se asocia a alteraciones en la secuencia debido a mutaciones o en el número de copias de genes que codifican microARNs, así como alteraciones de localizaciones génicas (amplificaciones, deleciones o translocaciones de genes codificantes de microARNs).

Debido a la corta longitud de los microARNs y la carencia de cola poli-A en estos, se analizan por métodos específicos de RT-qPCR. Los microARNs son extraídos del material biológico, retrotranscritos con el uso de sondas que forman horquillas y actúan como primer de la retrotranscripción, se añaden adaptadores, son amplificados mediante PCR, y finalmente detectados usando sondas TaqMan. Otra estrategia eficaz en la detección de microARNs incluye el uso de sondas LNA, que destacan por su alta afinidad por la diana, permitiendo iniciar una transcripción inversa, que, tras la adición de adaptadores, se realiza la amplificación por PCR y la detección mediante sondas TaqMan [16]. Las sondas LNA han mostrado ser muy eficaces en la detección de microARNs [17,18].

1.1.3. Nucleic Acid Testing (NAT) de enfermedades infecciosas

El término Nucleic Acid Testing (NAT) en enfermedades infecciosas hace referencia al análisis de ácidos nucleicos de organismos patógenos (virus, bacterias u hongos) en una muestra biológica para diagnosticar una determinada enfermedad [19]. Las pruebas principales para diagnosticar este tipo de enfermedades son inmunoensayos basados en la especificidad de unión antígenoanticuerpo (o interacciones análogas de proteínas) y en pruebas NAT, basadas en la detección de ácidos nucleicos. La elección del tipo de ensayo dependerá de las circunstancias en el diagnóstico, por ejemplo, los inmunoensayos son rápidos y permiten conocer si existen anticuerpos frente a un patógeno en pacientes que han cursado la enfermedad, mientras que las pruebas NAT son muy sensibles y específicas y permiten saber si el paciente está infectado con el patógeno en el momento en que se realiza la prueba [20].

Las pruebas basadas en NAT tienen la ventaja frente a los inmunoensayos de poder amplificar secuencias específicas generando una sensibilidad de detección muy superior y específica. Por ello permiten detectar cantidades mínimas de patógenos presentes en la sangre de pacientes manteniendo una alta especificidad. Además, son capaces de detectar ADN o ARN de varios patógenos simultáneamente (término conocido como *multiplexing*), monitorizar la carga viral, detectar la resistencia de bacterias o genotipar el patógeno. Para realizar una prueba NAT las muestras biológicas deben ser procesadas para la extracción de ácidos nucleicos y, en algunos casos, llevar a cabo la amplificación del material genético. Cuando se introduce esta amplificación, la técnica se conoce como NAAT (del inglés "*Nucleic Acid Amplification Testing*"), y si el método de amplificación es isotermal se conoce como INAAT (del inglés "*Isothermal Nucleic Acid Amplification Testing*") [21,22].

Aunque numerosas pruebas para detectar patógenos están basadas en PCR, esta técnica no está exenta de limitaciones. La PCR requiere altas temperaturas, cambios de temperatura precisos (con una variación de en torno a 1 grado) y rápidos (> 5 °C / s) que dificultan su implementación en sistemas portátiles y no son óptimos para el diagnóstico en el punto de atención (POC, del inglés *"Point-Of-Care"*) del paciente. Las altas temperaturas (hasta 95 °C) requeridas en la PCR son difíciles de implementar en diseños para análisis basados en chips. Por ejemplo, durante el primer brote de la pandemia COVID19, el uso, casi exclusivo, de técnicas basadas en PCR para identificar el virus SARS-Cov2 generó problemas de abastecimiento, así como la necesidad de trabajar exclusivamente con moléculas de ARN aisladas [23,24]. Una de las alternativas a la PCR son los métodos de amplificación isotermal, utilizados en pruebas NAT para diagnosticar enfermedades causadas por patógenos, debido a que su temperatura constante de reacción y sensibilidad facilita su acoplamiento con sistemas de microfluídica y el diseño de kits de bajo costo [19].

1.2. Tecnologías de amplificación, hibridación y detección de ácidos nucleicos

Las secuencias de ácidos nucleicos específicas son detectadas mediante el uso de sondas complementarias que hibridan con dicha diana o bien intercalantes que permiten detectar estos ácidos nucleicos. Las sondas utilizadas presentan diferentes tipos de marcajes, como isótopos radiactivos, marcajes fluorescentes o biomoléculas como biotina para ser reconocida por complejos marcados con estreptavidina. Los ensayos de hibridación pueden tener lugar en fase solución o en fase sólida, dependiendo de la aplicación de cada tecnología [25].

En la mayoría de casos se lleva a cabo una etapa de amplificación. Esta etapa puede ser una amplificación de la diana o una amplificación de la señal post-hibridación de la diana. La amplificación de la diana se puede llevar a cabo mediante métodos basados en RT-qPCR o bien métodos isotermales mientras que la amplificación de la señal post-hibridación se lleva a cabo mediante métodos basados en inmunoensayos que amplifican la señal detectada o bien mediante enzimas que depositan marcadores en el entorno de la diana.

1.2.1. Química de detección de RT-qPCR

La técnica *gold-standard* para el análisis de ácidos nucleicos es la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR por sus siglas en inglés *"Real-Time quantitative PCR"*), debido a su alta especificidad, sensibilidad y reproducibilidad. Fue introducida en 1992 por Higuchi y sus colaboradores y permite cuantificar casi cualquier secuencia presente en una muestra biológica compleja, debido a la alta eficacia de las diferentes químicas de detección e instrumentos altamente sensibles disponibles [26].

En la fase exponencial de la RT-qPCR existen varias estrategias de detección dependiendo del objetivo del ensayo realizado. Una de las estrategias más frecuentes consiste en usar **intercalantes de ADN**, como pueden ser **SYBR Green** o **SYBR Gold**, que emiten fluorescencia cuando se unen al surco menor del ADN bicatenario. Aunque el uso de intercalantes es un método flexible, tiene como desventaja que se une inespecíficamente a cualquier ADN bicatenario que se acumule tras la reacción, incluyendo productos no específicos y dímeros de *primers*. Por tanto, en el ensayo no pueden detectarse varias dianas a la vez (*multiplexing*) y debe de optimizarse individualmente para detectar cada producto que se está amplificando a través de temperaturas de disociación (*melting curves*). Otra estrategia es el uso de **sondas específicas de hibridación (Figura 1**), oligonucleótidos marcados con fluorescencia que se unen específicamente a la secuencia que se va a amplificar. Con estas sondas el ensayo es muy

específico y se evita la detección de productos amplificados inespecíficos, además, permite realizar *multiplexing*, si bien su desventaja es que el ensayo se encarece [27].



Figura 1. Esquema de alguna de las principales sondas de hibridación específicas utilizadas en la detección de la RT-qPCR. Adaptado de la referencia [28] con permiso de Elsevier.

Las sondas TaqMan o sondas de hidrólisis presentan un fluoróforo en el extremo 5' y un quencher (molécula que evita la emisión de fluorescencia del fluróforo) en el extremo 3'. Cuando la sonda no hibrida su diana, fluoróforo y quencher permanecen cercanos, bloqueándose la emisión de fluorescencia. Cuando la sonda TaqMan se une a su diana, la actividad de la ADN polimerasa hidroliza la sonda, liberándose el fluoróforo y el quencher y por tanto emitiéndose una fluorescencia detectable (Figura 1A). Las sondas Scorpion forman una horquilla en el extremo 5' que contiene la secuencia específica y el quencher, mientras que el extremo 3' contiene la secuencia primer. La extensión de la ADN polimerasa cambia la conformación de la horquilla liberando el fluoróforo (Figura 1B). Las sondas FRET usan dos sondas con un fluoróforo donador y otro aceptor de modo que al unirse a su secuencia diana de forma contigua, se produce una transferencia de energía que aumenta la fluorescencia (Figura 1C). En las sondas *molecular beacons* una horquilla mantiene unidos el fluoróforo y el *quencher*. Cuando la sonda se une a su diana específica, la horquilla se abre y, alejándose ambos y por tanto emitiéndose fluorescencia (**Figura 1D**) [28].

1.2.2. Métodos de amplificación isotermal

Los métodos de amplificación isotermal de ácidos nucleicos incluyen aquellos en los que se producen copias de un ácido nucleico diana a una temperatura constante y de forma rápida. En contraste con las técnicas basadas en PCR, no se requieren ciclos de temperatura complejos para llevar a cabo la desnaturalización, anillamiento y subsecuente extensión. Esta característica hace compatible este tipo de amplificación con sistemas de microfluídica y portátiles que facilitan el diagnóstico en el POC del paciente. Además, la temperatura constante facilita la reacción en células, de modo que son utilizadas en técnicas ISH y de bioimagen [29,30].

1.2.2.1. Amplificación isotermal de ARN: Transcription-Mediated Amplification (TMA) y Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)

En ambas técnicas la diana es ARN y se utiliza un *primer* para iniciar la retrotranscripción. El primer contiene una secuencia promotora de la ARN polimerasa T7. Tras la retrotranscripción se forma un híbrido ARN:ADN que es degradado utilizando una ARNasa exógena en el caso de NASBA o bien por la actividad ARNasa H interna de la retrotranscriptasa en el caso de TMA. A continuación, la cadena de ADN es hibridada con un nuevo primer, que inicia la síntesis de una doble cadena de ADN por la retrotranscriptasa. Esta doble cadena de ADN es utilizada por la enzima ARN polimerasa T7 para iniciar la transcripción, lo que se traduce en la formación exponencial de réplicas de ARN (**Figura 2**) [31].

Gen-Probe (San Diego, Ca) tiene varios ensayos TMA combinados con sondas *molecular beacons* para detectar bacterias como *Listeria*, *Salmonella* y *Campylobacter* en alimentos. Se han desarrollado kits de diagnóstico basados en NASBA para la detección de virus, como rotavirus, norovirus, astrovirus o enterovirus y la compañía Organon Teknika ha comercializado varios kits de detección de bacterias como *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* entre otras. Otros kits basados en TMA y NASBA han sido desarrollados para detección de diferentes patógenos y virus [32].



Figura 2. Esquema Transcription-Mediated Amplification (TMA). El ARN diana es hibridado con un primer que contiene una región promotora de la ARN polimerasa T7. Una enzima transcriptasa inversa sintetiza una cadena de ADN complementaria, tras lo cual la actividad ARNasa H degrada la cadena de ARN de partida. Un nuevo primer permite formar una doble cadena ADN que contiene la región promotora de la ARN polimerasa T7. Esta enzima reconoce dicha región promotora llevando a cabo formación de copias de ARN que pueden ser nuevamente retrotranscritas, lo que se traduce en una amplificación exponencial. Reproducido de la referencia [31].

1.2.2.2. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

La amplificación mediada por bucle (LAMP, del inglés *"Loop-mediated isothermal amplification"* (LAMP) utiliza de 4 a 6 primers que reconocen 6-8 regiones de ADN bicatenario diana. Una ADN polimerasa con alta capacidad de desplazamiento de cadena inicia la síntesis desplazando una de las hebras. A continuación, se utiliza un nuevo primer para iniciar la síntesis y desplazar la hebra recién sintetizada, que formará un bucle al contener secuencias complementarias

contenidas en el primer. Esta hebra en buble es hibridada con un nuevo primer que sintetiza una nueva hebra que forma la estructura LAMP en mancuerna. Ahora, utilizando un nuevo par de primer se pueden suceder varias amplificaciones formando concatámeros de estas estructuras (**Figura 3**) [31,33,34]. El producto de ADN formado es de gran longitud (más de 20 kilobases) y contiene miles de repeticiones que facilita su detección con sondas marcadas con fluoróforos o biomoléculas. Los productos formados de LAMP también pueden detectarse con otras estrategias, como el uso de intercalantes o mediante ensayos de flujo lateral.



Figura 3. Esquema Loop-Mediated isothermal Amplification (LAMP). El uso de un par de primers permite la síntesis de una hebra desplazando una de las hebras originales de la doble cadena de ADN diana. El uso de un nuevo par de primer permite formar la estructura LAMP en mancuerna (B5). A partir de esta, combinaciones diferentes de primers permiten llevar a cabo varias rondas de amplificación, formando concatámeros que son fácilmente detectables con diferentes estrategias. Reproducido de la referencia [31].

La compañía Eiken Chemical (Tokyo, Japan) ha desarrollado kits de detección de patógenos en alimentos o en el medioambiente mediante LAMP, concretamente para detectar *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Legionella*, *Giardia* y *Cryptosporodium*. También ha sido implementada en Illumigene (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, USA) para el diagnóstico de *Clostridium difficile*, *Mycoplasma pneymonia* y *Streptococcus*. Amplex Biosystems también han desarrollado kits de detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas. Todos estos kits pueden ser llevados a cabo entre 15 a 30 minutos [32].

1.2.2.3. Helicase-Dependent Amplification (HDA)

La amplificación dependiente de helicasa se basa en la capacidad de esta enzima para desenrollar la doble cadena de ADN. Una vez separada, se unen proteínas de unión a ADN monocatenario (proteínas SSB). A continuación, el uso de un par de *primers* permite su extensión mediante la ADN polimerasa [35] (**Figura 4**). HDA se ha empleado en varios dispositivos de diagnóstico y pruebas aprobadas por la FDA. BioHelix (Beverly, MA, USA), desarrolladores de HDA, han comercializado diversos kits para la detección de *Staphilococcus aureus*, HIV-1 o herpexvirus. También se han desarrollado HDA/microarrays para la detección de *Neisseria gonorrhoeae* así como para SARS-coronavirus con posibilidad de *multiplexing* [32].



Figura 4. Esquema Helicase-Dependent Amplification (HDA). La enzima helicasa desenrolla la cadena de doble hélice de ADN. Una vez separada, las proteínas de unión a ADN monocatenario (SSB) evitan la rehibridación de las hebras. El uso de un par de primers permite la extensión por la ADN polimerasa. Reproducido de la referencia [29].

1.2.2.4. Strand displacement Amplification (SDA) y Multidisplacement Amplification (MDA)

Strand Displacement Amplification (SDA) se basa en el uso de dos *primers* que hibridan en una misma diana, uno de ellos con una secuencia de restricción. A continuación, la ADN polimerasa (típicamente ADN polimerasa Bst, fragmento grande o fragmento Klenow (3'-5 'exo--)) extiende ambos *primers*, desplazando la cadena sintetizada con la secuencia de restricción. La actividad de enzimas exonucleasas generan una mella en la cadena que permite que ocurra una nueva extensión por la ADN polimerasa desplazando el resto de cadena. Esto ocurre repetidas veces, generando una amplificación exponencial de la diana [36]. BD Diagnostics tiene comercializados kits de detección de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* y se han desarrollado kits integrados a sistemas de detección automáticos [32].

Multidisplacement amplification (MDA) se inicia con el uso de *random primers* hexámeros que hibridan a lo largo del ADN diana, generalmente ADN genómico. A continuación, una enzima con alta actividad de desplazamiento como la enzima phi29 o Bst lleva a cabo la extensión a partir de estos *primers* iniciadores, desplazando la cadena en síntesis más próxima. En la cadena desplazada hibridan nuevos *random primers* hexámeros que inician una nueva síntesis, desplazando la cadena próxima y continuando el ciclo (**Figura 5**). Esto genera una amplificación exponencial que genera productos de reacción extremadamente largos (más de 30 kb) y altamente ramificados a través del mecanismo de desplazamiento múltiple, pudiendo ser detectados mediante diferentes estrategias [37].



Figura 5. Esquema Multidisplacement Amplification (MDA). El uso de random primers hexámeros hibridan a lo largo del ADN genómico. Una enzima ADN polimerasa con alta capacidad de desplazamiento inicia la síntesis desplazando las cadenas adyacentes, a las que se unen nuevos random primers hexámeros y continúan el ciclo de amplificación, generando productos de gran longitud (hasta 30 kb).

MDA es una técnica utilizada en *Whole Genome Amplification (WGA)*. WGA incluye aquellos métodos de amplificación de todo el genoma (generalmente basados en PCR o en MDA) para producir, indiscriminadamente, copias de todo el genoma que faciliten su posterior análisis. Es una técnica que permite analizar muestras con una cantidad de ADN limitada [36,38].

1.2.2.5. Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

En la técnica *Recombinase Polymerase Amplification (RPA)* se utilizan tres enzimas: una enzima recombinasa, una enzima ADN polimerasa con capacidad de desplazamiento de hebra y proteínas de unión a ADN monocatenario (SSB). En primer lugar, la enzima recombinasa abre la doble cadena y anilla *primers* con una secuencia homóloga a una de las hebras del dúplex. Las proteínas SSB evitan que estas hebras rehibriden, y la ADN polimerasa extiende los *primers* generando dos cadenas de ADN bicatenario. Este ciclo se repite cientos de veces generando un

producto amplificado de gran longitud que puede ser detectado con diferentes métodos (**Figura 6**) [39]. TwistDX (Cambridge, UK) comercializa una variedad de productos RPA para la detección de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter*, junto con kits de detección isotermal en sistemas portátiles [32].



Figura 6. Esquema Recombinase Polymerase Amplification (RPA). Las recombinasas permiten el apareamiento de primers para iniciar la síntesis mediante una ADN polimerasa con capacidad de desplazamiento de hebra, que, tras la extensión, forma un producto de doble cadena de ADN que permite volver a iniciar la reacción. Reproducido de la referencia [40].

1.2.2.6. Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing: SHERLOCK

Combinado con la técnica RPA se ha desarrollado SHERLOCK (del inglés "*Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing*"). En este método de detección de ácidos nucleicos, tras la amplificación por RPA, se lleva a cabo una transcripción mediada por la enzima ARN polimerasa T7, y el ARN formado es detectado (con resolución de una base) mediante la actividad colateral de la enzima Cas13, que cuando detecta el ARN amplificado hidroliza una sonda reportera, separando un fluoróforo del *quencher* y pudiendo detectarse por emisión de fluorescencia (**Figura 7**). Mediante esta tecnología se ha detectado y distinguido el virus del Dengue y el virus del Zika [41].



Figura 7. Esquema SHERLOCK. A) Componentes del complejo CRISPR-Cas13 para reconocer el ARN diana. La capacidad de corte de ARN de Cas13 está mediada por dos dominios nucleasa eucariota y procariota (HEPN, del inglés "Higher eukaryotic and prokaryotic nuclease domains). B) El complejo CRISPRCas13-ARN es activado cuando se une a una sonda de ARN sensora complementaria, mediando su rotura y, por tanto, separando el fluoróforo del quencher y emitiendo fluorescencia. C) Proceso SHERLOCK: El ADN bicatenario o ARN diana es amplificado mediante RPA y transcrito por la enzima ARN polimerasa T7. Los ARN transcritos son incubados con Cas13a, que cuando detecta la diana específica media la rotura de la sonda sensora, liberando el fluoróforo, y generando una señal. Reproducido de la referencia [41] con permiso de Springer Nature.

1.2.3. Técnicas de hibridación in situ (ISH)

Las técnicas de hibridación *in situ* (ISH) permiten detectar secuencias génicas preservando su localización en la célula o en un tejido. Los métodos descritos anteriormente requieren la extracción del material genético de una muestra biológica y una homogenización previa al análisis. En cambio, en ocasiones es necesario conocer la localización de las secuencias génicas ya que aporta información importante sobre procesos biológicos, funciones de los ácidos nucleicos o revela alteraciones genéticas relacionadas con una enfermedad [42,43].

Las técnicas ISH permiten localizar tanto ADN genómico como ARN citoplasmático, como ARN mensajero, microARNs o Inc-ARNs (del inglés *"long non-coding RNAs"*). Para ello, la muestra es

fijada en un portaobjetos y tratada para ser incubada con sondas que hibridan la secuencia diana. En el enfoque más clásico de detección de ADN genómico, se utilizan sondas clonales con longitud de miles de pares de bases y cientos de nucleótidos modificados y unidos a fluoróforos o moléculas como biotina, o bien se utilizan sondas cortas marcadas con fluoróforos que hibridan con una diana abundantemente expresada (**Figura 8**). La detección de ARN citoplasmático es llevado a cabo a través de estrategias de amplificación de señal que incluyen el uso de set de sondas, reconocimiento de anticuerpos o reacciones enzimáticas [42,44].



Figura 8. Imágenes de dos métodos diferentes de FISH. A) Detección de los locus BCR/ABL mediante sondas clonales en la línea celular HT-29 (ATCC[®] HTB-38[™]). Una mutación de reordenamiento que fusiona estos genes implica la aparición de determinadas leucemias. B) Detección de regiones repetidas centroméricas mediante PNA-FISH en la línea celular HT-29 (ATCC[®] HTB-38[™]).

La detección de la secuencia diana puede realizarse con métodos directos o métodos indirectos. En los **métodos directos** la sonda lleva incorporados fluoróforos detectando la secuencia diana cuando hibridan con ella. Un ejemplo son sondas de gran longitud para detectar locus específicos y marcadas con numerosos fluoróforos o el uso de un set de sondas cada una de ellas marcada con uno o varios fluoróforos. En los **métodos indirectos** las sondas están marcadas con biomoléculas (como biotina o digoxigenina) y son reconocidas, bien por anticuerpos o bien por enzimas que toman un sustrato y generan una amplificación de la señal. El método indirecto tiene ventajas sobre el directo, ya que incluye una amplificación de señal que puede ser detectada sobre la posible señal inespecífica inherente a la técnica [42].

La señal generada por la sonda al hibridar la diana es visualizada por microscopía. Cuando la sonda está marcada con moléculas fluorescentes, la técnica recibe el nombre de *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH), mientras que cuando se genera un sustrato visible por microscopía convencional, la técnica recibe el nombre de *Chromogenic in situ Hybridization* (CISH), más fácil de detectar e implementar en laboratorios clínicos [44].

Las técnicas ISH pueden dividirse en numerosos métodos, dependiendo de cuál es el objetivo que se persigue. Destacan las técnicas ISH para estudiar **desórdenes genéticos**, detectando locus específicos de genes, como la amplificación del locus HER2, con alta frecuencia en cáncer de mama [45], translocaciones como las del gen BCR/ABL, que generan el cromosoma filadelfia, frecuente en determinados tipos de leucemias, reordenamientos, duplicaciones de copias génicas o deleciones que generan la aparición de una enfermedad. Las técnicas de **RNA-FISH** para detectar ARN mensajeros y lnc-ARNs, se basan principalmente en el uso de un set de sondas marcadas con fluoróforos que hibridan a lo largo de todo el ARN o bien sondas marcadas con numerosas biomoléculas para su posterior reconocimiento y amplificación de señal mediante métodos enzimáticos, con enzimas como la peroxidasa de rábano (HRP del inglés *"Horseradish peroxidase"*) o la alcalín-fosfatasa (AP del inglés *"Alcalin phosphatase"*) [46]. La detección de microARNs supone una dificultad añadida debido a su corta longitud. Uno de los métodos más robustos en la detección *in situ* de microARNs es mediante el uso de sondas LNAs en las que existe una alta afinidad de unión en el dúplex LNA:ARN. Estas sondas llevan dos digoxigeninas que permiten ser detectadas con el uso de anticuerpos y reacciones enzimáticas [47].

Otras aplicaciones como **Flow-FISH** combinan la técnica con citometría de flujo para cuantificar el número de copias de elementos genéticos abundantemente expresados, como secuencias teloméricas, o **SKY-FISH** que permite visualizar los 23 pares de cromosomas a la vez, combinando 5 fluoróforos y un set de sondas, permitiendo detectar reordenamientos en todo el genoma. **Fiber-FISH** es una técnica para la localización de alta resolución de la posición de genes. En esta técnica el ADN se desproteiniza y se extiende linealmente de forma mecánica en un portaobjetos. Con una mayor resolución permite detectar reordenamientos y deleciones génicas. **Hybrid-FISH** utiliza una combinación de excitación/emisión de fluoróforos para generar un espectro adicional a través de transmisión óptica dinámica (DOT, del inglés *"Dynamic Optical Transmission"*). Se utilizan tres fluoróforos que permiten generar 7 espectros de emisión como resultado de un marcaje combinatorial, permitiendo realizar *multiplexing* y detectar numerosas regiones en un ensayo [48].

1.2.4. Microarrays de ADN

Los microarrays de ADN consisten en un soporte sólido en el que se fijan covalentemente sondas que permiten analizar la expresión de cientos de genes al mismo tiempo. Su uso más frecuente es para estudiar la expresión génica diferencial en diferentes condiciones, por ejemplo, en material genético extraído de tejido de personas sanas y por otro lado material genético extraído de pacientes que sufren una enfermedad o para la detección de SNPs o variaciones de copias. En general se realizan análisis a partir del ARN, que es extraído y retrotranscrito en ADN complementario (ADNc) y marcado con fluorescencia para posteriormente hibridar con las sondas fijadas en el microarray. Aquellos ARNs que hibriden generarán señales que son detectadas por microscopía o por un escáner, identificando en tanto la expresión génica. Los microarrays son particularmente útiles para estudiar aberraciones citogenéticas en cáncer, si bien están limitados por su límite de detección, haciendo necesario en ocasiones pasos previos de amplificación para poder detectar determinados ARNs [49].

1.2.5. Next-Generation Sequencing (NGS). RNA-seq. Nanostring

1.2.5.1. Next Generation Sequencing (NGS)

Next-Generation Sequencing (NGS) incluye aquellos métodos para secuenciar el genoma de forma rápida y a un bajo coste. Las NGS incluyen a un amplio número de técnicas que pueden ser agrupadas, en general, en preparación de la muestra, secuenciación e imagen y por último análisis de los datos. En todas las plataformas NGS se secuencian millones de fragmentos de ADN que son analizados con herramientas informáticas para mapear y ensamblar el genoma. Cada una de las más de tres mil millones de bases del genoma se secuencia varias veces, lo que proporciona resultados de datos precisos [12,50].

Los métodos de preparación de la muestra se dividen en dos grupos: muestras clonalmente amplificadas, en los que la muestra es amplificada previa secuenciación (existen dos métodos, emulsión por PCR y amplificación en fase sólida) y muestras de molécula sencilla, en los que las muestras son inmovilizadas en soportes sólidos y posteriormente se lleva a cabo la amplificación. Los métodos de secuenciación, según la plataforma, se dividen en terminación reversible cíclica, en secuenciación por ligación, pirosecuenciación y secuenciación en tiempo real (**Figura 9**) [51].



Figura 9. Principales métodos NGS. A) La muestra es amplificada clonalmente por emulsión por PCR o por PCR en puente en fase sólida. B) Los tres métodos más frecuentes utilizados son la pirosecuenciación (comercializado por Roche 454), la secuenciación por ligación (SOLiD) y la secuenciación por síntesis (Illumina). Reproducido de la referencia [52] con permiso de Springer Nature.

-Secuenciación por síntesis mediante terminación reversible cíclica. En la secuenciación por terminación reversible cíclica se utilizan nucleótidos asociados a un terminador reversible. En el caso de Illumina/Solexa los fragmentos generados por clúster se incuban con *primers* que inician la secuenciación, la ADN polimerasa y cada uno de los nucleótidos marcados con un fluoróforo distinto. En el caso de Helico's Bioscience los nucleótidos son marcados con el mismo fluoróforo y se realizan incubaciones de cada nucleótido individualmente en un orden predeterminado.

-Secuenciación por ligación (SOLiD). Comercializada por Life Technologies, tras la PCR por emulsión en este tipo de secuenciación se une un *primer* a las moléculas de ADN monocatenario en las *beads*. A continuación, se incuban las 16 sondas marcadas fluorescentemente, se liga, se realiza la lectura por imagen y se escinden los dos últimos nucleótidos. A continuación, se repite una ronda de ligación, completando hasta 10 rondas de ligación.

-**Pirosecuenciación.** Comercializada por Roche 454, se utilizan *beads* con ADN monocatenarios amplificados mediante PCR en emulsión que se encuentran en pocillos y cada pocillo se incuba con un nucleótido, que al incorporarse libera pirofosfato que reacciona con las enzimas sulfurilasa y luciferasa y genera una señal que detectable.

Finalmente, las secuencias generadas deben ser ensambladas y alineadas, bien *de novo* o bien utilizando una secuencia de referencia, dependiendo de la estrategia biológica seguida. Los análisis computacionales permiten realizar estos ensamblajes y realizar los correspondientes estudios de detección de SNPs, variaciones de copias, expresión génica o descubrimiento de nuevos transcritos.

1.2.5.2. RNA-seq

RNA-seq incluye diferentes métodos para estudiar el transcriptoma usando tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS). Es una técnica utilizada para secuenciar el transcriptoma de una población celular y estudiar la expresión génica, las diferentes isoformas existentes, hallar nuevos transcritos, estudiar transcritos no codificantes, detectar SNPs, mutaciones puntuales u otras variaciones en la secuencia. Más del 90% de los datos generados de RNA-seq han sido realizados con la tecnología de secuenciación de lectura corta de Illumina [53,54].

RNA-seq se puede realizar en diferentes métodos que pueden clasificarse como secuenciación de lectura corta (*short-read sequencing*), secuenciación de lectura larga (*long-read sequencing*) o secuenciación de lectura larga directa (*long-read direct RNA-seq*). En el primer caso, se requiere la fragmentación del ARN, síntesis de ADNc, ligación de un adaptador, amplificación por PCR, selección de tamaño y secuenciación. En el caso de lectura larga, el ARN no es fragmentado, y puede llegar a evitar el paso de amplificación o selección del tamaño. En el caso de lectura larga directa, se añaden adaptadores ligadores y se lleva a cabo secuenciación.

Las principales tecnologías de secuenciación en RNA-seq son comercializadas por Illumina, Pacific Biosciences y Oxford Nanopore. Illumina sigue el principio de **secuenciación por síntesis por terminación reversible cíclica**, pudiendo hacer lecturas de 50 a 500 pares de bases. Pacific Biosciences lleva a cabo **secuenciación en tiempo real**, en el que en un nanopozo con una polimerasa inmovilizada se cuantifica la hebra en crecimiento por la incorporación de nucleótidos marcados con fluorescencia que generan una señal recogida por detectores pudiendo realizar lecturas de hasta 50 kb. Oxford Nanopore lleva a cabo **secuenciación en nanoporos**, en el que se acoplan moléculas individuales donde se lleva a cabo la translocación de una hebra de ARN a través de un nanoporo, controlado por una proteína motora, que genera



Figura 10. Métodos de secuenciación en RNA-seq. Illumina utiliza el método de secuenciación reversible cíclica. Pacific Biosciences monitoriza la incorporación de nucleobases marcadas con fluoróforos y Oxford Nanopore analiza los cambios de corrientes de una proteína motora. Reproducido de la referencia [53] con permiso de Springer Nature.

1.2.5.3. Nanostring

En ocasiones los pasos previos de preparación de la muestra y amplificación de ARN utilizados en RNA-seq pueden interferir en la interpretación de los resultados finales, introduciendo errores en el análisis de la expresión génica. Nanostring es una tecnología basada en la captura y contaje de moléculas de ARN en una mezcla compleja sin realizar amplificación previa. Para ello utiliza una biblioteca de sondas multiplexadas basada en dos sondas para cada molécula de ARN mensajero. La sonda de captura tiene una región de 35 a 60 pares de bases complementaria a un ARN mensajero diana particular y marcada con biotina. La sonda de detección contiene de 35 a 50 pares de bases complementarias al ARN mensajero, acoplada a una molécula de ADN monocatenario hibridada con fragmentos de ARN cada uno de ellos con un fluoróforo, que generan un código de fluoróforos que puede ser detectado y analizado para cada molécula de ARN específica. De este modo, la sonda captura el ARN mensajero y la sonda de detección permite detectarlo a través del código de fluoróforos. La estructura es capturada en un soporte sólido marcada con estreptavidina, detectando el código de fluoróforos (**Figura 11**). Mediante esta plataforma pueden estudiarse transcritos, expresión génica, pero no descubrir nuevos transcritos [55,56].



Figura 11. Sondas utilizadas en Nanostring. El ARN mensajero se detecta mediante dos sondas, una de captura marcada con biotina y otra sonda reportera unida a un ADN monocatenario al que se unen numerosas sondas marcadas con fluoróforos que generan un código de fluorescencia para detectar cada molécula de ARN individual. Reproducido de la referencia [56] con permiso de Springer Nature.

1.3. Análogos de ácidos nucleicos

Los análogos de ácidos nucleicos son compuestos con una estructura similar a la de los ácidos nucleicos [57,58]. Existen compuestos cuyo esqueleto es análogo a los ácidos nucleicos, por ejemplo, los ácidos nucleicos bloqueados (LNAs) o ácidos nucleicos peptídicos (PNAs). Así mismo, existen análogos a las bases nitrogenadas, como bases con fluoróforos incorporados, 2-aminopurina, que presenta fluorescencia en solución pero no cuando se encuentra incorporada en la cadena, o como las bases universales, que forman pares con todas las bases [59].

1.3.1. Ácidos nucleicos bloqueados (LNAs)

En los ácidos nucleicos bloqueados o ARN inaccesibles (LNAs), los restos de ribosa se encuentran modificados de forma que el oxígeno 2' está unido con el carbono 4', bloqueando la flexibilidad del esqueleto (**Figura 12**). Los LNAs pueden ser insertados en bases de oligonucleótidos de ARN o ADN, y la eliminación de la flexibilidad del esqueleto azúcar fosfato se traduce en un aumento de la afinidad por su diana, que queda reflejado en el aumento de la temperatura de fusión (Tm, del inglés "*Melting Temperature*") de 2 a 4 ºC por cada base LNA [57,60]. Los LNAs mantienen propiedades similares a la de los ácidos nucleicos, como esqueleto de azúcar fosfato cargado

negativamente o una solubilidad similar a la de ácidos nucleicos. Estas propiedades junto a su afinidad mejorada para hibridar con cadenas de ADN y ARN han permitido el uso de LNAs en aplicaciones como *antisense*, terapias *antigene* (tienen baja toxicidad en animales), en procedimientos de PCR, en procedimientos de hibridación *in situ* (FISH), en detección de SNPs, en *screening* de microarrays, entre otros. Tal y como se vio en el apartado 1.2.3., una de las aplicaciones que más destaca de los LNAs es en la detección de microARNs mediante FISH [42,61].



Figura 12. Estructura de monómero de ADN y estructura de monómero de LNA. En los LNA un puente metilo entre el oxígeno 2' y el carbono 4' elimina la flexibilidad de la cadena de azúcar fosfato, confiriendo una mayor afinidad de unión a ADN y ARN.

1.3.2. Ácidos nucleicos peptídicos (PNAs)

Las sondas PNA son análogos de ADN en los que el esqueleto de fosfato deoxiribosa es sustituido con un esqueleto peptídico de unidades N-(2aminoetil)-glicinas en los cuales las bases purinas y pirimidinas están unidas covalentemente (**Figura 13, Figura 14**). Una de las características del esqueleto peptídico de los PNAs es la ausencia de cargas negativas, lo que evita fuerzas de repulsión en el proceso de hibridación, lo que se traduce en una afinidad superior de hibridación en el heteroduplex PNA:ADN o PNA:ARN que en el homoduplex ADN:ADN o ARN:ARN por sí mismo. Esto queda reflejado en la alta temperatura de fusión (Tm) que presentan estas sondas, hasta 1 ºC superior por cada base con respecto a su oligonucleótido de ADN análogo [62,63].



Figura 13. Estructura química de sondas PNA. A) El esqueleto de azúcar del ADN es sustituido por un esqueleto de N-(2-aminoetil)glicina. B) Estructura de una cadena de PNA.



Figura 14. Esquema de hibridación de PNA con ADN. Esquema de dúplex PNA:ADN, en el que las bases nitrogenadas hibridan por puentes de hidrógeno con un PNA de esqueleto peptídico.

Otra de las características de esta mayor afinidad es la capacidad de estas sondas para invadir dobles cadenas e hibridar con su diana. Esta ventaja ha sido explotada para usar sondas PNA para invadir la doble hélice de ADN, haciendo determinadas regiones accesibles sin necesidad de desnaturalizar la cadena con altas temperaturas. La ausencia de cargas también facilita a estas sondas su transporte a través de la membrana lipídica, lo que facilita la aplicación de estos PNA en terapias *antisense* y *antigene*. También se utilizan para unir péptidos, pequeñas moléculas o drogas a vectores plasmídicos sin alterar la función del plásmido. Los PNAs no interaccionan con las ADN polimerasas, por lo tanto, no pueden intervenir en la extensión de *primers*. En *PCR-clamping*, se utilizan junto a otros *primers* para competir por la unión del cebador e iniciar o no la PCR discriminando la presencia de variaciones de nucleótido. Otra de las aplicaciones es PNA-FISH, donde los PNA se utilizan junto con la técnica hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para detectar secuencias repetidas como secuencias teloméricas o ARN ribosómico. Con esta detección se realizan estudios de longitud telomérica, envejecimiento y cáncer y estudios de identificación de poblaciones bacterianas o presencia de patógenos [64].

Los PNA como hebras individuales carecen de una conformación bien definida, sin embargo, una de las modificaciones de PNA más interesantes en relación a la síntesis y su preorganización conformacional es la introducción de un grupo quiral en la posición γ del monómero de PNA. Esto preorganiza al PNA en un motivo helicoidal derecho (RH) o izquierdo (LH) (**Figura 15**) que hibrida con otra hebra de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases complementaria y coincide con el sentido helicoidal [65–67]. Concretamente, la introducción de un grupo γ -(S)-quiral (**Figura 15B**) preparado a partir de L-aminoácidos genera una preorganización que contribuye a mejorar la afinidad de unión de los PNA y la selectividad de la secuencia.



Figura 15. Monómeros de PNA. A) Monómero de PNA neutral. B) Monómero PNA quiral en el que se introduce un motivo helicoidal derecho (γ - (S) -estereocentro). C) Monómero PNA quiral en el que se introduce un motivo helicoidal izquierdo (γ - (R) -estereocentro). Los sustituyentes pueden estar cargados positiva o negativamente.

Otra de las posibilidades al introducir un grupo quiral es introducir un grupo que confiera cargas al PNA y facilite su solubilidad y evite la agregación. Las cadenas PNA cargadas negativamente no disminuyen su afinidad de unión, aunque la unión es más débil. En presencia de una concentración de sales media-alta, la introducción de cargas negativas implica una unión más fuerte del PNA a ADN y ARN que la introducción de cargas positivas [68].

1.4. Marcaje por Química Dinámica (DCL)

1.4.1. Sondas DGL[®], SMART-Nucleobases y química dinámica

El marcaje por química dinámica (DCL, del inglés "*Dynamic Chemistry Labelling*") es una tecnología de análisis de ácidos nucleicos con resolución de una base mediante el uso de sondas de ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) modificados químicamente con una posición abásica frente a un nucleótido bajo estudio en una secuencia diana. Estas sondas PNA abásicas son llamadas como **sondas DGL (Figura 16**), comercializadas por Destina Genomica S.L. (Granada, España) [69,70].

Sonda DGL



Figura 16. Estructura química de las sondas DGL. Las sondas DGL presentan un esqueleto peptídico de monómeros (N-(2aminoetil)-glicina con las nucleobases unidas a través del nitrógeno de la glicina. En la sonda DGL hay ausencia de una base nitrogenada frente a un nucleótido bajo detección, existiendo una amina secundaria.

Cuando las sondas DGL hibridan con su secuencia diana, se forma un bolsillo químico con la amina secundaria frente a un nucleótido bajo estudio en la secuencia. A continuación, se utilizan nucleobases modificadas químicamente con un grupo aldehído (SMART-Nucleobases) (Figura 17).



Figura 17. Estructura química de las SMART-Nucleobases.

Siguiendo las reglas de apareamiento de Watson y Crick, la SMART-Nucleobase complementaria al nucleótido bajo estudio se incorpora en el bolsillo químico. A un pH ligeramente ácido, la amina libre en la posición abásica de la sonda DGL ataca el grupo carbonilo del aldehído en la SMART-Nucleobase, formando un ion iminio intermedio reversible. El tratamiento con un agente reductor lleva a cabo la reducción a una amina terciaria fijando irreversiblemente (*chemical lock-up*) la incorporación de la SMART-Nucleobase correcta (**Figura 18, Figura 19**). Cada SMART-Nucleobase puede presentar distintos tipos de marcajes, como fluoróforos o biomoléculas como biotina. Esto permite la identificación de la SMART-Nucleobase incorporada y, por tanto, la identificación del nucleótido bajo estudio de forma específica [69,71].



Figura 18. Esquema DCL. A) El ácido nucleico diana contiene en su secuencia un nucleótido bajo estudio. Tras la hibridación de la sonda DGL, se forma un bolsillo químico frente a este nucleótido, con una amina secundaria expuesta. A continuación, se incorpora de forma específica una SMART-Nucleobase complementaria al nucleótido bajo estudio siguiendo las reglas de apareamiento de Watson y Crick. Se forma una estructura intermedia de ión iminio que finalmente se fija mediante uso de un agente reductor. La SMART-Nucleobase incorporada es detectada dependiendo del marcaje. B) Reacción entre la SMART-Nucleobase y la posición abásica. A un pH ligeramente ácido, la amina libre en la posición abásica ataca el grupo aldehído de la SMART-Nucleobase, formando un ion iminio intermedio en una reacción reversible. La reducción a un iminio terciario estable fija la reacción.





Dependiendo de la plataforma de detección de la reacción que se utilice para la lectura de los ácidos nucleicos, el grupo amino terminal de la sonda DGL puede ser modificado. Por ejemplo, para espectrometría de masas se utiliza un grupo nucleofílico como NH₂ o SH para inmovilizar la sonda DGL a un soporte. Además de espectrometría de masas, se han utilizado numerosas plataformas para la lectura de DCL, como plataformas basadas en fluorescencia (Luminex, FLUOstar Omega, citometría de flujo FACS (*"Fluorescence Activated Cell Sorting"*) y mediante fotomultiplicador de Silicio (SiPM, *"silicon photomultiplier*)) o mediante métodos colorimétricos (*SpinTube Device*).

1.4.3. Aplicaciones DCL

1.4.3.1. Análisis DCL mediante MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF (del inglés "*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* – *Time-Of-Flight*"), fue la primera herramienta de lectura utilizada para analizar los resultados obtenidos mediante DCL. Los primeros análisis mostraron la incorporación selectiva de la SMART-Nucleobase complementaria a la base nitrogenada bajo estudio en la posición abásica de la sonda DGL. Además, estos primeros resultados mostraron que la incorporación de las SMART-Nucleobases al híbrido DGL:ADN son más eficientes cuando se realizan en una posición intermedia frente a aquellas realizadas en los extremos de la sonda. También se mostró que la

guanina y la citosina se incorporan con un mayor rendimiento y de forma más selectiva (ratio 5 veces mayor) que la adenina o la timina (atribuido al mayor número de enlaces de hidrógeno). Además, se incorporaron bases purínicas con mayor rendimiento y selectividad que las pirimidinas (A>T; G>C), lo que puede explicarse por mayores interacciones de apilamiento π asociado con los anillos de purina cíclicos. Los resultados también mostraron que la alteración de las concentraciones iniciales de las SMART-Nucleobases dieron lugar a diferentes proporciones de productos, sin embargo, aumentando las concentraciones de aquellas bases con menor rendimiento y selectividad en condiciones equimolares, resultó en mejores rendimientos y proporciones máximas para la formación correcta del producto DCL [71,72].

Las reacciones en ausencia del ADN diana o en presencia de un ADN diana no complementario demostraron la importancia de la formación del híbrido DGL:ADN para acelerar la reacción y favorecer la incorporación selectiva de la SMART-Nucleobase. El estudio del efecto del pH mostró que un pH ligeramente ácido logra el equilibrio para proporcionar suficiente amina libre en la posición abásica de la sonda DGL para atacar el grupo carbonilo del aldehído en las SMART-Nucleobases, pero lo suficientemente bajo para la protonación del oxígeno carbonilo antes del ataque nucleofílico. A través del análisis de la rección DCL mediante espectrometría de masas MALDI-TOF se llevaron a cabo dos aplicaciones:

(1) Genotipado de fibrosis quística mediante DCL. Los primeros trabajos de validación del marcaje por química dinámica fueron realizados para genotipar la fibrosis quística de 12 pacientes. Se trata de una enfermedad genética recesiva letal que aparece como resultado de mutaciones en el gen codificador del regulador transmembrana de la fibrosis quística. Los pacientes fueron genotipados para detectar la mutación indel Δ F508 (deleción de 3 pares de bases, que representa dos tercios de los casos de pacientes afectados por fibrosis quística) y el SNP G551D (responsable del 1-2 % de los casos de fibrosis quística). El análisis del SNP se llevó a cabo de forma directa mientras que el análisis de la deleción se realizó con una sonda *wild-type* y otra correspondiente a la mutación (**Figura 20**) [71].



Figura 20. Genotipado de la fibrosis quística mediante DCL usando espectrometría de masas como herramienta de lectura. A) El uso de una sonda DGL#1 y la incorporación selectiva de SMART-T permite identificar el SNP G551D. B) El uso de dos sondas DGL (DGL#2 y DGL#3) permite identificar la deleción Δ F508 cuando existe una incorporación selectiva de la SMART-A en la sonda DGL#2. C) Espectro representativo MALDI-TOF de genotipado de un individuo heterocigoto para ambas mutaciones, donde se observan todos los posibles patrones de incorporación de SMART-NB. Reproducido de las referencias [71,73].

(2) Identificación de especies parasitarias de tripanosomas mediante DCL y lectura mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Mediante este método se llevó a cabo el análisis de un producto de PCR de 155 pares de bases del gen de ARN ribosómico 28S, una región altamente conservada para identificar patrones moleculares correspondientes a diferencias de una única base (SNF del inglés, *"Single Nucleotide Fingerprint"*) que permiten distinguir las especies de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania spp*. Mediante el uso de dos sondas DGL se diferenciaron estas especies en una única reacción [73,74].

1.4.3.2. Análisis DCL mediante plataformas de fluorescencia

(1) Desarrollo de un biochip para análisis de ácidos nucleicos en la plataforma In-Check de STMicroelectronics. En este chip se desarrolló una plataforma de análisis e identificación de ácidos nucleicos combinando DCL y utilizando SMART-Citosina marcada con el fluoróforo FITC en la plataforma In-Check de STMicroelectronics, con dos cámaras independientes de reacción de PCR y un área secuencial de microarray para la captura e identificación de ácidos nucleicos mediante fluorescencia. Este sistema fue utilizado para la detección del Mengo-Virus y del microARN-122 [72].

(2) Detección de miR-122 en suero de pacientes con especificidad de una base y límite de detección (LoD, del inglés "Limit Of Detection") 1,32 pM mediante el uso de la plataforma Quanterix Simoa. Se logró una detección de miR-122 en suero de pacientes, permitiendo identificar pacientes con riesgo de DILI después de una sobredosis de acetaminofén. Además se encontró la presencia de múltiples isoformas de miR-122 en el suero de pacientes con DILI que estaban en baja concentración o no estaban presentes en individuos sanos [75].

(3) Detección y cuantificación directa de miR-451a en plasma humano mediante la plataforma de lectura FLUOstar Omega[®]. Detección directa y específica de miR-451 sin necesidad de extracción de ARN y de amplificación en plasma humano con un LoD 22.97 pM mediante sondas DGL conjugadas a *beads* magnéticas y posterior detección enzimática con β-galactosidasa. La plataforma de lectura fue FLUOstar Omega[®] [76].

(4) Detección y cuantificación rápida y directa de miR-21 en líneas tumorales mediante las plataformas de lectura FACS y FLUOstar Omega[®]. Detección directa y específica de miR-21 en líneas tumorales sin necesidad de extracción de ARN y de amplificación por PCR con un LoD de 35.84 pM, usando sondas DGL conjugadas a *beads* magnéticas y posterior detección enzimática con β-galactosidasa. La plataforma de lectura fue FACS y FLUOstar Omega[®] [77].

(5) Detección de miR-122 en pacientes DILI con daño hepático mediante la plataforma de Luminex MAGPIX[®]. Detección y cuantificación de miR-122 en suero de pacientes afectados por DILI con un LoD de 1.11 pM. Se usaron sondas DGL conjugadas a *beads* magnéticas y se reveló con Streptavidin-R-ficoeritrina (SA-PE), obteniendo valores medios de intensidad de fluorescencia (MFI) mediante Luminex MAGPIX[®] [78].

(6) Detección miR-21 en pacientes afectados de cáncer de células pequeñas no microcíticas (NSCLC, del inglés "Non-Small Cell Lung Cancer"). Lectura DCL con el fotomultiplicador de Silicio (SiPM) para crear una plataforma de lectura para la detección y cuantificación de microARNs sin extracción ni amplificación previa, detectando miR-21 en pacientes afectados de NSCLC con un LoD de 4.7 pmol / L [79].

1.4.3.3. Análisis DCL mediante ensayo de colorimetría

(1) SpinTube: Ensayo colorimétrico para identificación rápida de especies de tripanosomas por DCL. Diferenciación rápida de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania Major* mediante un ensayo de hibridación *dot-blot* mediante DCL en amplicones de PCR de genes conservados de la subunidad 28S de ARN ribosómico (ARNr), que permite identificar ambas especies a través de diferencias de un nucleótido (SNF). El ensayo está acoplado a un dispositivo llamado SpinTube en el que tiene lugar una reacción enzimática que genera una señal colorimétrica visualmente detectable, lo que supone una plataforma de diagnóstico portátil, de bajo coste y fácil uso (**Figura 21**) [80].



Figura 21. Esquema Spin-Tube para detección de tripanosomas. Las sondas DGL se inmovilizan en membranas nylon siguiendo patrones de manchas específicos. A continuación, se añaden los amplicones de PCR que hibridan con las sondas y la incorporación de la correspondiente SMART-Nucleobase marcada con biotina. El reconocimiento de la biotina por estreptavidina alcalín-fosfatasa e incubación con el sustrato cromogénico (NBT/BCIP) genera un precipitado azul, generando un patrón de lectura a simple vista. Reproducido de la referencia [80] con permiso de Springer Nature.



Desarrollo de un enfoque basado en nanotecnología y marcaje por química dinámica para capturar y detectar ácidos nucleicos mediante citometría de flujo (Objetivo 1)

Capítulo 2. Desarrollo de un enfoque basado en nanotecnología y marcaje por química dinámica para capturar y detectar ácidos nucleicos mediante citometría de flujo (Objetivo 1)

2.1. Introducción

2.1.1. Justificación

La importancia de los ácidos nucleicos en el diagnóstico molecular, junto con la existencia de algunas limitaciones de la PCR (como las descritas en la *sección 1.1.3*), abre un espacio de investigación para desarrollar nuevos enfoques de detección de ácidos nucleicos. Especialmente son de gran interés aquellas tecnologías que pueden ofrecer algunas ventajas como la detección de ácidos nucleicos en una matriz biológica compleja, aun manteniendo la especificidad y sensibilidad de la PCR, así como aquellos métodos que permiten usar instrumentación de fácil uso y con un bajo coste económico.

En este trabajo se ha desarrollado una prueba de concepto para aplicar la tecnología de marcaje por química dinámica (DCL) en solución combinado con nanopartículas de poliestireno bifuncionalizadas para detectar ácidos nucleicos con resolución de una base mediante citometría de flujo. La posibilidad de llevar a cabo DCL en solución permite mejorar los procesos de hibridación entre las sondas y los ácidos nucleicos diana [81–83], mientras que las nanopartículas de poliestireno destacan por su estabilidad en el medio biológico y por la posibilidad de conjugar cargas de diferente naturaleza (como fluoróforos, moléculas pequeñas, haptenos o anticuerpos), significando una amplia versatilidad en sus aplicaciones [84–86]. Este sistema se ha desarrollado para detectar ácidos con resolución de una base y llevar a cabo su detección mediante citometría de flujo, dado que se trata de una plataforma de lectura ampliamente utilizada e implementada en la rutina de laboratorios clínicos y de investigación, y, por tanto, de fácil acceso como alternativa para el análisis de ácidos nucleicos.

La prueba de concepto ha sido desarrollada para detectar secuencias de ácidos nucleicos sintéticas correspondientes a KRAS conteniendo el codón 12. La aparición de mutaciones en el gen KRAS puede conducir al desarrollo de cáncer, representando en torno a un 20-30 % de todas las mutaciones encontradas en tumores humanos [87], predominantemente adenocarcinomas (adenocarcinoma pancreático, colorrectal, de pulmón, de ovario, cervical y de tracto biliar) [7,88,89]. En torno al 99 % de las mutaciones en KRAS son mutaciones puntuales que aparecen en los codones 12, 13 y 61 del exón 2. Adicionalmente, la prueba de concepto ha sido validada

para detectar el micro-RNA 122 (microARN-122), un biomarcador específico de daño hepático [75,78,90], también asociado con desarrollo de carcinoma hepatocelular.

2.1.2. Nanopartículas de poliestireno (PS-NPs)

2.1.2.1. Definición y características de las PS-NPs

La formación de nanoestructuras, entre ellas nanopartículas, permite desarrollar aplicaciones de gran interés en campos como la electrónica, la medicina y la biotecnología. Debido a varias ventajas que se detallarán más adelante, en este trabajo se han desarrollado nanopartículas de poliestireno (PS-NPs) bifuncionalizadas para capturar y detectar los productos DCL formados en solución. Las nanopartículas de poliestireno están formadas por la polimerización del estireno junto con divinilbenceno (DVB), obteniendo poblaciones de nanopartículas estables, monodispersas y con morfología esférica. Pueden ser sintetizadas mediante polimerización por dispersión o por emulsión libre de emulsionante, dependiendo del tamaño de la nanopartícula, en síntesis, que puede variar desde 100 nm a 2 µm [91].

Las PS-NPs destacan por su compatibilidad multietapa estándar, permitiendo diferentes estrategias de conjugación ortogonal, pudiendo llevar cargas de diferente naturaleza, por tanto, proporcionándoles una amplia versatilidad en sus aplicaciones en biomedicina. La estabilidad de las PS-NPs es una característica que las diferencia de las nanopartículas biodegradables. Las nanopartículas biodegradables sufren cambios en su estructura química, por tanto, dependiendo de la aplicación en la que se utilicen, las nanopartículas biodegradables pueden ser sensibles bajo determinadas condiciones ambientales [92].

Las PS-NPs son amino-funcionalizadas, permitiendo llevar a cabo conjugaciones de moléculas mediante síntesis en fase sólida de péptidos (SPPS, del inglés *"Solid Phase Peptide Synthesis"*) basada en etapas de desprotección y unión de moléculas a través de los grupos amino y la formación de enlaces amida [91]. A su vez, las PS-NPs pueden ser multifuncionalizadas mediante estrategias basadas en la completa ortogonalidad de grupos protectores. Por ejemplo, para la bifuncionalización de las PS-NPs, en este trabajo se utiliza el grupo Fmoc (9H-fluoren-9-il-metoxicarbonilo) y el grupo Dde (etil 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden) junto con hidrocloruro de hidroxilamina e imidazol en N-metil-2-pirrolidona (NMP) para desproteger el grupo Dde sin desproteger el grupo Fmoc, permitiendo llevar a cabo la conjugación de dos moléculas de diferente naturaleza en la nanopartícula. [93]. Las PS-NPs pueden ser sintetizadas

siguiendo protocolos de síntesis orgánica en fase sólida en diferentes medios de reacción tanto acuosos como orgánicos, lo que facilita llevar a cabo numerosos tipos de reacciones químicas.

2.1.2.2. Caracterización fisicoquímica de las PS-NPs

La caracterización fisicoquímica de las PS-NPs es necesaria para el desarrollo de aplicaciones en biología y biomedicina. El tamaño, morfología, concentración, fluorescencia y carga de moléculas conjugadas son algunas de estas características que deben ser establecidas.

-Dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés "Dynamic Light Scattering"). El tamaño hidrodinámico de la población de nanopartículas es medido mediante la dispersión de luz dinámica [94,95]. En esta técnica, las PS-NPs son incididas con un láser monocromático y las fluctuaciones de intensidad de luz dispersa se miden como función del tiempo. De esta medida se obtiene un tamaño de PS-NPs y un índice de polidispersidad (PDI, por sus siglas en inglés "Polydispersity Index"). Este PDI presenta un valor entre 0 (la población de nanopartículas tiene un tamaño homogéneo) y 1 (la población de nanopartículas tiene un tamaño heterogéneo). Por tanto, aquellos valores cercanos a 0 indican que población de nanopartículas es monodispersa y con tamaño homogéneo [96].

-Tamaño, morfología y fluorescencia. Adicionalmente el tamaño y la morfología de las nanopartículas puede analizarse empleando microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés *"transmisión electron microscopy"*) [97,98] y microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *"scanning electron microscopy"*). Cuando estas nanopartículas son funcionalizadas con fluoróforos, la emisión de fluorescencia puede analizarse mediante microscopía de fluorescencia y confocal así como mediante espectrofluorometría y citometría de flujo [98].

-**Potencial zeta**. La carga de la superficie de las nanopartículas amino-funcionalizadas es positiva, atrayendo iones negativos existentes en el medio de suspensión de las nanopartículas. Estos iones forman una monocapa en la nanopartícula seguida de una capa difusa que contiene iones aun atraídos por la nanopartícula. El potencial medido entre el límite entre los iones de la capa difusa que se moverá con la nanopartícula y los que no lo harán se denomina potencial zeta. La medida del potencial zeta tiene valor para la predicción de la estabilidad en suspensión. La medida del potencial zeta se emplea para monitorizar que la multifuncionalización muestra suspensiones reticulares poliméricas homogéneas y estables [99,100].

71

-**Concentración de nanopartículas**. La concentración de las PS-NPs (nanopartícula por microlitro) puede ser determinada por un ensayo basado en turbidimetría en el que se mide la densidad óptica a 600 nm de la suspensión de PS-NPs, basado en principios nefelométricos [101]. La luz que atraviesa las suspensiones de NPs se dispersa mediante fenómenos de reflexión, refracción y difracción, y la intensidad de la luz dispersada, que es proporcional al número de NPs en suspensión, se registra mediante un espectrofotómetro estándar.

-Cuantificación de los grupos aminos. Una ventaja de las PS-NPs es la posibilidad de cuantificar los grupos aminos primarios, así como cuantificar la concentración de las moléculas que se han conjugado a las nanopartículas. Dependiendo de la aplicación desarrollada puede ser necesario conocer la concentración de las moléculas conjugadas en las nanopartículas. Para ello se realizan dos tipos de ensayos:

***Test de la ninhidrina**. Se utiliza la reacción de la ninhidrina para determinar los grupos aminos primarios libre en las nanopartículas [102].

*Test Fmoc. Se trata de un test colorimétrico para cuantificar los grupos aminos que se encuentran protegidos por el grupo Fmoc. Para ello, las nanopartículas son protegidas con el grupo Fmoc y después se miden la cantidad del aducto de piperidina-dibenzofulveno que es liberado durante la desprotección. La concentración del aducto permite calcular la concentración de estreptavidina presente en la nanopartícula [103].

2.1.2.3. Aplicaciones de las PS-NPs en biomedicina

Debido a su robustez en el medio biológico, la versatilidad de conjugar cargas de distinta naturaleza y de determinar sus características físico-químicas así como el hecho de que son biocompatibles intracelularmente, ha permitido desarrollar numerosas aplicaciones exitosas en biomedicina y biotecnología.

-Transporte y liberación intracelular de ácidos nucleicos (ARNsi y ADN). Se han desarrollado PS-NPs para la liberación intracelular de ARNsi (ARN interferente pequeño) utilizando células madre embrionarias de ratón, permitiendo identificar poblaciones transfectadas positivas. También se ha desarrollado un sistema de transfección de ADN plasmídico en células T de la línea del hibridoma con una proteína fosfatasa enriquecida con un dominio prolina-glutaminaserina-treonina, PEP y fusionada con una proteína fluorescente amarilla YFP (del inglés, *"Yellow Fluorescent Protein"*) [95,104,105].
-Transporte y liberación intracelular de proteínas. Se han usado nanopartículas para la liberación de proteínas (como la β-galactosidasa y la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*) [106] en varias líneas celulares (entre ellas, células embrionarias de ratón), pudiendo ser cuantificada dicha liberación.

-Sensores de pH en células vivas. Se han desarrollado nanopartículas conjugadas con fluoresceína como sensores de pH intracelular a través de instrumentaciones como espectrofluorometría, microscopía de fluorescencia y citometría de flujo [107].

-Sensores de calcio intracelular. A través de la conjugación de un sensor molecular de calcio en las nanopartículas se han realizado detección de cambios de concentración del calcio intracelular en varias líneas celulares, pudiendo monitorizar los cambios de iones de calcio durante periodos largos de tiempo [108].

-Sensores intracelulares de la caspasa-3/7 en células vivas apoptóticas. Se han utilizado nanopartículas como sensores intracelulares mediante la conjugación de un control interno. En particular se describe una aplicación celular para rastrear sondas a lo largo del tiempo. Estas nanopartículas se utilizaron para monitorizar la apoptosis mediante citometría de flujo a través de la detección de caspasa-3/7 [86].

-Catálisis con nanopartículas de paladio en células vivas. Se han desarrollado nanopartículas con paladio inmovilizado capaces de atravesar la membrana celular de células HeLa sin toxicidad celular, con futuras expectativas de aplicación en reacciones químicas en sistemas vivos para formar y romper enlaces C-C específicamente [91].

-Tratamiento y diagnóstico del cáncer de mama. Se han desarrollado nanopartículas de poliestireno trifuncionalizadas para el tratamiento y el diagnóstico del cáncer de mama triple negativo. La triple funcionalización consiste doxorrubicina, fármaco utilizado para el tratamiento del cáncer de mama, el fluoróforo cianina rojo lejano Cy7, para la monitorización de las nanopartículas y el *homing peptide* CRGDK, que se une específicamente a la neuropilin 1 (Nrp-1), sobreexpresado en cáncer de mama triple negativo, permitiendo dirigir específicamente estas nanopartículas. El sistema fue validado en un modelo de ratón de xenotrasplante ortotópico utilizando células TNBC [108].

2.1.2.4. Aplicación de PS-NPs para capturar productos DCL en solución

Las PS-NPs destacan por algunas de sus características que las hacen idóneas para ser aplicadas tanto en el diagnóstico molecular como en terapia de enfermedades. Para la aplicación

desarrollada en este trabajo, las nanopartículas de poliestireno presentan varias ventajas frente a otro tipo de nanoestructuras [84]:

(1) Estabilidad en matrices biológicas complejas. Las PS-NPs presentan una alta estabilidad en medios biológicos complejos, por tanto, lo que las hace idóneas para capturar productos DCL en fluidos biológicos como plasma humano o suero.

(2) Conjugación de cargas de diferente naturaleza. Gracias a la ortogonalidad de grupos protectores, se pueden conjugar moléculas de diferente naturaleza, como fluoróforos, moleculas pequeñas, fármacos pequeños o proteínas como anticuerpos. Esto permite sintetizar nanopartículas con marcaje fluorescente junto con moléculas de alta afinidad (biotina-estreptavidina / digoxigenina-antidigoxigenina), mostrando su versatilidad para desarrollar estrategias de detección.

(3) Caracterización físico-química y concentración de la carga controlada. Las PS-NPs pueden ser caracterizadas, por tanto, es posible monitorizarlas en su aplicación y además es posible conocer la concentración de la carga de moléculas conjugada en las nanopartículas.

2.1.3. KRAS como ácido nucleico diana

La familia de genes RAS son genes constitutivos que codifican proteínas envueltas en la señalización celular de procesos como el crecimiento celular, la división celular y la apoptosis. Los genes de esta familia más destacables clínicamente son los proto-oncogenes KRASA y KRASB (su nomenclatura proviene de la contracción de *Kirsten rat sarcoma*, el tumor donde fue identificado por primera vez), HRAS (*Harvey rat sarcoma*) y NRAS (descubierto en el neuroblastoma) [109]. Las cuatro isoformas codifican para una familia de proteínas RAS que pertenecen a una superfamilia de proteínas llamadas pequeñas GTPasas envueltas en la señalización celular de numerosos procesos celulares. La expresión génica de las isoformas de Ras muestra variaciones significativas entre los tejidos y durante el desarrollo. HRAS se encuentra altamente expresado en cerebro, músculo y piel, mientras que KRAS está altamente expresado en intestino, pulmones y timo. NRAS se expresa en los testículos y el timo [88].

Mutaciones en estos proto-oncogenes son encontrados en torno al 20-30% de todos los tumores humanos [89]. En torno al 99% de las mutaciones que ocurren en los genes Ras son mutaciones puntuales en el codón 12, 13 y 61. Estas mutaciones somáticas puntuales son típicamente heterocigotas y provocan una sustitución de aminoácido en la posición 12, 13 y 64 modificando la actividad GTPasa interna y por tanto acumulándose en forma activa, manteniendo en tanto

activas las rutas de proliferación y supervivencia celular activas [89,109] y promoviendo el desarrollo tumoral.

Las isoformas de Ras mutadas, así como la posición y los tipos de sustitución de las mutaciones varían entre los cánceres humanos. KRAS está mutado en casi en un 25% de todos los cánceres, predominantemente en adenocarcinomas (pancreático, colorectal, de pulmón, cervical, endometrial y del tracto biliar). NRAS está mutado en al menos un 10% de todos los tumores, con alta frecuencia en cánceres específicos como melanoma o ciertas leucemias. Las mutaciones de KRAS y NRAS son encontradas en tumores malignos mieloides. Finalmente, HRAS está mutado con baja frecuencia en carcinomas escamosos epiteliales como en cáncer de vejiga [87,88,109].

Las mutaciones en Ras presentan una alta variabilidad. Por ejemplo, en el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) el 90% de las mutaciones en KRAS ocurren en G12, mientras que en melanoma el 90% de las mutaciones de NRAS ocurre en Q61. En cuanto a la sustitución, tanto en PDAC como en cáncer de pulmón de células no escamosas (NSCLC), la mutación más frecuente es en G12, pero la mutación predominante en PDAC es G12D (sustitución de una glicina por un aspartato), mientras que en NSCLC es G12C (sustitución de glicina por cisteína) en un 42% de los casos [87].

Actualmente, el diagnóstico del estado mutacional de KRAS consiste en la evaluación de tejido tumoral, que debe ser seleccionado (conteniendo una proporción de células tumorales suficientes) para la extracción del material genético. A continuación, existen numerosas técnicas para analizar este material genético extraído y detectar el estado mutacional de KRAS, que varían en sensibilidad, tiempo de duración y costes (ver **Tabla 1** en *sección 1.1.1* para más detalles de métodos de detección de mutaciones puntuales en KRAS). Una de las técnicas más utilizadas para detectar la mutación de KRAS es el sistema Idylla (Biocartis, Bélgica). Este sistema está implantado en numerosos hospitales. Consiste en un sistema que integra la extracción de ácidos nucleicos, la retrotranscripción y la RT-qPCR para detectar las mutaciones. Se pueden analizar la presencia de hasta 39 mutaciones de genes de la familia RAS. La detección está basada en la tecnología *PlexPrime* y *PlexZyme*, que minimiza la señal inespecífica y aumenta la señal de las variantes que contienen la mutación puntual [110].

2.1.4. MiR-122 como ácido nucleico diana

El micro-ARN-122 (miR-122) constituye un microARN específico de tejido hepático, exclusivo de vertebrados y altamente conservado [111]. Se encuentra muy expresado en hígado cumpliendo

Capítulo 2. Introducción

una importante función de homeostasis. La función de miR-122 está estrechamente ligada con el metabolismo lipídico, concretamente con el metabolismo del colesterol, triglicéridos y fosfatasa alcalina en sangre. La inhibición de la expresión de miR-122 da lugar a una desregulación del metabolismo lipídico hepático y sistémico, así como una alteración de la diferenciación de hepatocitos [112]. Esto sugiere que el miR-122 participa en la expresión génica hepática. Además, miR-122 constituye un importante supresor tumoral ya que, la expresión reducida de miR-122 se asocia al desarrollo de hepatocarcinoma celular (HCC) [113] y parece tener un papel importante en la replicación del virus de la hepatitis C (VHC). En cambio, la sobreexpresión de miR-122 reduce las características tumorogénicas de las líneas celulares HCC [114,115].

Todas estas características, incluida su presencia en fluidos biológicos, hacen al miR-122 un potencial biomarcador. La presencia de miR-122 circulante en sangre es indicativo de daño hepático, de distintos posibles orígenes (alcohol, virus, químicos) [115]. Se han desarrollado varias terapias basadas en el uso de miR-122 mímico dirigido al tratamiento de HCC en los que su expresión está recudida y terapias basadas en anti-miR-122 dirigidas a tratar pacientes infectados por VHC y por virus de la hepatitis B (VHB) [116]. Por otro lado, varios estudios han mostrado que el miR-122 circulante puede ser biomarcador para el diagnóstico de la lesión hepática inducida por fármacos (DILI, del inglés *drug-induced liver injury*). La DILI es causada por medicación u otros componentes xenobióticos que pueden generar disfunción hepática y generar signos similares a otras afecciones hepáticas [115,117].

La detección de mir-122 es llevada a cabo con métodos basados en RT-qPCR, sin embargo, los pasos laboriosos de preparación de la muestra relacionados con los métodos basados en PCR dificultan la comparación entre las muestras de microARNs circulantes. Existen varios métodos publicados para la detección directa de miR-122, como son sistemas basados en sensores electroquímicos [118,119] o sistemas basados en fluorescencia [75,78].

2.1.5. Combinación de nanotecnología y química dinámica para la detección de ácidos nucleicos con resolución de una base mediante citometría de flujo

La mayoría de las aplicaciones DCL se han desarrollado mediante la conjugación de sondas DGL en soportes sólidos como membranas de nylon o *beads* magnéticas, de modo que se pueden utilizar plataformas de lectura estándar disponibles en los laboratorios de biología molecular (ver *sección 1.4.3*). En este trabajo, se aplicará el uso de nanopartículas de poliestireno bifuncionalizadas con estreptavidina y el fluoróforo 5(6)-carboxifluoresceína (FAM), en adelante nombradas como Strep-FAM-NPs (**13**), para capturar y detectar los productos formados en la reacción DCL, de modo que la reacción ocurrirá en primer lugar en solución, y será capturada posteriormente por las nanopartículas de poliestireno (**Figura 22**). Con este enfoque, el proceso de hibridación entre la sonda y la diana tiene lugar en solución, lo que significa que la hibridación será termodinámicamente favorable comparada con hibridaciones en fase sólida [81–83]. En esta prueba de concepto se han utilizado ácidos nucleicos diana sintéticos correspondientes a KRAS y miR-122, marcados tanto con fluorescencia como con biotina para monitorizar la captura y detección de estos ácidos nucleicos.



Figura 22. Detección de la secuencia KRAS con resolución de una base usando DCL en solución y Strep-FAM-NPs (13) bifuncionales. A) Esquema de flujo de trabajo: 1) Se añaden los reactivos DCL y se forma el producto DCL; 2) Se añaden Strep-FAM-NPs (13). Estas Strep-FAM-NPs (13) capturan el producto DCL. 3) Se realizan los pasos de lavado; 4) Lectura mediante FACS (Fluorescence-activated Cell Sorting). B) Representación esquemática de la etapa de hibridación (I), seguida de la incorporación dinámica de la SMART-Nucleobase (II) complementaria al nucleótido bajo estudio y marcada con biotina. A continuación, tiene lugar una reducción utilizando NaBH₃CN como agente reductor, fijando la reacción (III). Finalmente, el producto DCL es capturado por Strep-FAM-NPs (13) (IV). Reproducido de la referencia [120].

La citometría de flujo ha sido ampliamente utilizada para detectar proteínas de expresión celular (mediante anticuerpos fluorescentes), así como ADN y ARN celular (mediante sondas moleculares o compuestos intercalantes de ácidos nucleicos) así como otras moléculas celulares. Un ejemplo son las técnicas que combinan la hibridación *in situ* fluorescente junto con la citometría de flujo para detectar expresión de ácidos nucleicos en células [121,122]. Principalmente esta técnica se utiliza para detectar genes abundantemente expresados o elementos genómicos repetitivos. Otros tipos de análisis permiten la detección de ARN mensajero, mediante la unión de múltiples sondas en dicho ARN, generando una señal suficiente para ser detectada por citometría de flujo [122].

Pero la citometría de flujo no está limitada al análisis de moléculas en células. Cualquier partícula en suspensión que presente los marcajes adecuados puede ser detectada y analizada con una alta sensibilidad. Es por esto que la citometría de flujo constituye una plataforma de lectura de estas partículas, que permite analizar matrices sólidas como biosensores o microarrays para la detección de moléculas. Aprovechando estas características, y considerando su disponibilidad en laboratorios de todo tipo, este trabajo se ha desarrollado utilizando la citometría de flujo (FACS) como plataforma de lectura de ácidos nucleicos.

2.2. Resultados

2.2.1. Preparación de nanopartículas bifuncionales Strep-FAM-NPs (13)

Las nanopartículas de poliestireno bifuncionalizadas para capturar los productos biotinilados formados por la reacción DCL en solución, fueron diseñadas y sintetizadas para llevar unidas moléculas de estreptavidina y del fluoróforo 5(6)-carboxifluoesceína (FAM). Las PS-NPs amino funcionalizadas (1) fueron sintetizadas siguiendo protocolos SPPS previamente descritos [91]. Para asegurar la funcionalización covalente eficiente de la estreptavidina y de FAM de un modo controlado, se llevó a cabo una estrategia basada en la completa ortogonalidad entre los grupos protectores 9-fluorenilmetilocarbonilo (Fmoc) y el grupo 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1iliden)-3-etilo (Dde) [93]. Los agentes de acoplamiento utilizados fueron oxyma y N,N'diisopropilcarbodiimida (DIC). La funcionalización de las NPs en FAM-NPs (10) se logró eliminando el grupo protector Dde de la lisina. El fluoróforo se acopló a la amina libre resultante de la desprotección. A continuación, se llevó a cabo la desprotección del grupo Fmoc, obteniendo FAM-NPs (11). A continuación, la estreptavidina fue conjugada a través de un grupo glutaraldehído obteniendo las Strep-FAM-NPs (13). Finalmente fueron incubadas con una solución de Poloxámero 407 para favorecer su solubilidad en PBS [123,124]. En la Figura 23 se muestra en detalle la ruta de síntesis seguida para el desarrollo de las Strep-FAM-NPs (13). La descripción completa de la síntesis de las Strep-FAM-NPs (13) está detallada en la sección 6.2.2.3.



Figura 23. Esquema de síntesis de bifuncionalización de las PS-NPs (1) para la obtención de Strep-FAM-NPs (13). Las PS-NP aminofuncionalizadas (1) se bifuncionalizaron siguiendo protocolos de SPPS para obtener Strep-FAM-NPs (13). Reactivos y condiciones: (i) Fmoc-Gly-OH, Oxyma, DIC (1.400 rpm, 2h, 60°C); (ii) piperidina al 20% en DMF (1.400 rpm, 3 x 20 min, 25°C); (iii) Fmoc-PEG-OH, Oxyma, DIC (1.400 rpm, 2 h, 60°C); (iv) Fmoc-Lys-Dde (OH), Oxyma, DIC 1.400 rpm, 2 h, 60°C); (v) 3,5 hidroxilamina.HCl, imidazol, NMP (1.400 rpm, 1h, 25°C); (vi) FAM, Oxyma, DIC (1.400 rpm, 2h, 60°C); (vii) glutaraldehído al 25% en PBS (1.400 rpm, 16 h 25°C); (viii) 0.3 μg / mL de estreptavidina en PBS (1.400 rpm, 25°C, 16 h).

2.2.2. Caracterización de las nanopartículas bifuncionales Strep-FAM-NPs (13)

Una vez sintetizadas, las Strep-FAM-NPs (**13**) fueron caracterizadas. La distribución del tamaño de las nanopartículas fue determinada por dispersión dinámica de luz (DLS), mostrando una población monodispersa. El diámetro hidrodinámico fue 357.2 \pm 0.9 nm con un índice de polidispersión (PDI) de 0.066 (**Figura 24A**). El tamaño fue corroborado por microscopía de trasmisión electrónica (TEM) (**Figura 24E**). El valor del potencial zeta de las Strep-FAM-NPs (**13**) en agua fue ligeramente negativo (-37.1 mV \pm 0.8), comparado con las FAM-NPs (**10**) y aminometil-NPs (**1**), los cuales fueron -16.5 mV \pm 0.8 y +79.6 mV \pm 0.9, respectivamente (**Figura 24B**) En los tres casos, el potencial zeta mostró una carga homogénea de las nanopartículas.

La eficiencia de la conjugación del fluoróforo FAM a las nanopartículas fue monitorizada utilizando técnicas basadas en fluorescencia. La **Figura 24C** muestra un gráfico de dispersión representativo de citometría de flujo, mostrando un incremento de fluorescencia en el canal FITC de las Strep-FAM-NPs (**13**) comparadas con las aminometil-PS-NPs sin bifuncionalizar (aminometil-PS-NPs (**1**)). Este resultado fue confirmado por microscopía confocal (**Figura 24D**).



Figura 24. Caracterización de las Strep-FAM-NPs (13). A) Distribución del tamaño determinada por DLS; B) Valores del potencial zeta de las amino-metil PS-NPs (1) (azul) comparado con las FAM-NPs (10) (verde oscuro) y las Strep-FAM-NPs (13) (verde claro); C) Gráfico de dispersión obtenido por citometría de flujo representativo de las amino-metil PS-NPs (1) (azul) y las Strep-FAM-NPs (13) (verde); D) Análisis por microscopía confocal (objetivo 63×, barra de escala 20 µm, canal FITC) y E) evaluación de la morfología y tamaño por microscopía de transmisión electrónica (TEM).

2.2.3. Determinación de la concentración de Strep-FAM-NPs (13) usando un método espectrofotométrico

La concentración de las NPs (NPs/µL) fue determinada por un método espectrofotométrico basado en la turbidimetría de la suspensión de nanopartículas [101]. La curva de calibración estándar es obtenida de muestras con una concentración conocida de PS-NPs (1). La curva de calibración se ajusta a un modelo de regresión lineal, mediante el cual se pudo determinar el número de NPs por microlitro correspondiente a una unidad de DO600 para cada tamaño. Por lo tanto, en base a las curvas de calibración obtenidas utilizando lotes iniciales de suspensiones de NPs, se puede determinar el número de NPs en lotes finales midiendo su densidad óptica a 600 nm (**Figura 25**).



Figura 25. Curva de calibración de concentración de PS-NPs (1) (OD 600). La concentración de nanopartículas por microlítro a una D.O. de 600 nm es de 8.8×10^6 .

2.2.4. Determinación de la concentración de estreptavidina conjugada en las Strep-FAM-NPs (13)

La cantidad de estreptavidina unida a las NPs (0,06236 mmol / mL) fue medida mediante un ensayo BCA [125] (**Figura 26**), comparando la concentración inicial de proteína conjugada y la concentración final de proteína presente en los sobrenadantes después de la conjugación.



Figura 26. Curva de calibración BSA para el cálculo de la concentración de estreptavidina en las Strep-FAM-NPs (13). El eje Y muestra la absorbancia a 565 nm y el eje X muestra la concentración de BSA.

Considerando la estreptavidina inicial añadida y la estreptavidina final presente en el sobrenadante, así como considerando el número de Avogadro y el peso molecular de la estreptavidina (387.7 g / mol), se calculó la concentración de estreptavidina conjugada (60 mM) en las Strep-FAM-NPs (**13**). Esto permite monitorizar en todo momento la cantidad de estreptavidina presente en el sistema, para asegurar que es superior a la concentración de biotina usada en el sistema para evitar posibles competencias entre los productos DCL biotinilados y las SMART-Nucleobases biotiniladas sobrantes que no han participado en la reacción.

2.2.5. Ácidos nucleicos diana, diseño de sondas PNA, sondas DGL y SMART-Nucleobases para la detección de KRAS

A continuación, para proceder a la validación de estas nanopartículas para capturar ácidos nucleicos y productos DCL en solución, se llevaron a cabo diferentes ensayos de validación. Se utilizaron oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla (ssDNA, del inglés del inglés *"single-stranded DNA"*) correspondientes a la secuencia de KRAS wild-type que contiene el codón 12 y la secuencia de KRAS conteniendo una variación de nucleótido correspondiente a la mutación puntual KRAS c.34 G12C ambas con marcaje fluorescente (Cy5) (ssDNA-KRAS-wt-Cy5, y ssDNA-KRAS-G12C-Cy5) así como con biotina ssDNA-KRAS-wt-biotin. Las secuencias que contienen el codon 12 de KRAS se corresponden con el Transcript ID en GENBANK: NM_004985.4, y fueron analizadas por BLAST [126] (**Figura 27**).

Para llevar a cabo la validación del uso de química dinámica, se utilizaron dos sondas PNA complementarias para KRAS marcadas con Cy5 (PNA-KRAS-wt-Cy5) y biotina (PNA-KRAS-wt-Biotin) y se utilizó una sonda DGL complementaria a KRAS (DGL-K12RC), presentando la posición

83

abásica frente al primer nucleótido del codon 12 de KRAS (**Figura 27**). Las sondas PNA y DGL fueron sintetizadas por DESTINA Genomica S.L., para su síntesis, se siguieron protocolos SPPS seguidos por sucesivas rondas de acoplamiento de monómeros de PNA amino-protegidos previamente activados, seguido por la desprotección del grupo protector amino terminal y lavados tras cada etapa de síntesis. Todos los detalles de la síntesis de sondas PNA y DGL se detallan en la *sección 6.1.1. del capítulo 6. Metodología*.



Figura 27. Secuencias de ssDNA, secuencias y química de sondas PNA y DGL para la detección de KRAS. El nucleótido bajo estudio (nucleótido ubicado frente a la posición abásica de la sonda DGL) está resaltado en las secuencias de ssDNA. La posición abásica neutral se muestra en la sonda DGL como ausencia de base. Xx = mini-PEG; HAc = grupo acetato; Los monómeros PNA quirales se muestran resaltados en negro.

Las estructuras químicas de las SMART-Nucleobases utilizadas para la detección de los ácidos nucleicos diana con resolución de una base se muestran en la **Figura 28**. Concretamente se utilizaron dos SMART-Nucleobases, la SMART-Citosina-PEG₁₂-Biotin (de en adelante nombrada como SMART-C-Biotina) y la SMART-Adenina-Deaza-PEG₁₂-Biotin (en adelante nombrada como SMART-A-Biotina) proporcionadas por DESTINA Genómica.



Figura 28. Estructura química de la SMART-Cytosine-PEG₁₂-Biotin y SMART-Adenina-Deaza-enol-PEG₁₂-Biotin usadas en la detección del codón 12 de KRAS y miR122.

2.2.6. Optimización y validación de la captura del heterodúplex PNA:ADN por las Strep-FAM-NPs (13)

La capacidad de las Strep-FAM-NPs (**13**) para capturar los heterodúplexes PNA:ADN biotinilados fue evaluada en un ensayo tipo-sándwich, en el que la eficiencia fue analizada por citometría de flujo. Tras llevar a cabo una etapa previa de optimización del protocolo en la que se optimizaron los lavados (PBS Tween 0,1 %, SSC2× Tween 0,3 %, SSC2× BSA 1 %, PBS SDS 0,4 %) y la temperatura de hibridación en un rango desde temperatura ambiente hasta 70 °C, las condiciones de hibridación optimas consistieron en la incubación de los oligonucleótidos diana de ssDNA (1 μ M) con las sondas PNA (1 μ M) en SCD buffer (pH 6) a 40 °C previa desnaturalización a 80 °C durante 5 minutos. Finalmente, las Strep-FAM-Nps (**13**) fueron lavadas con PBS Tween 0,1 % para eliminar las adsorciones inespecíficas y se resuspendieron en PBS para su lectura mediante citometría de flujo (BD FACSCanto II ^M) (ver detalles metodológicos en *sección 6.2.1*).

Tras todo el proceso, la concentración final de estreptavidina presente en las Strep-FAM-NPs (**13**) que capturan el producto DCL es de 300 μ M. Esta concentración de estreptavidina es muy superior a la cantidad de producto DCL formado (suponiendo una eficiencia total de la reacción, podría formarse un total de 1 μ M de producto DCL biotinilado) junto con la cantidad de SMART-C-Biotina sobrante que no ha reaccionado (suponiendo una eficiencia total de la reacción, 4 μ M),

por tanto, evitándose la competición entre los productos DCL biotinilados formados y la SMART-C-Biotina sobrante de la reacción.

La **Figura 29A** muestra un esquema de la estructura tipo sándwich PNA-Biotin:ADN-Cy5:Strep-FAM-NPs formada. Debido a que las Strep-FAM-NPs (**13**) fueron marcadas con FAM y el heterodúplex PNA:ADN se encuentra marcado con el fluoróforo Cy5, la eficiencia de unión de las Strep-FAM-NPs (**13**) al heterodúplex fue confirmada mediante análisis por citometría de flujo, obteniendo una población 97.83 ± 0.70% FAM⁺/Cy5⁺, significando que este porcentaje de Strep-FAM-NPs (**13**) ha capturado el heterodúplex (**Figura 29B**). Los resultados obtenidos por FACS fueron analizados mediante la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) (n = 3) en el canal APC, mostrando un fuerte incremento de MFI cuando el constructo tipo sándwich se formó completamente, comparado mediante análisis *one-way ANOVA* (p < 0,0001) (**Figura 29C**).



Figura 29. Análisis FACS de la detección del heterodúplex PNA:ADN biotinilado por las Strep-FAM-NPs (13). A) Esquema de la estructura tipo sándwich formada. B) La estructura completa del ensayo tipo sándwich proporciona una población positiva FAM⁺/Cy5⁺. C) Representación MFI en el canal APC (n = 3) y análisis one-way ANOVA.

El análisis por citometría de flujo mostró que las Strep-FAM-NPs (**13**) dan lugar a una población FAM⁺/Cy5⁻ y, como control negativo, cuando el complejo tipo sándwich no está completo debido a la ausencia de la sonda marcada con biotina, la muestra sigue mostrando una población FAM⁺/Cy5⁻ (**Figura 30**). Esto confirma la ausencia de absorción no específica del ácido nucleico diana, en este caso, marcado con Cy5. Cuando la estructura tipo sándwich se forma completamente, genera una señal doble positiva (FAM⁺/Cy5⁺).



Figura 30. Análisis BD FACS para la validación de captura del heterodúplex PNA:ADN por las Strep-FAM-NPs (13). Las Strep-FAM-NPs (13) muestran una señal FAM⁺/Cy5⁻ (gráfico de dispersión izquierdo). En ausencia del elemento biotinilado, las Strep-FAM-NPs (13) generan una población FAM⁺/Cy5⁻, confirmando la ausencia de absorción no específica de la diana (gráfico de dispersión intermedio). Cuando el ensayo tipo sándwich está completo, las Strep-FAM-NPs (13) capturan el heterodúplex PNA:ADN y el sistema genera una señal FAM⁺/Cy5⁺ (gráfico de dispersión derecho).

A continuación, para validar la capacidad de las Strep-FAM-NPs (**13**) para capturar cualquier diana biotinilada, una segunda prueba de concepto se llevó a cabo. Para este ensayo, se utilizó una secuencia de ácido nucleico de KRAS biotinilada (ssDNA-KRAS-wt-biotin) y un PNA complementario marcado con el fluoróforo Cy5 (PNA-KRAS-wt-Cy5). La **Figura 31C** muestra un esquema de la estructura tipo sándwich PNA-Cy5:ADN-Biotin:Strep-FAM-NPs formada. Tras la formación del heterodúplex PNA:ADN, el producto fue capturado por las Strep-FAM-NPs (**13**), resultando en una población doble positiva 97.83 \pm 0.70 % FAM⁺/Cy5⁺ (**Figura 31B**). Los resultados obtenidos por FACS fueron analizados mediante MFI (n = 3) en el canal APC, mostrando un fuerte incremento de MFI cuando el constructo tipo sándwich se formó completamente, comparado mediante análisis *one-way ANOVA* (p < 0,0001) (**Figura 31C**).



Figura 31. Análisis FACS de la detección del heterodúplex PNA:ADN biotinilado por las Strep-FAM-NPs (13), en el que el ADN se encuentra biotinilado. A) Esquema representativo de la estructura tipo sándwich formada. B) Los resultados de FACS muestran que la estructura sándwich completa proporciona una población $FAM^+/Cy5^+$. C) Representación MFI en el canal APC (n = 3) y análisis one-way ANOVA. Se observa un fuerte aumento de MFI cuando la estructura tipo sándwich está completa.

El análisis por citometría de flujo mostró que las Strep-FAM-NPs (**13**) dan lugar a una población FAM⁺/Cy5⁻ y, como control negativo, cuando el complejo tipo sándwich no está completo debido a la ausencia de la diana marcada con biotina, la muestra sigue mostrando una población FAM⁺/Cy5⁻ (**Figura 32**). Esto confirma la ausencia de absorción no específica del PNA marcado, marcado con Cy5.



Figura 32. Análisis BD FACS para la validación de captura del heterodúplex PNA:ADN por las Strep-FAM-NPs (13), en el que el ADN está biotinilado. El gráfico de dispersión izquierdo muestra la señal FAM⁺/Cy5⁻ que proporcionan las Strep-FAM-NPs (13). En ausencia del elemento biotinilado, las Strep-FAM-NPs (13) generan una población FAM⁺/Cy5⁻, confirmando la ausencia de absorción no específica del PNA (gráfico dispersión intermedio). Cuando el ensayo tipo sándwich está completo, las Strep-FAM-NPs (13) capturan el heterodúplex PNA:ADN y el sistema genera una señal FAM⁺/Cy5⁺ (gráfico de dispersión derecho).

Basándose en estos resultados de citometría obtenidos usando productos moleculares biotinilados para KRAS, podemos concluir que no existen uniones inespecíficas en las Strep-FAM-NPs (**13**) del ácido nucleico diana y podemos confirmar que estas Strep-FAM-NPs (**13**) pueden capturar eficientemente heterodúplexes PNA:ADN sin importar la posición del componente biotinilado.

2.2.7. Evaluación de la estabilidad de la estreptavidina en las Strep-FAM-NPs (13)

La estabilidad de la unión de la estreptavidina en las Strep-FAM-NPs (**13**) fue evaluada. Para ello, las Strep-FAM-NPs (**13**) fueron lavadas tres veces en PBS e incubadas bajo diferentes condiciones (**Tabla 2**). Este ensayo permite establecer si la estreptavidina conjugada es estable y no se libera al medio, debido a que esto afectaría a la captura de los productos DCL biotinilados. Para ello las Strep-FAM-NPs (**13**) se incubaron bajo diferentes condiciones, como altas temperaturas o tratamiento con dodecilsulfato sódico (SDS) y Tween junto con el heterodúplex formado para comprobar si la estreptavidina se mantiene unida de un modo estable. Tras la incubación de las Strep-FAM-NPs (**13**), se centrifugaron a 13.400 rpm, los sobrenadantes fueron recolectados y medidos por un test de BCA. No se detectó estreptavidina en los sobrenadantes, por tanto, indicando que la unión de la estreptavidina es estable en las Strep-FAM-NPs (**13**).

Tabla 2. Diferentes condiciones para el ensayo de estabilidad de la estreptavidina. Las Strep-FAM-NPs (**13**) fueron incubadas en diferentes condiciones, tras lo cual, los sobrenadantes se recolectaron y analizaron mediante un ensayo BCA, mostrando una cantidad de estreptavidina negligible, por tanto, significando una unión estable de la estreptavidina en las Strep-FAM-NPs (**13**).

Elementos	Lavados	Abs 562nm	µg streptavidina	
+FAM-Strep-NPs (13)	0.1 % Twoon DBS 25.9C	-0,0031	0.074500017	
(control negativo)	0.1 % Tween PB3 25 =C		-0,074509617	
+FAM-Strep-NPs (13)				
+PNA-KRAS-Biotin	0.1 % Tween PBS, 25 ºC	-0,0008	0,015686328	
+ssDNA-KRAS-Cy5				
+FAM-Strep-NPs (13)	PBS, 70 ºC, 15 min	0,00285	0,158823376	
+FAM-Strep-NPs (13)	0,4% SDS PBS, 70 ºC, 15 min	-0,0052	-0,156862837	
+FAM-Strep-NPs (13)				
+PNA-KRAS-Biotin	PBS, 70 ºC, 15 min	-0,0074	-0,243137346	
+ssDNA-KRAS-Cy5				
+FAM-Strep-NPs (13)				
+PNA-KRAS-Biotin	0,4% SDS PBS, 70 ºC, 15 min	-0,0027	-0,058823715	
+ssDNA-KRAS-Cy5				

2.2.8. Detección de productos DCL por las Strep-FAM-NPs (13).

Tras la validación y optimización de la captura del heterodúplex PNA:ADN, se procedió a la evaluación de la capacidad del sistema para detectar la secuencia de KRAS con resolución de una base empleando la tecnología DCL, y, además, detectando la presencia de variaciones de nucleótido (*mismatches*) correspondientes a mutaciones puntuales presentes en el codón 12. Para ello, se diseñó una sonda DGL (DGL-K12RC) con una posición abásica frente al primer nucleótido del codón 12 de KRAS. La posición de la posición abásica significa que tras la hibridación de la sonda DGL K12RC con una secuencia de ácido nucleico KRAS de tipo salvaje, habrá una guanina frente a la posición abásica, por lo que se llevará a cabo la incorporación dinámica específicamente de la SMART-C-Biotina complementaria (**Figura 33, Figura 34**).







Figura 34. Esquema representativo de lectura de ácidos nucleicos mediante DCL y Strep-FAM-NPs (13). Tras la hibridación PNA:ADN-Cy5, la incorporación de la SMART-C-Nucleobase permite capturar el producto DCL biotinilado formado y detectarlo mediante citometría de flujo.

Las reacciones DCL se realizaron incubando el ssDNA (1 μ M) y la sonda DGL (1 μ M) junto con SMART-C-biotina (5 μ M) en las mismas condiciones descritas anteriormente para la formación de heterodúplex PNA:ADN (*sección 2.2.7*). Una vez que la temperatura alcanzó los 41 °C, se añadió cianoborohidruro sódico (NaBH₃CN) a una concentración final de 1 mM para reducir el enlace imínico y anclar la SMART y se incubó durante 1 hora. A continuación, la solución se enfrió a 25 °C, se añadieron 5 × 10⁸ Strep-FAM-NPs (**13**) (ver *sección 2.2.10* para la optimización del número de Strep-FAM-NPs (**13**)) y se incubó durante una hora. Finalmente, las nanopartículas fueron lavadas en PBS 0,1 % Tween para eliminar adsorciones inespecíficas y se resuspendieron en PBS para su lectura mediante citometría de flujo (ver detalles en *sección metodología 6.2.1*).

La **Figura 35A** muestra el esquema de formación del producto DCL capturado por las Strep-FAM-NPs (**13**). Una vez llevada a cabo la reacción, cuando se forma el heterodúplex y la SMART-C-Biotina se incorpora al sitio abásico, las Strep-FAM-NPs (**13**) son capaces de capturar el producto DCL, dando como resultado una población 98,23 \pm 1,06 % FAM⁺/Cy5⁺ (**Figura 35B3**), lo que indica la detección de la secuencia KRAS wild-type de forma eficiente. En cambio, en ausencia del elemento biotinilado, en este caso la SMART-C-Biotina, se generó una señal FAM⁺/Cy5⁻, confirmando la ausencia de señales inespecíficas y la especificidad del sistema detectando la secuencia KRAS con resolución de una base. Los resultados obtenidos por FACS fueron analizados mediante MFI (n = 3) en el canal APC, mostrando un fuerte incremento de MFI cuando el producto DCL se detectó, analizado mediante *one-way ANOVA* (p < 0,0001) (**Figura 31C**).



Figura 35. Detección de KRAS wild-type mediante DCL en solución y Strep-FAM-NPs (13). A) Esquema de la estructura tipo sándwich formada. B1) Las Strep-FAM-NPs (13) muestran una señal FAM⁺/Cy5⁻. B2) En ausencia de la SMART-C-Biotina, las Strep-FAM-NPs (13) generan una población FAM⁺/Cy5⁻, confirmando la ausencia de absorción no específica de la diana. B3) Cuando el producto DCL se forma, las Strep-FAM-NPs (13) capturan el producto DCL y el sistema genera una señal FAM⁺/Cy5⁺ que se corresponde con la detección de la secuencia KRAS wild-type con resolución de una base. C) Representación MFI en el canal APC (n = 3) y análisis ANOVA unidireccional. Se observa un fuerte aumento de MFI cuando se completa el complejo de ensayo tipo sándwich.

Estos resultados confirman que el proceso DCL se ha realizado con éxito en solución y los productos DCL son capturados por Strep-FAM-NPs (**13**) de forma específica. Es importante destacar que algunas limitaciones que afectan a la eficiencia de la hibridación del ADN en superficies, como la adsorción no específica de los oligonucleótidos unidos a la superficie sólida [81–83], se han evitado mediante el uso de este enfoque.

2.2.9. Optimización del número de Strep-FAM-NPs (13) usado para capturar el producto DCL formado en solución

Para optimizar el número de Strep-FAM-NPs (**13**) usado para capturar el producto DCL formado en solución, se llevó a cabo una reacción DCL y a continuación, el producto DCL formado fue incubado con diferentes cantidades de Strep-FAM-NPs (**13**) (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹) siguiendo las condiciones de la *sección 2.2.6*. Después, las muestras fueron lavadas con PBS Tween 0,1 %, resuspendidas en PBS y analizadas por citometría de flujo. Un incremento de la señal MFI fue obtenido a partir de 10⁸ Strep-FAM-NPs (**13**). Sin embargo, si la cantidad de Strep-FAM-NPs (**13**) continúa aumentando, la señal también disminuye, por tanto, para ajustar la cantidad de Strep-FAM-NPs (**13**), se realizó un ensayo con las cantidades 10⁸, 5 × 10⁸ and 10⁹ de Strep-FAM-NPs (**13**) y la señal más intensa fue obtenida usando 5 × 10⁸ Strep-FAM-NPs (**13**) (**Figura 36**). Por tanto, este número de Strep-FAM-NPs (**13**) fue determinado como el óptimo para capturar el producto DCL en los ensayos.



Figure 36. Cálculo del número óptimo de Strep-FAM-NPs (13) para capturar el producto DCL en solución. A) Las muestras fueron analizadas por FACS mediante MFI (n = 3) obtenida en el canal APC, representada en el eje y. El número de Strep-FAM-NP (13) comparados se representa en el eje x. B) El gráfico de dispersión muestra la señal obtenida por las Strep-FAM-NPs (13) (gris), y las cantidades de 10⁸ (rojo), 5 × 10⁸ (verde) y 10⁹ (azul) de Strep-FAM-NPs (13) capturando el producto DCL en solución. 5 × 10⁸ Strep-FAM-NPs (13) mostró ser la cantidad de nanopartículas óptima para capturar el producto DCL en solución.

2.2.10. Curva de calibración de detección de KRAS con resolución de una base en plasma humano

Para asegurar la capacidad analítica de las Strep-FAM-NPs (**13**) para capturar y detectar la diana KRAS en un medio biológico complejo, se generó una curva de calibración mediante la adición de diferentes cantidades de la secuencia ssDNA-KRAS-wt-Cy5 (2.5 pmol, 12,5 pmol, 25 pmol, 37,5 pmol y 50 pmol) en 10 μL de plasma humano, seguido de una reacción DCL en un volumen total de 50 μL. Cada condición se analizó mediante MFI obtenido en el canal APC. El plot de los valores MFI frente a las cantidades añadidas mostró una regresión lineal, confirmando la idoneidad de las Strep-FAM-NP (**13**) para capturar y detectar la secuencia diana de KRAS de tipo salvaje (**Figura 37**) en medios biológicos complejos.

Los experimentos se repitieron tres veces para cada condición (n = 3), mostrando un coeficiente de variación del 5% al 15% (**Tabla 3**). El límite de detección (LoD) fue de 2,5 ± 0,09 pmoles (12,5 nM) (con un ratio *signal-to-noise* de 2,20 ± 0,08), correspondiente a la detección de 1,5055E + 12 moléculas de la diana. La regresión lineal de la curva de calibración muestra la capacidad analítica del sistema y el límite de detección asegura que este método podría utilizarse para muestras de tejido o a nivel celular. Sin embargo, para su aplicación en biopsia líquida y detección de ácidos nucleicos circulantes en fluidos biológicos, es necesario llevar a cabo una optimización que permita llegar a LoD en el rango fentomolar o attomolar.

Tabla 3. Cálculo de la media de la mediana de intensidad de fluorescencia obtenida en el canal APC mediante análisis FACS a diferentes cantidades de diana capturado en plasma humano.

Target	Media MFI-APC	SEM	Coeficiente de	Signal-to-
Taiget	(n = 3)	SEIVI	variación	Noise ratio
50 pmoles	1531	123,6	13,98 %	3,9
37,5 pmoles	1452	130,0	12,66 %	3,7
25 pmoles	1279	103,8	14,06 %	3,26
12,5 pmoles	951,0	47,51	8,653 %	2,42
2,5 pmoles	863,3	34,17	6,855 %	2,2
Blank	392,4	-	-	-



Figura 37. Curva de calibración de la secuencia sintética KRAS-wt-Cy5 en plasma humano. Los puntos representan la media y SEM (n = 3) de MFI en el canal APC (eje y) frente a cada cantidad añadida de diana (eje x). La curva de calibración muestra un $R^2 = 0.9556$, mostrando la idoneidad de las Strep-FAM-NPs (13) para capturar productos DCL en una matriz biológica compleja.

2.2.11. Discriminación la presencia de variaciones de nucleótido correspondientes a mutaciones puntuales en el codón 12 de KRAS: detección de KRAS G12C

Para evaluar la especificidad del sistema para discriminar de un desajuste correspondiente a la mutación puntual KRAS G12C, se realizaron dos reacciones DCL por triplicado utilizando la secuencia ssDNA-KRAS-wt-Cy5 y la secuencia ssDNA-KRAS-G12C-Cy5 junto con ambas SMART-C-Biotina y SMART-A-Biotina. Los resultados mostraron un fuerte aumento de la MFI en el canal APC cuando la incorporación de la SMART-Nucleobase es específica (SMART-C-Biotina en la secuencia de tipo salvaje de KRAS y SMART-A-Biotina en la secuencia mutada de KRAS G12C) (Figura 38, Figura 39).



Figura 38. Esquema de hibridación de la sonda DGL-K12RC con los targets ssDNA-KRAS-wt-Cy5 y ssDNA-KRAS-G12C-Cy5, mostrando la variación de nucleótido correspondiente a la mutación KRAS G12C.





Figura 39. Ensayo de especificidad para la discriminación desajustes correspondientes a la mutación de KRAS G12C. SC = SMART-C-Biotina. SA = SMART-A-Biotin. Los valores de MFI en el canal APC de cada condición se compararon el estadístico one-way ANOVA. En presencia de la cadena wild-type de KRAS, SMART-C-Biotina es incorporada en la posición abásica, mientras que en presencia de la cadena KRAS G12C, SMART-A-Biotina es incorporada en la posición abásica.

Estos resultados han demostrado que las Strep-FAM-NPs (**13**) son adecuadas para capturar ácidos nucleicos en una matriz biológica compleja y, mediante el análisis FACS, el sistema es capaz de detectar la presencia de variaciones de nucleótido correspondientes a mutaciones puntuales en el codón 12 de KRAS. La metodología desarrollada en este trabajo se puede realizar en tres horas utilizando plataformas de lectura ampliamente disponibles como el citómetro de flujo con un límite de detección de 2.5 pmoles (12,5 nM). Aunque aún es necesario realizar una mayor optimización, esta primera prueba de concepto muestra que este sistema podría ser adaptable y comparable a otros existentes que se utilizan actualmente para detectar mutaciones puntuales [127–130].

2.2.12. Detección de productos de PCR KRAS

Como prueba de concepto, se llevó a cabo la detección de amplicones de KRAS producidos por PCR. Se diseñaron *primers* (ver secuencia en **Tabla 4**) para obtener un amplicón de 79 pares de bases de longitud (**Figura 40**), conteniendo el codón 12 de la secuencia KRAS wild-type. La PCR se realizó con material genético extraído de la línea celular H1299 (NCI-H1299) obtenida de ATCC (Manassas, VA, USA), una línea celular tumoral de pulmón no microcítico que presenta una expresión de KRAS wild-type (**Figura 41**). El amplicón obtenido fue incubado con una sonda PNA de detección marcada con Cy5 adicional (ver secuencia en **Tabla 4**) y a continuación incubado

con las sondas o bien PNA-KRAS-wt-biotina#2 para capturar y detectar el amplicón, y, o bien con la sonda la sonda DGL-K12RC para detectar el amplicón con resolución de una base.



Figura 40. Secuencia del exón 2 de KRAS conteniendo el codón 12 (azul claro). La zona de hibridación de los primers para producir el amplicón está señalada en naranja. El amplicón es marcado con un PNA de detección marcado con Cy5 (verde). La sonda PNA-KRAS-wt-biotina o la sonda DGL-K12RC hibridan en la región que contiene el codón 12. El nucleótido detectado está señalado en rojo. El codón 13 está marcado en amarillo.



Figura 41. Resultado obtenido mediante Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA) que muestra la detección de una banda de 89 pares de bases correspondiente al amplicón de KRAS.

Tabla 4. Secuencias de primers utilizados en la PCR de KRAS y sonda PNA de detección del amplicón KRAS.

Primers.	Secuencia (5'-3')	
Forward primer	CAGTCATTTTCAGCAGGCC	
Reverse primer	GCTGTATCGTCAAGGCACTCT	
Sonda PNA.	Secuencia (N-C)	
PNA-KRAS-wt-Cy5 #2	Cy5-TACCACAAGTTTATATTC	

El producto de PCR fue detectado mediante citometría de flujo, mostrando que las Strep-FAM-NPs (**13**) son aptas para capturar productos de PCR mediante este sistema, mostrando una doble población FAM⁺/Cy5⁺ (**Figura 42A**). En este primer enfoque, el resultado de especificidad de una base mostró ser negativo, posiblemente debido a que la reacción DCL fue inhibida por algún reactivo o condición propia de la PCR (como la existencia de un pH básico). Por ello, debe realizarse una mayor optimización que permita detectar el producto de PCR con resolución de una base (**Figura 42B**).



Figura 42. BD FACS análisis para la detección de productos de PCR de KRAS. A) Detección del amplicón con PNA-KRAS-wt-Biotina. Tanto las Strep-FAM-NPs (**13**) como el control negativo de la PCR proporcionan una señal FAM⁺/Cy5⁻ (gráficos izquierdo e intermedio). En la muestra positiva, el amplicón genera una población doble positiva FAM⁺/Cy5⁺ (gráfico derecho). B) Detección del amplicón con resolución de una base. La especificidad de una base mostró una población simple FAM⁺/Cy5⁻, por tanto, no detectándose, posiblemente inhibida por algún reactivo o condición propia de la PCR.

2.2.13. Validación de las Strep-FAM-NPs (13) para capturar el heterodúplex PNA:ssDNA-miR-122

Además del desarrollo de este sistema mediante la detección de secuencias de KRAS, esta prueba de concepto ha sido validada para detectar secuencias correspondientes al microARN-122. Para ello, se diseñó un oligonucleótido mímico de miR-122 (ssDNA-miR-122-Cy5) así como su sonda PNA y sonda DGL complementaria (**Figura 43**).



Figura 43. Secuencias de ssDNA, sondas PNA y DGL para la detección de miR-122. El nucleótido bajo estudio (nucleótido ubicado frente a la posición abásica del PNA) está resaltado en las secuencias de ssDNA. La posición abásica neutral se muestra en la sonda DGL como ausencia de base. Xx = mini-PEG; HAc = grupo acetato; Los monómeros PNA quirales se muestran resaltados en negro.

De nuevo, la eficiencia de las Strep-FAM-NPs (**13**) fue evaluada mediante un ensayo tipo sándwich, seguido por análisis mediante citometría de flujo, en el que las Strep-FAM-NPs (**13**) y la muestra control mostraron una señal simple FAM⁺/Cy5⁻. La **Figura 44A** muestra un esquema de la estructura tipo sándwich formada. Cuando el complejo tipo-sándwich está completo, se observa una población 98.76 ± 2.30 % FAM⁺/Cy5⁺. En ausencia del componente biotinilado, se observa una población FAM⁺/Cy5⁻ (**Figura 44B**). Los resultados obtenidos por FACS fueron analizados usando la MFI del canal APC (n = 3) y analizados mediante el estadístico *one-way ANOVA*, mostrando un fuerte incremento de MFI cuando el constructo sándwich está completo (p < 0,0001) (**Figura 44C**).



Figura 44. Análisis BD FACS para la validación de Strep-FAM-NP (13) para capturar el heterodúplex biotinilado PNA:miR-122-Cy5. A1) Strep-FAM-NPs (13) proveen una población FAM⁺/Cy5⁻. A2) La estructura de ensayo de tipo sándwich no se puede formar en ausencia del componente biotinilado. A3) La estructura del ensayo tipo sándwich está completa, proporcionando una población FAM⁺/Cy5⁺. B) Representación de MFI en el canal APC (n = 3) y análisis one-way ANOVA.

2.2.14. Detección de productos DCL por Strep-FAM-NPs (13): detección de miR-122 con resolución de base única

Finalmente se evaluó la capacidad del sistema para detectar la secuencia de miR-122 con resolución de una base única. Se diseñó una sonda DGL (DGL-miR-122) con una posición abásica frente a una guanina, dirigiendo la incorporación de una SMART-C-biotina complementaria (**Figura 45**).



Figura 45. Esquema de reacción química para la detección de miR-122. La hibridación entre la sonda DGL y la diana genera una posición abásica frente al nucleótido bajo estudio, en este caso, una guanina. A continuación, la incorporación de la SMART-C-Biotina complementaria genera una estructura secundaria iminio que es reducida con cianoborohidruro sódico. El producto biotinilado es capturado por las Strep-FAM-NPs (**13**) para su lectura mediante FACS. Ver Figura 45 en detalle en Apéndice 2.

La eficiencia para capturar el producto DCL en solución se evaluó mediante citometría de flujo. Las Strep-FAM-NPs (**13**) y la estructura tipo-sándwich incompleta (en ausencia de SMART-Cbiotina) proporcionan una población FAM⁺/Cy5⁻ (**Figura 46 A1**). En ausencia SMART-Nucleobase biotinilada, se observa una población FAM⁺/Cy5⁻ (**Figura 46 A2**). Cuando se forma el heterodúplex DGL:miR-122-Cy5 y la SMART-C-Biotin se incorpora a la posición abásica, las Strep-FAM-NPs (**13**) capturan el complejo, proporcionando una población 98,23 ± 1.06% FAM⁺/Cy5⁺, lo que indica la detección de miR-122 con resolución de base única (**Figura 46 A3**). Los resultados de FACS se analizaron mediante MFI en el canal APC (n = 3) y se analizaron mediante el estadístico *one-way ANOVA*, mostrando un fuerte aumento de MFI cuando la estructura tiposándwich es completa (p < 0,0001) (**Figura 46 C**).



Figura 46. Detección de miR-122 con resolución de base única utilizando DCL en solución y Strep-FAM-NP (13). A) Análisis FACS de la reacción de DCL para la secuencia de miR-122 (ssDNA-miR-122-Cy5). A1) Strep-FAM-NPs (**13**) proporcionan una población FAM⁺/Cy5⁻. A2) El ensayo está incompleto debido a la ausencia de SMART-C-Biotina de modo que las Strep-FAM-NPs (**13**) no pueden capturar el producto DCL, mostrando una población FAM⁺/Cy5⁻. A3) El ensayo completo da como resultado una población FAM⁺/Cy5⁺ indicativa de la detección de la secuencia de miR-122 detección con resolución de base única. C) Representación de MFI en el canal APC (n = 3) y análisis one-way ANOVA.

2.3. Discusión

En este trabajo se han desarrollado nanopartículas bifuncionales para la captura de productos DCL, en las que se han realizado procesos de hibridación en fase solución, que permiten la detección de ácidos nucleicos con resolución de base única mediante citometría de flujo. Esta es la primera vez que los procesos DCL se han realizado en solución (lo que significa que los procesos de hibridación son termodinámicamente favorables) y los productos DCL se han leído utilizando plataformas basadas en *beads*. Para ello, se desarrollaron y caracterizaron nuevas nanopartículas bifuncionales, Strep-FAM-NPs (**13**), que contienen estreptavidina y fluoresceína. Estos experimentos iniciales de prueba de concepto han demostrado que estas nuevas nanopartículas bifuncionales son capaces de capturar eficientemente el heterodúplex de PNA:ADN biotinilado y marcado con fluorescencia. El sistema puede detectar productos DCL en una matriz biológica compleja como plasma humano, y es específico para discriminar variaciones de una sola base, en este caso, discriminando variaciones de nucleótido correspondientes a secuencias de tipo salvaje de KRAS y secuencias mutadas de KRAS G12C.

La metodología desarrollada en este trabajo se puede realizar en tres horas mediante citometría de flujo, ampliamente utilizada en laboratorios moleculares. Se ha establecido una curva de calibración que muestra regresión lineal, mostrando la capacidad analítica del sistema, con un límite de detección de 2,5 pmoles (12,5 nM). Aunque en este primer trabajo se han desarrollado las nanopartículas y las condiciones para llevar a cabo DCL en solución, esta plataforma puede ser desarrollada como sistema comparable a otras metodologías existentes que se utilizan para detectar mutaciones puntuales. Además, la amplia posibilidad de conjugar cargas de diferentes naturalezas como diferentes fluoróforos y moléculas a los PS-NP, junto con la tecnología DCL, conducirá al desarrollo de nuevas estrategias para el análisis de ácidos nucleicos con resolución de base única. En este trabajo también se ha evaluado la capacidad de detectar productos de PCR, mostrando que las nanopartículas en combinación con sondas PNAs son capaces de capturar y detectar específicamente amplicones producidos por PCR mediante citometría de flujo, aunque es necesaria una mayor optimización para detectarlos con resolución de una base.

Además, este estudio, que se puede adaptar a otras químicas utilizadas en pruebas moleculares, ya que permite la captura de productos moleculares biotinilados producidos en solución, abre oportunidades para desarrollar nuevos formatos de ensayo para el genotipado de ácidos nucleicos y la detección de secuenciación altamente homóloga directamente desde fluidos corporales o amplicones obtenidos por PCR.



PARTE I

Detección de secuencias ADN α-satélite humanas con resolución de una base mediante marcaje por química dinámica y FISH (Objetivo 2)

Capítulo 3. Parte I. Detección de secuencias ADN α-satélite humanas con resolución de una base mediante marcaje por química dinámica y FISH (Objetivo 2)

3.1. Introducción

3.1.1. Justificación

La detección de ácidos nucleicos mediante técnicas de hibridación *in situ* (ISH) permite localizar secuencias génicas a nivel de células individuales o en tejidos, frente a las técnicas basadas en RT-qPCR y secuenciación, donde el análisis de ácidos nucleicos se lleva a cabo mediante la extracción y homogeneización de material genético de células y tejidos [42,44,131]. Si bien las técnicas ISH detectan loci de genes, modificaciones genómicas (como reordenamientos, duplicaciones, deleciones, entre otras), distribución de transcritos como ARN mensajero o ARNs no codificantes, las técnicas ISH, por lo general, están limitadas a la detección de la molécula de ácido nucleico, sin posibilidad de genotipar las secuencias detectadas [131].

A pesar del éxito de las técnicas de secuenciación, aún existen limitaciones para secuenciar adecuadamente algunos tipos de secuencias genómicas. Debido a su naturaleza, las secuencias genómicas repetidas (como satélites centroméricos, mini- y microsatélites, ADN ribosómico, o elementos dispersos (*Short interspersed nuclear element (SINEs*), *Long interspersed nuclear element (LINEs*) entre otras) presentan limitaciones importantes para ser secuenciadas, siendo en tanto difícil estudiar variaciones en número de copias y variaciones en sus secuencias [132–134]. Esto hace difícil estudiar su implicación en la función del genoma y su papel en la aparición de enfermedades. Si bien los nuevos enfoques de secuenciación de fragmentos largos y análisis computacionales permiten establecer secuencias consenso de estas regiones repetidas, aún pueden mejorarse técnicas que permitan estudiar la variabilidad de estas regiones de un modo preciso.

En este contexto, en este trabajo, presentamos una prueba de concepto en la que validamos la aplicación del marcaje por química dinámica (DCL) junto con técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para detectar secuencias genómicas repetidas con resolución de una base. La validación de la aplicación del marcaje por química dinámica *in situ* se realizará en la secuencia α -satélite humana como diana, una secuencia de 171 pb centromérica repetida y organizada en diferentes *tándems* a lo largo del genoma que pueden alcanzar una longitud del orden de megabases [135].

Variaciones en la secuencia α-satélite humana pueden diferenciar cromosomas individuales, haplotiplos poblacionales y estar relacionadas con la aparición de inestabilidad centromérica y reclutamiento ineficiente de proteínas cinetocóricas [136]. Sin embargo, la longitud de estas regiones repetidas hace difícil estudiar variaciones en su secuencia, como son variaciones de un nucleótido en las unidades de repetición de estas secuencias que puedan estar relacionados con enfermedades. El enfoque desarrollado en este capítulo abre la posibilidad, por un lado, de optimizar y aplicar el marcaje por química dinámica *in situ* detectando secuencias con resolución de una base de un modo robusto, debido a su carácter repetido, y, además, abre la posibilidad de detectar variaciones de nucleótido en secuencias repetidas.

3.1.2. El problema de la secuenciación de secuencias genómicas repetidas

En los últimos años, los métodos de secuenciación y los análisis computacionales han mejorado considerablemente, permitiendo secuenciar y analizar genomas en un corto plazo de tiempo y a costes reducidos. Los métodos *Next-generation sequencing (NGS), Whole-Transcriptome Sequencing (WTS,* también conocido como *RNA-seq*) u otras técnicas como *Chromatin Inmunoprecipitation* (*ChIP-seq*) y la secuenciación de metilaciones del ADN son utilizadas para secuenciar genomas, transcriptomas y el estado de metilación del genoma. Sin embargo, aún existen algunas limitaciones, una de ellas relacionada con la secuenciación de regiones de ADN repetidas [132–134].

Las secuencias de ADN repetidas constituyen un alto porcentaje del material genético de una célula, pudiendo constituir hasta el 50 % del total de material genético. Estas secuencias repetidas pueden organizarse en tándem, unas tras otras, o encontrarse dispersas por el genoma. Las secuencias repetidas en tándem se dividen según el elemento repetido, variando desde 2-10 pb (microsatélites), hasta 100 pb (minisatélites) o mayores de 100 pb (satélites centroméricos). El ADN ribosómico (16S, 18S, 5,8S y 28S), codificantes de ARN ribosómico, también se encuentra organizado en tándem. Los elementos dispersos se encuentran distribuidos a lo largo del genoma y pueden ser secuencias de longitud corta (SINEs, del inglés *"Short Interspersed Nuclear Elements"*) o larga (LINEs, del inglés *"Long Interspersed Nuclear Elements"*). Estas secuencias, tienen funciones estructurales y de estabilidad del genoma, participan en la evolución y, como en el caso de algunas secuencias LINEs, actúan como elementos de secuencia independientes [137,138].

Los diferentes métodos actuales de secuenciación del genoma están basados principalmente en generar pequeños fragmentos de ADN que son secuenciados y, posteriormente, ensamblados. Sin embargo, las secuencias repetidas en tándem, aparecen en diferentes grupos individuales a lo largo del genoma con una alta coincidencia entre estos. Por ejemplo, existe al menos un satélite centromérico por cada cromosoma, o el ADN ribosómico aparece en varios cromosomas humanos. Cuando estas regiones se fragmentan en secuencias cortas y ensamblan para su secuenciación, se generan fragmentos idénticos, que se ensamblan de forma irregular, generando ensamblajes de regiones genómicas totalmente diferentes y difícilmente distinguibles. Otro de los problemas es que las secuencias repetidas dispersas por el genoma se unen inespecíficamente, formándose uniones de estas repeticiones al ensamblarse que no se corresponde con su organización real [132–134].

Se han realizado importantes avances para lograr ensamblar y secuenciar con éxito estas secuencias. Principalmente, algunos enfoques actuales permiten secuenciar fragmentos de gran longitud, hasta 40,000 pares de bases (*MiniON, Oxford Nanopore Technologies*) [139]. Si bien esto evita generar fragmentos pequeños para luego ensamblarlos, la secuenciación de moléculas de gran longitud puede provocar errores de lectura, por tanto, generando dificultades para detectar variaciones en la secuencia, como polimorfismos, de estas regiones repetidas. Además, regiones como las centroméricas y teloméricas presentan longitudes muy superiores a los fragmentos que pueden secuenciarse actualmente.

Los avances computacionales también han permitido facilitar el ensamblaje y lectura de las secuencias repetidas. Los análisis computacionales basados en la información de los extremos emparejados y en el desarrollo de algoritmos para manejar las ambigüedades existentes en la secuenciación, así como en los datos obtenidos de múltiples lecturas y análisis estadístico permiten establecer las secuencias consenso más probables de estas regiones [132]. Sin embargo, aún es necesario sofisticar algunos métodos que permitan aclarar las variaciones tanto en el número de copias, en la disposición, así como la secuencia. Esto finalmente permitirá comprender con mayor claridad el papel de estas regiones en la función celular y esclarecer si existen marcadores en estas regiones asociados a enfermedades.

3.1.3. Secuencia ADN α-satélite

El ADN α -satélite humano constituye entre el 2-5 % del genoma humano y está formado por la repetición de monómeros de 171 pb de longitud que se organizan en bloques altamente repetidos (HOR, del inglés *"High Order Repeat"*) de una longitud que puede variar de 1 a 3 kb, que, a su vez, se agrupan en 46 regiones individuales en todo el genoma que pueden abarcar longitudes que varían entre 200 a 5000 kb de longitud. Estos monómeros de 171 pares de bases comparten un alto porcentaje de identidad entre sí (**Figura 47**) [135,140].



Figura 47. Localización y organización de la secuencia α-satélite humana. Esta secuencia se organiza en el centrómero en órdenes altamente repetidas (HOR), a su vez constituido por la repetición de un monómero de 171 pb. Reproducido de la referencia [135].

Estas secuencias tienen una clara función en la estabilidad genómica, presentando sitios de unión a proteínas que confieren estabilidad del cinetocoro y participan en la división celular. El estudio de la secuencia α -satélite se ha realizado principalmente mediante enzimas de restricción y secuenciación, y la secuencia de los monómeros, número de monómeros y su orden definen a una unidad HOR, que le confiere especificidad de cromosoma [135,140,141]. Varios estudios han señalado que las variaciones en estas regiones tienen un impacto importante en la estabilidad genómica, la función cromosómica y la división celular. La presencia de determinadas variaciones de HOR se ha asociado a una función del centrómero deficiente a la hora de reclutar proteínas centroméricas [135,140,142].

Los monómeros de 171 pares de bases comparten entre el 60 a 100% de identidad, y la alta composición idéntica hace que técnicamente sea difícil llevar a cabo métodos de secuenciación en estas regiones. Sin embargo, los últimos años, numerosos estudios de clonación y secuenciación junto con FISH ha identificado diversidad presente en patrones de organización de este genoma [135]. Algunos ejemplos de variaciones en los bloques HOR son, por ejemplo, el HOR del cromosoma X (HSAX) está definido por un HOR de 12 monómeros, mientras que el HSA8 está definido por un HOR de 6 monómeros. HSA17 presenta una región centromérica compleja
con tres regiones alfa satélite distintas (D17Z1, D17Z1-B y D17Z1-C). Además, se ha identificado un SNP en D17Z1 que introduce un sitio de restricción para EcoRI y otro SNP en D17Z1 que introduce un sitio de restricción HindIII en el monómero 13, generando haplotiplos poblacionales diferentes [135,143].

Otros polimorfismos incluyen, por ejemplo, deleciones de tres monómeros (10-12) formando HORs de 13 monómeros, e incluso deleciones causadas por entrecruzamiento cromosómico, que generan HORs de 15 a 11 monómeros. Algunos estudios han señalado que las diferencias en tamaño y secuencia de los HORs influye en un reclutamiento ineficiente de proteínas centroméricas, sugiriendo que las variaciones en estas regiones pueden tener consecuencias en la funcionalidad, inestabilidad genómica de cromosomas y aneuploidía. Más aun, los fallos de la maquinaria de replicación en cáncer pueden provocar la aparición de variaciones en estas secuencias, pudiendo presentar una heterogeneidad pronunciada en el contexto centromérico [144,145].

3.1.4. PNA-FISH: Aplicación de sondas PNA en FISH

Debido a su alta afinidad, especificidad y estabilidad de las sondas PNA, una de las aplicaciones más extendidas es su aplicación en técnicas FISH para detectar secuencias abundantemente expresadas o secuencias repetidas, técnica denominada como PNA-FISH. Una de estas principales aplicaciones es detectando secuencias teloméricas con PNA marcados fluorescentemente. Los telómeros constituyen repeticiones en tándem de la secuencia 5'-TTAGGG-3' constituyendo regiones que alcanzan hasta las megabases de longitud en los extremos de cromosomas. Su función está relacionada con la estabilidad cromosómica, evitando su acortamiento en cada división celular y evitando fusiones entre cromosomas. Conforme aumenta la vejez, se produce un mayor acortamiento telomérico que puede finalmente afectar a la expresión génica, y, en cáncer, la expresión continuada de la telomerasa evita el acortamiento telomérico, permitiendo a las células tumorales crecer indefinidamente.

Dado que los PNA presentan una afinidad mucho mayor por su secuencia diana que la propia hibridación ADN:ADN, la señal se detecta con mucha precisión y puede ser cuantificada, técnica conocida como Q-FISH [146]. Mediante Q-FISH se detecta la longitud telomérica en estudios de senescencia celular y desarrollo de tumores, comparando la longitud de los telómeros entre muestras tumorales o sanas. Además, se ha desarrollado un protocolo Q-FISH de alto rendimiento (HT-Q-FISH, del inglés *"high throughput Q-FISH"*) [147], utilizando equipos

109

automatizados para analizar gran cantidad de células y comparar señales teloméricas de núcleos en interfase de forma automática. Otras secuencias abundantemente expresadas, como secuencias centroméricas o repeticiones CAG se detectan mediante el uso de PNA. Debido a su especificidad, es posible realizar mezcla de sondas, utilizándose los PNA para visualizar los 24 cromosomas y detectar anomalías genómicas como reordenamientos [148–150].

Otra de las aplicaciones principales de las sondas PNA es el diagnóstico de enfermedades infecciosas, concretamente detectando agentes infecciosos mediante un frotis de sangre a partir de un hemocultivo positivo, pudiendo detectar la presencia de patógenos de forma rápida y rentable [151]. La técnica se realiza mediante la detección de ARN ribosómico (ARNr), principalmente ARNr 16S [152–154]. Las secuencias de ARNr se encuentran abundantemente expresadas en el citoplasma celular, por lo que pueden detectarse directamente on PNA marcados fluorescentemente mediante FISH. El ARNr 16S es ampliamente utilizado en la filogenia y taxonomía de microorganismos. Esto es debido a que se trata de una secuencia altamente conservada y que, debido a esto, las variaciones en esta secuencia son mínimas, utilizándose para establecer relaciones filogenéticas, evolutivas y taxonómicas entre especies. Esto ha sustituido a la tradicional clasificación de microorganismos en base a sus características morfológicas y cultivos. Sin embargo, la filogenia a partir de la secuencia ARNr 16S no está exenta de limitaciones cuando se analiza mediante RT-qPCR, debido principalmente a contaminaciones con otras especies bacterianas [155].

Una de las ventajas de realizar PNA-FISH para la identificación de patógenos es la reducción del período de diagnóstico y la precisión de los resultados, contribuyendo a la mayoría de tratamientos específicos y administración de antibióticos para evitar resistencias antimicrobianas. Los primeros ensayos de diagnóstico de PNA-FISH aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) fueron para la identificación de *Staphylococcus aureus, Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*, si bien hoy día existen otras sondas disponibles para la detección de patógenos [151,156].

3.1.5. Aplicación de química dinámica *in situ* para detectar secuencias repetidas con resolución de una base

En este trabajo se propone desarrollar una prueba de concepto para aplicar el marcaje por química dinámica *in situ* para detectar la secuencia α -satélite humana con resolución de una base. Esto permite por un lado desarrollar la aplicación de química dinámica *in situ*, gracias a la facilidad de detectar estas secuencias abundantemente expresadas, y, por otro lado, abre la

110

posibilidad de detectar secuencias repetidas con resolución de una base, pudiendo servir de herramienta para detectar variaciones de nucleótido predominantes en determinadas posiciones en secuencias repetidas, así como para validar aquellas variaciones de nucleótido obtenidas mediante análisis computacionales. La aplicación del marcaje por química dinámica *in situ* requiere comprobar si la reacción tiene lugar en un entorno celular complejo bajo las condiciones fijadas en las que se encuentran los ácidos nucleicos. Es necesario, además, comprobar si el marcaje por química dinámica es compatible con protocolos y reactivos FISH estándar.

En esta prueba de concepto, realizamos un ensayo de optimización en el que validamos el uso de sondas DGL para detectar una secuencia α -satélite específica humana pan-cromosómica del monómero de 171 pb con resolución de una base. Para ello se sintetizó una sonda DGL de 18-mer de longitud complementaria que hibrida en esta secuencia α -satélite humana con un marcaje con fluoróforo Cy3 en su extremo N-terminal. Cuando la sonda DGL marcada con Cy3 hibrida la secuencia α -satélite, las moléculas de fluoróforo Cy3 acumulativas a lo largo de las secuencias repetidas proporcionan una señal que indica la detección de la secuencia fácilmente detectable por microscopía de fluorescencia. Esta señal se distribuye aleatoriamente en núcleos interfásicos y específicamente en el centrómero de cromosomas en núcleos metafásicos.

Cuando la sonda DGL hibrida la diana, la posición abásica se encuentra frente al nucleótido en estudio, en este caso una guanina contenida en la secuencia α -satélite detectada. Para detectar esta guanina, la muestra se incubó con una SMART-C-Biotina complementaria que se incorpora al sitio abásico, reconociendo la guanina bajo estudio. A continuación, la biotina es reconocida mediante una reacción *Tyramide Signal Amplification* (TSA) en la que una estreptavidina conjugada a una enzima peroxidasa (Strep-HRP, del inglés *"Strep-Horseradish peroxidase"*) lleva a cabo una amplificación de señal catalizando la deposición de moléculas de tiramida marcadas con el fluoróforo Alexa Fluor 488 que se une a proteínas y ácidos nucleicos alrededor de la reacción. La co-localización de ambas señales, las moléculas acumulativas Cy3 de la sonda DGL y Alexa Fluor 488 del reconocimiento de la SMART-C-Biotina proporcionan una señal inequívoca y robusta de que el marcaje por química dinámica está teniendo lugar *in situ* detectando la secuencia α -satélite humana, así como el nucleótido bajo estudio, en este caso, una guanina contenida en esta secuencia (**Figura 48**).



Figura 48. Esquema de marcaje por química dinámica in situ. El reconocimiento de la secuencia α -satélite humana con sondas DGL marcadas con Cy3 y el reconocimiento de la SMART-C-Biotina incorporada en la posición abásica permite obtener una co-localización de señales indicativa de la detección de la secuencia α -satélite y una guanina contenida en esta.

3.2. Resultados

3.2.1. Validación de sondas PNA neutrales y sondas yPNA para la detección de la secuencia α -satélite humana y secuencias teloméricas

Para desarrollar la aplicación de la química dinámica y FISH, en primer lugar, se evaluó el uso de sondas PNA neutrales y sondas yPNA con monómeros PNA quirales y carga negativa para detectar las secuencias α -satélite y teloméricas específica humana mediante FISH. Para ello, se seleccionaron secuencias generales de unión a secuencias α -satélite y teloméricas humanas [157] y se comprobaron mediante análisis por BLAST [126] (**Figura 49**). Las sondas para detectar la secuencia α -satélite fueron diseñadas con biotina en su extremo N-terminal para detectar mediante métodos indirectos esta secuencia, y con el fluoróforo Cy3 en su extremo N-terminal, para detectar de forma directa estas secuencias. En el caso de las secuencias teloméricas, fueron diseñadas con biotina para la detección con métodos indirectos (**Figura 49**). El reconocimiento de la biotina se realizó mediante una reacción *Tyramide Signal Amplification* (TSA) según instrucciones (*Tyramide Superboost Kits with Alexa Fluor 488 tyramide, Thermofisher*).



Figura 49. Secuencia de las secuencias ADN α-satélite y teloméricas, sondas PNA y DGL utilizadas para detección mediante FISH. Xx = mini-PEG; Los monómeros PNA quirales se muestran resaltados en negro.

Para la validación se utilizó la línea celular de adenocarcinoma colorrectal HT-29 (ATCC[®] HTB-38[™]) obtenida de ATCC (Manassas, VA, USA), que fue tratada con choque hipotónico y solución Carnoy obteniendo los núcleos celulares fijados y aislados, tanto en interfase como en metafase (protocolo detallado en la *sección 6.3.3*. de la metodología). Los reactivos y protocolos utilizados se tomaron y modificaron ligeramente a partir de protocolos generales previamente establecidos de PNA-FISH (detallados en la **Tabla 5**) [158].

Parámetro	Reactivos y condiciones				
Buffer hibridación	Formamida 60 %, Tris 20 mM				
Concentración sonda	50 nM				
Tiempo de hibridación	Overnight (ON)				
Temperatura de hibridación	85 ºC 10 min / 40 ºC ON				
Lavados post-hibridación	SSC2X 0,1 % Tween durante 5 min SSC2X 0,2 % Tween durante 5 min				
Marcaje nuclear	Antifade mounting medium con DAPI				
TSA	Tyramide Superboost Kits, Thermofisher				

Tabla 5. Reactivos y condiciones utilizados para detectar la secuencia α-satélite humana mediante FISH.

Tras realizar la técnica FISH con estas sondas PNA, el resultado mostró que sólo hubo detección de las secuencias cuando se usaron sondas PNA con monómeros neutrales, mostrando una distribución aleatoria de las señales en núcleos interfásicos, procedentes de la detección de la secuencia α-satélite humana, así como una distribución de la señal localizada en el centrómero de cromosomas en núcleos metafásicos, tanto de forma directa como indirecta (**Figura 50**, **Figura 51**). Las sondas γPNA no mostraron detectar las secuencias teloméricas, detectándose sólo cuando se usaron sondas PNA neutrales, generando una señal en los extremos de los cromosomas (**Figura 52**).



Figura 50. Detección secuencia α-satélite mediante FISH y sondas PNA con monómeros neutrales de forma directa (arriba) e indirecta (abajo) en núcleos de línea celular HT-29. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento de 63x. Zoom factor 1.5. Barra escala: 10 μm.



Figura 51. Detalle de la detección de la secuencia α-satélite mediante FISH y sondas PNA con monómeros neutrales de forma directa (izquierda) e indirecta (derecha) en núcleos de línea celular HT-29. Se aprecia la localización aleatoria de la señal en núcleos interfásicos y la localización específica en el centrómero de cromosomas en núcleos metafásicos. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 63x. Zoom factor 1.5. Barra escala: 10 μm.



Figura 52. Detalle de la detección de la secuencia telomérica de forma indirecta con sondas PNA con monómeros neutrales (izquierda) y con sondas γPNA con monómeros quirales (derecha). Sólo se apreció *la detección de secuencias teloméricas con sondas PNA neutrales, mostrándose una señal en los extremos de los cromosomas. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710. Imagen izquierda: Aumento 63×. Zoom Factor: 2. Barra escala: 10 μm. Imagen derecha: Aumento 40×. Zoom Factor: 2. Barra escala: 10 μm.*

Con este resultado, por tanto, se concluyó que la optimización de detección de las secuencias repetidas con resolución de una base se llevará a utilizando sondas PNA con monómeros neutrales para la detección de secuencias repetidas en núcleos de la línea celular de adenocarcinoma colorrectal HT-29.

3.2.2. Validación de marcaje por química dinámica *in situ* para la detección de la secuencia α -satélite humana con resolución de una base mediante FISH

Una vez validados ambos métodos directos e indirectos, así como el tipo de sonda PNA, se procedió a validar el marcaje por química dinámica *in situ*. Para ello se utilizaron dos sondas DGL de 18-mer de longitud complementaria a las secuencias α-satélite humanas. Inicialmente se utilizó una sonda DGL sin marcaje y, como se verá más adelante, se continuó con una sonda DGL con marcaje Cy3. Ambas sondas, de idéntica secuencia, presentan una posición abásica frente a una guanina de la secuencia diana (**Figura 53**). Esta guanina, por tanto, es el nucleótido bajo estudio que será detectado de forma específica mediante marcaje por química dinámica *in situ*. El ensayo se realizó para la detección directa mediante el uso de una SMART-C-FAM y detección indirecta mediante el uso de SMART-C-Biotina, en este caso, una SMART-Citosina-Rex-PEG₁₂ (**Figura 54**), seguido por una reacción TSA.



Figura 53. Secuencias de la diana α -satélite humana y de la sonda DGL utilizada para la detección de la secuencia α -satélite con resolución de una base. El nucleótido bajo interrogación (nucleótido ubicado frente a la posición abásica de la sonda DGL) está resaltado en las secuencias diana. La posición abásica neutral se muestra en la sonda DGL como ausencia de base. Xx = mini-PEG; HAc = grupo acetato.



Figura 54. Estructura química de las SMART-C-FAM y SMART-C-PEG12-Biotin utilizadas para validar la aplicación de química dinámica in situ.

La validación del marcaje por química dinámica *in situ* se realizó en dos pasos diferentes. En primer lugar, se llevó a cabo la técnica FISH utilizando la sonda DGL- α -sat y a continuación, se llevó a cabo la reacción de marcaje por química dinámica *in situ* (adaptando levemente el protocolo general de química dinámica) [77]. Los reactivos y condiciones empleados se detallan en la **Tabla 6**.

	Parámetro	Reactivos y condiciones				
	Buffer hibridación	Formamida 60 %, Tris 20 mM				
HSI	Concentración sonda	50 nM				
	Tiempo de hibridación	Overnight (ON)				
ш	Temperatura de hibridación	85 ºC 10 min / 40 ºC ON				
	Lavados post-hibridación	SSC2X 0,1 % Tween durante 5 min SSC2X 0,2 % Tween durante 5 min				
Marcaje por química dinámica	Buffer reacción química dinámica Concentración agente reductor	Buffer fosfato 10 mM pH 6 NaBH₃CN 100 mM				
	Temperatura y tiempo de incubación	40 ºC 1 hora				
	Concentración SMART-C-FAM	5 μΜ				
	Lavados post-hibridación	SSC2X 0,1 % Tween durante 5 min SSC2X 0,2 % Tween durante 5 min				
	Marcaje nuclear	Antifade mounting medium con DAPI				
TSA	TSA	Tyramide Superboost Kits, Thermofisher				

Tabla 6. Reactivos y condiciones para la incubación de la sonda DGL-α-sat y la reacción de marcaje por química dinámica en dos pasos.

Tras la reacción de marcaje por química dinámica, el resultado esperado implicaría que la incorporación de la SMART-C-FAM a la posición abásica a lo largo de secuencias diana repetidas daría como resultado una señal de puntos distribuida en los núcleos interfásicos, así como una señal localizada en centrómeros en cromosomas de núcleos metafásicos. De igual modo, empleando el método indirecto, este resultado sería esperable tras la incorporación de la SMART-C-Biotina y la reacción TSA. Sin embargo, en todos los casos, se encontró una señal inespecífica distribuida en toda la muestra (**Figura 55**). Esta señal inespecífica se mantiene cuando las muestras son previamente bloqueadas con suero de cabra 10 %, como reactivo que forma parte del protocolo TSA. Por tanto, podría tratarse de una señal inespecífica generada por las SMART-Nucleobases.



Figura 55. Señal inespecífica de la SMART-C-FAM (arriba) y SMART-C-Biotina + TSA (abajo) obtenida tras el marcaje por química dinámica. El resultado mostró una unión inespecífica de SMART-C-FAM y SMART-C-Biotina en toda la muestra. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 63x. Zoom factor 1.5. Barra escala: 10 μm.

Debido a que la sonda DGL carece de marcaje, no es posible visualizar su localización, y, por tanto, no podemos concluir si el resultado de FISH usando una sonda DGL es exitoso o si la hibridación de la sonda DGL se ve afectada por la reacción de marcaje por química dinámica. Por lo tanto, para discriminar si la sonda DGL detecta la secuencia α-satélite humana (a pesar de la inespecificidad generada por las SMART-Nucleobases), a continuación, **se utilizó una segunda sonda DGL de 18-mer marcada con Cy3** en su extremo N-terminal, de idéntica secuencia a la anterior (**Figura 53**). A continuación, se realizó el correspondiente FISH seguido de la reacción de marcaje por química dinámica, en este caso, continuando sólo con la detección directa mediante SMART-C-FAM.

El resultado mostró que la sonda DGL se une específicamente a la secuencia α -satélite humana, de modo que la hibridación de la sonda no se ve afectada por el marcaje por química dinámica. Sin embargo, la señal obtenida por la SMART-C-FAM continuó siendo inespecífica a lo largo de toda la muestra (**Figura 56**).



Figura 56. Localización específica de la secuencia α-satélite mediante el uso de una sonda DGL marcada con el fluoróforo Cy3 y señal inespecífica generada por la SMART-C-FAM. El resultado mostró la localización específica de la secuencia α-satélite pero una unión inespecífica de la SMART-C-FAM. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 63x. Zoom factor 1.5. Barra escala: 10 μm.

Por tanto, estos resultados sugieren que las SMART-Nucleobases están generando una señal inespecífica en toda la muestra. Hay varias posibilidades que pueden explicar esta señal inespecífica. Por un lado, es posible que el grupo aldehido contenido en las SMART-Nucleobases pueda reaccionar con aminas primarias libres en biomoléculas o en reactivos utilizados en la técnica FISH. Concretamente, las proteínas nucleares son muy abundantes y en sus extremos N-terminales así como en residuos de aminoácidos, por ejemplo, en residuos de lisinas presentes en histonas, existen estos grupos amino primarios. Sin embargo, la fijación con solución Carnoy de la muestra debería prevenir la reacción inespecífica, debido a que el metanol provoca la fijación de las proteínas y ácidos nucleicos a través de su precipitación mientras que el ácido acético preserva los ácidos nucleicos. Si bien la fijación de la muestra debería prevenir la reacción inespecíficas podría interferir con las SMART-Nucleobases. En este punto, es fundamental acalarar qué tipo de reacción inespecífica está ocurriendo, para lo que es necesario realizar un extenso ensayo de optimización que permita eliminar esta inespecificidad.

3.2.3. Optimización de reactivos y condiciones para la aplicación de marcaje por química dinámica *in situ*

Los reactivos y condiciones utilizados tanto en la técnica FISH como en la reacción de marcaje por química dinámica fueron probados:

-Concentración de la sonda DGL, concentración de SMART-C-FAM, concentración del agente reductor, tiempo y temperatura de hibridación. La concentración de la sonda DGL se fijó en 50 nM y se incubó a 40 °C durante una hora previa desnaturalización a 85 °C durante 10 minutos. Basándose en experiencia previa en implementación de la química dinámica [77], se redujo la concentración de agente reductor (NaBH₃CN) a 1 mM y se probó que no interfiere con la detección de la secuencia α -satélite (Figura 57A). Se probaron varias concentraciones de SMART-C-FAM (500 nm, 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) mostrando mayor señal inespecífica cuando aumentaba la concentración. Se fijaron las concentraciones 2,5 μ M y 5 μ M para continuar con la optimización (cantidades óptimas para favorecer la reacción de química dinámica) (Figura 57B).





Figura 57. Optimización de concentración de la sonda DGL, concentración de SMART-C-FAM, concentración del agente reductor, tiempo y temperatura de hibridación. A) Imagen de detección de la secuencia α -satélite utilizando 50 nM de sonda, 40 °C durante una hora previa desnaturalización a 85 °C durante 10 minutos y 1 mM de agente reductor. Aumento: 40×, barra escala: 10 µM. B) Señal inespecífica obtenida por la SMART-C-FAM conforme aumenta la concentración. Aumento 10×, barra escala: 10 µM. Microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager A.1.

-Pretratamiento de la muestra: bloqueo y proteinasa K. Se procedió a realizar un bloqueo con acetaldehído 1 M. La estructura del acetaldehído asemejaría más la unión inespecífica de la SMART-Nucleobase con grupos reactivos presentes en proteínas. El acetaldehído fija estos grupos reactivos a través de la formación de una base Schiff y subsecuente formación de enlaces cruzados entre proteínas, o entre proteínas y ADN (Figura 58). La incubación con acetaldehído

1 M se realizó junto con el agente reductor NaBH₃CN para fijar la reacción, simulando las mismas condiciones que el marcaje por química dinámica.



Figura 58. Reacción de fijación mediante acetaldehído para eliminar el background producido por las SMART-Nucleobases. A) El acetaldehído reacciona con grupos reactivos presentes en proteínas formando una base de Schiff. B) La base de Schiff reacciona con grupos reactivos de proteínas generando enlaces cruzados entre proteínas [159].

Por otro lado, se realizó un tratamiento con proteinasa K, para reducir la cantidad de proteínas nucleares y la posible interacción con las SMART-Nucleobases. Se probó un rango de concentraciones de proteinasa K de 20 μ g / mL a 200 ng / mL. La condición escogida fue 350 ng / mL, 40 °C durante 5 minutos, debido a que fue la concentración más alta que no generó ningún cambio morfológico nuclear ni interfirió con la hibridación de la sonda DGL- α -sat-Cy3 con su diana (**Figura 59**).



Figura 59. Ajuste de tratamiento con proteinasa K incubando con la sonda DGL-α-sat-Cy3. 200 ng / mL mostró ser la concentración más alta y menor tiempo con los cuales el núcleo y la hibridación no se vieron afectadas. Microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager A.1. Imágenes arriba: aumento 10×. Barra escala: 100 μm. Imágenes abajo: aumento 20×. Barra escala: 20 μm.

-*Buffer de hibridación FISH.* Se probaron varios buffers de hibridación con el fin de sustituir el buffer de hibridación estándar usado en FISH. Esto es debido a que el buffer de hibridación estándar usado en FISH es formamida 60 % y Tris 20 mM. Sin embargo, no sabemos qué tipo de interacción puede existir entre la formamida y el buffer Tris con la reacción de marcaje por química dinámica. Se probaron varios buffers utilizados en química dinámica: buffer de SSC2× (se probó a pH 7 y pH 6 para ver si el pH ligeramente ácido influía en la hibridación), SSC2× 0,1 % SDS pH 6 y buffer fosfato 10 mM pH 6. Tras realizar el FISH con la sonda DGL- α -sat-Cy3 usando estos buffers de hibridación, se encontró que sólo el buffer fosfato 10 mM pH 6 es compatible con la técnica FISH para detectar la secuencia α -satélite humana (**Figura 60**). Debido a que el buffer fosfato 10 mM pH 6 es compatible con el marcaje por química dinámica y debido a que el buffer es inocuo y no debería presentar ningún tipo de interacción con las SMART-Nucleobases, se escogió como buffer de hibridación en FISH.



Figura 60. Prueba de buffers de hibridación usando la sonda DGL-α-sat-Cy3. El resultado mostró señal específica sólo con los buffers 60 % formamida 20 mM Tris y buffer fosfato 10 mM pH 6. El resto de buffers mostraron no ser compatibles con la hibridación. Microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager A.1, aumento de 63×. Barra de escala de 10 μm.

-Lavados post-hibridación. Los lavados post-hibridación tanto tras la técnica FISH como tras el marcaje por química dinámica consistieron en SSC2× 0,1 % Tween durante 5 minutos seguido por otro lavado SSC2× 0,2 % Tween durante 5 minutos. Debido a la existencia de señal inespecífica, los lavados podían aumentarse en tiempo y porcentaje Tween. Sin embargo, realizar lavados con Tween previamente al marcaje por química dinámica podría interferir con la propia reacción. El Tween debe ser muy bien lavado para continuar con el tratamiento de la muestra, ya que es fácil que queden restos. Como se demostró al sustituir los lavados los lavados tras FISH por PBS únicamente, la señal inespecífica fue menor, por tanto, los lavados con PBS incluyendo Tween aumentaban la señal inespecífica se optó por unificar ambas reacciones (FISH y marcaje por química dinámica in situ) en un único paso.



Figura 61. Comparación de lavados posteriores a la hibridación previo marcaje por química dinámica. Cuando se lavó con PBS 0,1 % Tween previamente a la reacción de marcaje por química dinámica se mostró mayor señal inespecífica. Microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager A.1, aumento 63×. Barra escala: 20 μm.

-*Reacción en un paso.* Finalmente, debido a la existencia de un buffer común entre la técnica FISH y el marcaje por química dinámica (buffer fosfato 10 mM pH 6) y para evitar interferencias entre los lavados y la reacción, se unificaron ambas reacciones en un único paso. Para ello se aumentó el tiempo de incubación durante 2 horas a 40 ºC. Una de las desventajas de realizar la reacción en un solo paso fue que los reactivos de marcaje por química dinámica (SMART-Nucleobases y agente reductor) no pueden exponerse al paso de desnaturalización a 85 °C. Para abordar este problema, se añadió una cámara de hibridación (Grace Bio-Labs, 9mm de diámetro, 0,8 mm de profundidad) al portaobjetos. La adición de esta cámara permitió realizar las hibridaciones de forma controlada y aumentar la desnaturalización a 94 °C durante 10 minutos con la cámara llena de PBS y sellada. A continuación, el portaobjetos se introdujo en hielo durante 2 minutos para mantener la desnaturalización y posteriormente se retiró el PBS y se añadieron todos los reactivos (la sonda DGL- α -sat-Cy3, la SMART-Nucleobase, 1 mM de NaBH₃CN como agente reductor, todo ello en buffer fosfato 10 mM pH 6) y se incubó durante 2 horas a 40 °C.

Una vez realizados estos cambios, el ensayo de marcaje por química dinámica *in situ* se realizó utilizando la SMART-C-FAM en las condiciones detalladas en la **Tabla 7**.

Parámetro	Reactivos y condiciones				
Pre-tratamiento	Acetaldehído 1 M 1 hora Proteinasa K 350 ng/mL en PBS 5 minutos				
Buffer hibridación y reacción	Buffer fosfato 10 mM pH 6				
Concentración agente reductor	NaBH₃CN 1 mM				
Concentración sonda	50 nM				
Concentración SMART-C-FAM	2,5 μΜ / 5 μΜ				
Tiempo y temperatura de incubación	10 mins a 94ºC 2 mins en hielo 2 horas a 40ºC				
Lavados post-reacción	SSC2X 0,1 % Tween durante 5 min SSC2X 0,2 % Tween durante 5 min				
Marcaje nuclear	Antifade mounting medium con DAPI				

Tabla 7. Reactivos y condiciones para realizar marcaje por química dinámica in situ en un paso.

El resultado mostró que se detectó la secuencia α -satélite humana, sin embargo, la señal generada por la SMART-C-FAM seguía siendo inespecífica, sin co-localizar con la señal obtenida por el Cy3 de la sonda DGL (**Figura 62**). Sin embargo, la señal inespecífica fue mucho más reducida.



Figura 62. Marcaje por química dinámica in situ en un paso usando SMART-C-FAM. Se detectó la secuencia α-satélite humana pero la señal proporcionada por la SMART-C-FAM reduciendo la inespecificidad observada. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 63x. Zoom factor 1.0. Barra escala: 20 μm.

3.2.4. Validación de química dinámica *in situ* mediante el uso de SMART-C-Biotina y Estreptavidina-Alexa Fluor 647

Debido a las señales inespecíficas obtenidas por la SMART-C-FAM y a la ausencia de señales específicas, se procedió a utilizar la misma SMART-C empleando un marcaje con biotina (SMART-C-Biotina) empleando como agente revelador de biotina la estreptavidina marcada con fluorescencia (Alexa Fluor 647) para tratar de lograr una detección lo más directa posible. Para ello, tras la reacción de marcaje por química dinámica, la muestra se incubó con Estreptavidina-Alexa Fluor 647 (125 ng/mL) durante 20 minutos a 25 °C, seguido de los correspondientes lavados y la tinción con DAPI.

El resultado continuó mostrando la detección de la secuencia α -satélite humana pero no mostró señal alguna de detección de la SMART-C-Biotina, sin embargo, tampoco mostró señal inespecífica (**Figura 63**).





Este resultado podría explicarse debido a que la eficiencia de la conjugación estreptavidina-Alexa Fluor 647 no es total, que, junto con el rendimiento de la química dinámica, que tampoco es un rendimiento total, podrían ambos reducir la cantidad de SMART-C-Biotinas incorporadas y, por tanto, no detectándose la señal.

3.2.5. Detección de la secuencia α-satélite humana con resolución de una base mediante marcaje por química dinámica *in situ*

Considerando los resultados obtenidos anteriormente, en los que no se detectó la incorporación directa de SMART-Nucleobases marcadas con fluoróforos, así como no se detectó de forma directa SMART-Nucleobases biotiniladas, a continuación, se procedió a revelar la SMART-C-biotina mediante el uso de *Tyramide Signal Amplification* (TSA). Si la cantidad de SMART-C-Biotinas incorporadas al bolsillo químico es menor a las dianas detectadas por la sonda DGL- α -satélite, una reacción enzimática TSA amplificaría la señal considerablemente hasta hacerla detectable. En este caso, tras la química dinámica, las SMART-C-Biotina incorporadas son reconocidas por el compuesto Estreptavidina–peroxidasa (HRP), que cataliza la deposición de tiramidas unidas a moléculas de Alexa Fluor 488 en el entorno de la reacción.

En este caso, la señal fue específica, detectándose una doble señal Cy3 procedente de la sonda DGL- α -sat y una señal Alexa Fluor 488 procedente de las SMART-C-Biotinas detectadas. Esta doble señal Cy3 y Alexa Fluor 488 positiva co-localizó completamente, siendo indicativa por tanto de la detección de la secuencia α -satélite humana (señal Cy3) y de la detección del nucleótido bajo estudio, en este caso, una guanina (señal Alexa Fluor 488) (ver esquema de la reacción en **Figura 48**). La señal mostró ser aleatoria en núcleos interfásicos y localizada específicamente en el centrómero de cromosomas de núcleos metafásicos (**Figura 64**). El esquema de reacción química se detalla en la **Figura 65**.

Capítulo 3. Parte I. Resultados



Figura 64. Detección de la secuencia α -satélite humana con resolución de una base mediante marcaje por química dinámica in situ. La señal Cy3 es indicativa de la detección de la secuencia α -satélite humana (procedente de la sonda DGL- α -sat-Cy3) mientras que la señal AF 488 es indicativa de la detección de una guanina bajo estudio (gracias a la SMART-C-Biotina + TSA). Ambas señales co-localizaron y se distribuyeron de forma aleatoria en núcleos interfásicos. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 63x. Zoom factor 1.0. Barra escala: 20 µm.



Figura 65. Esquema de reacción química para la detección de α-satélite humanas con resolución de una base mediante FISH. La hibridación entre la sonda DGL y la diana genera una posición abásica frente al nucleótido bajo estudio, en este caso, una guanina. A continuación, la incorporación de la SMART-C-Biotina complementaria genera una estructura secundaria iminio que es reducida con cianoborohidruro sódico. El producto biotinilado detectado utilizando una reacción TSA y visualizado por microscopía. Ver Figura 64 en detalle en Apéndice 3.

En una etapa final se llevó a cabo una optimización del protocolo, para tratar de acortar dicho protocolo a aquellos pasos que sean imprescindibles. El pre-tratamiento con acetaldehído y proteinasa K mostró no ser necesario para la detección específica de estas muestras. Además, se probó que la inclusión de formamida (típicamente usada en buffers de hibridación FISH), inhibe el marcaje por química dinámica. Por tanto, el buffer fosfato 10 mM pH 6 y la reacción en un paso usando en todo momento compuestos inócuos y evitando lavados con detergentes antes de la incubación de las SMART-Nucleobases, fueron clave para el éxito del marcaje por química dinámica y condiciones se encuentran detallados en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Reactivos y condiciones utilizados para realizar marcaje por química dinámica in situ para la detección de secuencias genómicas repetidas con resolución de una base.

Parámetro	Reactivos y condiciones				
Buffer marcaje por química dinámica in situ	Buffer fosfato 10 mM pH 6				
Concentración agente reductor	1 mM NaBH ₃ CN				
Concentración sonda	50 nM				
Concentración SMART-C-Biotina	5 μΜ				
Tiempos y temperaturas de incubación	10 mins a 94ºC 2 mins en hielo 2 horas a 40ºC				
Lavados post-reacción	SSC2X 0,1 % Tween durante 5 min SSC2X 0,2 % Tween durante 5 min				
Marcaje nuclear	Antifade mounting medium con DAPI				
TSA	Tyramide Superboost Kits, Thermofisher				

La *Figura 66 y Figura 67* muestra varias imágenes en las que se muestra la detección de la secuencia α -satélite con resolución de una base.



Figura 66. Imágenes detalle de la detección secuencia α-satélite humana (Cy3) con resolución de una base (AF 488) mediante marcaje por química dinámica in situ. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 63x. Zoom factor 1.0. Barra escala: 20 μm.



Figura 67. Imágenes detalle de la detección secuencia α-satélite humana (Cy3) con resolución de una base (AF 488) mediante marcaje por química dinámica in situ. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 63x. Zoom factor 2.0. Barra escala: 10 μm.

Por tanto, este protocolo desarrollado puede ser realizado en 6 horas de duración (**Figura 68**), adaptable a rutina de laboratorios clínicos y de investigación. La aplicación de la química dinámica *in situ* se traduce en la detección de la secuencia α -satélite humana *in situ* con resolución de una base en la línea celular HT-29 mediante marcaje por química dinámica.



Figura 68. Esquema de protocolo y tiempo en la aplicación de química dinámica in situ para detectar secuencias α-satélite con resolución de una base. El cultivo celular a analizar es tripsinizado, tratado con choque hipotónico y fijado con solución Carnoy. Los núcleos son bloqueados e incubados con los reactivos de química dinámica. A continuación, la muestra es lavada y tratada con TSA. El tiempo estimado total es de 6 horas.

3.2.6. Especificidad de incorporación de SMART-Nucleobases

Una vez que el marcaje por química dinámica se desarrolló con éxito, se llevó a cabo un ensayo para mostrar la especificidad de incorporación de SMART-Nucleobases. En esta aplicación de química dinámica *in situ*, se incorpora una SMART-C-Biotina, en tanto detectando una guanina en la secuencia α -satélite. Para comprobar si la detección de la guanina es específica, y que no existen incorporaciones inespecíficas del resto de SMART-Nucleobases, se realizaron cuatro ensayos independientes siguiendo el protocolo detallado en la **Tabla 7** e incubando la sonda DGL- α -sat-Cy3 con cuatro SMART-Nucleobases diferentes: SMART-C-PEG₁₂-Biotina, SMART-

Adenine-deaza-enol-PEG₁₂-biotina, SMART-Guanina-deaza-enol-PEG₁₂-biotina y la SMART-Timina-Rex-PEG₁₂-biotina (**Figura 69**). El resultado mostró que la señal co-localizada de la sonda DGL- α -sat-Cy3 y la señal Alexa Fluor 488 de la reacción TSA sólo ocurrió cuando el marcaje por química dinámica se realizó utilizando SMART-C-Biotina (**Figura 70**), por tanto, implicando la detección específica de una guanina en la secuencia.



Figura 69. Estructura química de la SMART-Guanina-deaza-enol-PEG12-biotina (nombrada como SMART-G-Biotina) y la SMART-Timina-Rex-PEG12-biotina utilizadas en el ensayo de especificidad del marcaje por química dinámica in situ.



Figura 70. Prueba de especificidad de marcaje por química dinámica in situ utilizando cuatro SMART-Nucleobases diferentes marcadas con biotina a 5 μM. Sólo hubo detección de la guanina en la secuencia α-satélite humana cuando se incorporó SMART-C-Biotina. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 63x. Zoom factor 1.5. Barra escala: 10 μm.

Con este resultado podemos concluir que se detectó una guanina predominante en la posición analizada de la secuencia α -satélite humana, no existiendo la presencia de polimorfismos de alta frecuencia en esta posición. Sin embargo, en un futuro, este trabajo enfocarse al análisis más profundo y exhaustivo a nivel de cromosoma individual para revelar la existencia de polimorfismos de baja frecuencia en esta posición.

3.2.7. Especificidad de detección de secuencias humanas

A continuación, se realizó un segundo ensayo de especificidad. En este caso se realizó el ensayo de marcaje por química dinámica *in situ* en tres líneas celulares adicionales: línea celular de adenocarcinoma de glándula mamaria MDA-MB-468 (ATCC[®] HTB-132[™]), línea celular de adenocarcinoma de pulmón H1975 (ATCC[®] CRL-5908[™]), línea celular de adenocarcinoma de cérvix HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]) y la línea celular de fibroblastos de ratón (*Mus musculus*) MEF (CF-1) (ATCC[®] SCRC-1040[™]), obtenidas todas de ATCC (Manassas, VA, USA). Las líneas celulares fueron cultivadas y tratadas como se detalla en la *sección 6.3.3. del Capítulo 6. Metodología*, a excepción de la línea celular H1975, que fue cultivada en medio RPMI. Todos los detalles de cultivo y tratamiento se encuentran en el *Capítulo 6. Metodología*. La señal se detectó en todas las líneas celulares humanas de forma específica, y no se detectó ningún tipo de señal en la línea celular procedente de ratón (**Figura 71**). Esto confirma que la secuencia detectada es específica humana y detectable en más tipos de líneas celulares siempre que sean de origen humano.



Figura 71. Prueba de especificidad de detección de la secuencia α-satélite humana en diferentes líneas celulares humanas y en la línea celular de ratón MEF. El marcaje por química dinámica in situ sólo tuvo lugar en las líneas celulares de origen humano. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 63x. Zoom factor 1.0. Barra escala: 10 μm.

3.2.8. Análisis citogenético, cuantificación de señales y sensibilidad de la técnica

Con el fin de cuantificar la señal y conocer la sensibilidad de este método, se llevó a cabo la cuantificación de señales obtenidas en núcleos metafásicos (n = 25) y núcleos interfásicos (n = 50) aleatoriamente escogidos en un triplicado de las líneas celulares HT-29, HeLa, MDA-MB-468 y H1975. En el análisis de metafases no se incluyó la línea celular H1975 debido a que las señales inespecíficas no permitían la cuantificación. Se tomaron imágenes aleatorias de cada línea celular detallada anteriormente y se contabilizaron núcleos metafásicos. Cada señal individualizada procedente del fluoróforo Cy3 se contabilizó utilizando el software Image J y la función *Find Maxima* (parámetro 5000). A continuación, se comprobó, de forma manual, cuánta señal Cy3 co-localizaba con la señal Alexa Fluor 488. Finalmente se compararon ambas señales y la media de señales obtenida se comparó con el número modal de cromosomas que indica ATCC para cada línea celular (**Figura 72**).



Figura 72. Flujo de trabajo seguido para cuantificar las señales obtenidas de la sonda DGL-α-sat-Cy3 y la detección DCL (mediante Alexa Fluor 488). A) Las muestras (n = 3) fueron visualizadas por microscopía confocal en el canal Cy3, donde se tomaron imágenes de 25 núcleos metafásicos y 50 núcleos interfásicos). B) Las señales Cy3 fueron cuantificadas mediante ImageJ, comparándose con las señales AF488. Aquellas imágenes en las que fue necesario se realizó un Z-Stack. C) Todas las imágenes fueron visualizadas en los canales Cy3, AF488 y DAPI.

Debido a que cada cromosoma presenta un centrómero, el número de señales individuales procedentes del fluróforo Cy3 se correspondió con el número modal de cromosomas indicado por la ATCC. Los datos obtenidos y el análisis estadístico realizado se muestran en la **Tabla 9** y se representan en la **Figura 73**.



Figura 73. Cuantificación de las señales individuales obtenidas de Cy3 y Alexa Fluor 488 correspondiente a las regiones repetidas en tándem de la secuencia α-satélite humana en diferentes líneas celulares. Se muestra cada señal individual y la barra de error obtenida en cada contabilización.

Tabla 9.	Análisis	estadístico	de la cuar	ntificació	n de	la se	eñal c	obtenid	a de Cy	/3 y .	Alexa	Fluor	488
correspo	ondiente d	a las region	es repetida	s en tán	dem d	de la	secu	encia a	-satélit	e hun	nana e	en núc	leos
metafás	icos de dij	ferentes líne	as celulares										

Línea celular (n = 25)	Número de señales Cy3 individuales	Coeficiente variabilidad (señal Cy3)	Número de señales AF488 individuales	Coeficiente variabilidad (señal AF 488)	Ratio señal Cy3:AF488 individuales	Rango ATCC (modal number)
HT-29	70,96 ± 17,60	24,80 %	58,48 ± 12,25	20,95%	82,41 %	68-72
HeLa	61,92 ± 8,149	13,16 %	55,00 ± 8,958	16,29%	88,82 %	70-104
MDA-MB-468	64,72 ± 16,39	25,33 %	55,24 ± 13,33	24,13%	85,35 %	60-67

La media de la cuantificación se correspondió con el número esperado de cromosomas según el rango indicado por la ATCC en el caso de las líneas celulares HT-29 y MDA-MB-468, mostrándose algo menor en la línea celular HeLa. El rango del coeficiente de variación, para todas las señales analizadas, tanto Cy3 como AF488, fue entre el 13,16 % y el 25,33 %. El rango del ratio de señales Cy3 que presentó una señal AF488 en todos los casos fue del 82,41 % al 85,35 %, mostrando por tanto un porcentaje de detección de la secuencia α -satélite con resolución de una base muy alto.

Así mismo, este ensayo se repitió contabilizando núcleos interfásicos con el fin de cuantificar las señales. Sin embargo, en núcleos interfásicos la cromatina se encuentra en estado relajado, y

las regiones en tándem formadas por la repetición de secuencias α -satélite pueden encontrarse próximas entre sí, siendo detectados varios centrómeros como una única señal individual. Esto hace que el coeficiente de variación en núcleos interfásicos sea más alto y que la señal total detectada sea menor a la esperada y con una mayor variabilidad, indicada en este caso en ATCC. En este caso, para cuantificar adecuadamente señales en núcleos interfásicos sería necesario realizar una cuantificación de señal fluorescente total detectada. Debido a la alta variabilidad encontrada en núcleos interfásicos, en este caso se aumentó el tamaño poblacional de análisis (n = 50), cuyos resultados se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Análisis estadístico de la cuantificación de la señal obtenida de Cy3 y Alexa Fluor 488 correspondiente a las regiones repetidas en tándem de la secuencia α-satélite humana en núcleos interfásicos de diferentes líneas celulares.

Línea celular (n = 50)	Número de señales Cy3 individuales	Coeficiente variabilidad (señal Cy3)	Número de señales AF488 individuales	Coeficiente variabilidad (señal AF 488)	Ratio señal Cy3:AF488 individuales	Rango ATCC (modal number)
HT-29	30,90 ± 13,12	42,45%	26,82 ± 9,930	37,02%	86,8 %	68-72
HeLa	39,10 ± 17,24	44,09%	27,12 ± 12,54	46,23%	69,3 %	70-104
MDA-MB-468	34,02 ± 9,923	29,17%	25,72 ± 8,533	33,18%	75,6 %	60-67
H1975	64,54 ± 22,29	34,53%	42,58 ± 17,54	41,20%	65,97 %	ns.

3.2.9. Limitaciones

Si bien las señales individualizadas son inequívocamente identificadas, aún existe algo de inespecificidad en el portaobjetos que podría evitar que el sistema sea automatizable para realizar análisis de alto rendimiento si se analiza la muestra en términos de señal fluorescente total y no de señales individualizadas. Esto hace que este método requiera un análisis mediante ImageJ para cuantificar las señales específicas en los núcleos. La señal inespecífica de Cy3 puede ser mejorada mediante la adición de BSA u otro bloqueante en el buffer de hibridación, más aún importante cuando se realiza microscopía de epifluorescencia, donde se superponen todos los planos.

3.3. Discusión

En este trabajo se ha desarrollado una técnica que permite aplicar el marcaje por química dinámica *in situ* para detectar secuencias α -satélite humanas con resolución de una base preservando su localización en diferentes líneas celulares tumorales. La detección se ha realizado detectando una guanina contenida en la secuencia α -satélite con alta especificidad y sensibilidad. Sólo se encontró una señal específica procedente de la guanina cuando se realizó el marcaje por química dinámica usando una nucleobase modificada complementaria (SMART-C-Biotina), no detectándose cuando se emplearon otras nucleobases. Este análisis ha mostrado una clara predominancia de una guanina en la posición estudiada, existiendo margen para realizar un análisis exhaustivo a nivel de cromosoma individual para detectar si existen polimorfismos de menor representación. Sólo se detectó esta secuencia en las líneas celulares de origen humano, estando ausente en el caso de que la línea celular presente otra procedencia. Se detectó que la media del número de secuencias α -satélite detectadas se corresponde a la información aportada por ATCC sobre estas líneas celulares y se detectó la presencia de guanina en estas secuencias en un rango de 82,41 % al 85,35 % de los casos.

Este enfoque supone una primera prueba de concepto que puede abrir la posibilidad de realizar diferentes tipos de análisis de las secuencias genómicas repetidas con resolución de una base. Debido a las dificultades encontradas en la secuenciación de regiones repetidas, así como la necesidad de realizar análisis computacionales para su estudio, esta técnica podría ser útil para hallar nuevas variantes de nucleótido, así como para validar la presencia de SNPs previamente analizados computacionalmente. El método puede ser desarrollado en un tiempo total de 6 horas, usando materiales y reactivos al alcance de cualquier laboratorio clínico y de investigación, por tanto, se trata de una técnica perfectamente adaptable a laboratorios de rutina clínica y de investigación.

Es necesario profundizar en este estudio para detectar la presencia variaciones de nucleótidos ya conocidos en la secuencia α -satélite que producen haplotipos poblacionales, para validar si este método es capaz de diferenciar estos polimorfismos. Sin embargo, con los resultados presentados en este trabajo, se muestra que puede detectarse el nucleótido predominante en una posición determinada de la secuencia α -satélite humana. Igualmente, la técnica podría ser extensible a otras secuencias actualmente detectadas mediante sondas PNA y FISH, como secuencias teloméricas, genes de ADN ribosómico y, así como podría ser una técnica interesante para la detección de ARN ribosómico 16S con resolución de una base para la diferenciación de microorganismos.

141

3.4. Futuras aplicaciones: Secuenciación por química dinámica in situ

Los resultados de este capítulo han mostrado que la química dinámica es eficaz para detectar secuencias repetidas *in situ* con resolución de una base. Una de las posibles aplicaciones de la química dinámica en relación a estos resultados es desarrollar un método de secuenciación *in situ* de secuencias repetidas generadas de forma artificial en torno a una diana (de ARN o genómica). Actualmente se han publicado dos métodos para llevar a cabo secuenciación de dianas de ácidos nucleicos, tanto transcritos de ARN como ADN genómico, preservando su localización celular mediante FISH. Los dos métodos publicados son la Secuenciación *in situ* Fluorescente (FISSEQ) [160] y la secuenciación *in situ* (ISS) [161].

(1) Secuenciación *in situ* fluorescente (FISSEQ, del inglés *"Fluorescent In Situ Sequencing"*). En este método las células o tejidos son fijadas y permeabilizadas y la diana ARN retrotranscrita utilizando aminoalil-dUTPs, adaptámeros y *primers* hexámeros. Los fragmentos de ADNc son circularizados y fijados a la matriz de proteína celular mediante una fijación no reversible para posteriormente ser amplificados mediante el método isotermal RCA, generando una matriz de amplicones estable en la célula. Estos amplicones de secuencias repetidas procedentes de la amplificación mediante RCA del ADNc circular contienen las secuencias con la diana altamente repetida. Finalmente se lleva a cabo secuenciación por ligación (SOLiD) y se visualiza por microscopía, permitiendo una lectura de hasta 30 pares de bases (**Figura 74**).



Figura 74. Secuenciación in situ Fluorescente (FISSEQ). El ARN es retrotranscrito utilizando primers hexámeros aleatorios con una secuencia como adaptámero. La RT se realiza utilizando aminoalil-dUTPs. El ADNc formado es a continuación ligado, por una CircLigasa, generando un ADNc circular. A continuación, la incubación con un primer iniciador de la amplificación RCA genera un amplicón RCA con miles de copias del ADNc amplificado. Finalmente, utilizando un primer de secuenciación, se lleva a cabo la secuenciación por ligación. Reproducido de la referencia [160] con permiso de Springer Nature.

Con este enfoque se ha llevado a cabo la **Secuenciación de genoma** *in situ* (ISG, del inglés "*In situ Genome Sequencing*"). En este método las muestras biológicas fijadas son tratadas con la transposasa Tn5 para incorporar de forma aleatoria adaptadores en el genoma fijado, mediante transposición *in situ*. A continuación, los fragmentos son circularizados *in situ* por ligación de dos horquillas que contienen un identificador únicos y *primers*. A continuación, se amplifican mediante RCA generando una librería de ADN *in situ* con hasta miles de amplicones

espacialmente localizados. A continuación, se utiliza la técnica FISSEQ para determinar la secuencia tridimensional de los amplicones, leyéndose los identificadores únicos mediante secuenciación por ligación, disociando los amplicones y amplificándolos mediante PCR. Los amplicones de PCR se secuencian en un lector convencional de Illiumina, relacionando la posición del amplicón en el genoma y la información obtenida por secuenciación [162].

(2) Secuenciación *in situ* (ISS, del inglés "*In situ Sequencing*"). En este método, el ARN diana es retrotranscrito e incubado con sondas Padlock (PLP, del inglés "Padlock probe"), una sonda que al hibridar con la diana se circulariza. Esta sonda, cuando hibrida con la diana, deja un espacio de 4 bases que serán secuenciadas. Este espacio es completado mediante una reacción de llenado por ligación, dando lugar a una sonda circular que hibrida en la diana. A continuación, las sondas circularizadas son amplificadas mediante RCA y los amplicones formados, conteniendo las 4 bases altamente repetidas. Finalmente los amplicones son secuenciados mediante secuenciación por ligación [161]. Una variante de secuenciación in situ de 4 bases de este método es llevando a cabo barcoding. En este caso, la sonda Padlock hibrida completamente con la diana, sin dejar un espacio de 4 bases en medio, si no que la sonda lleva un código de 4 bases que pueden ser posteriormente secuenciadas para monitorizar determinados transcritos de ARN previamente conocidos.

En los dos métodos, se utiliza la técnica RCA amplificar la diana (que puede ser ARN o ADN genómico) que contiene la secuencia diana altamente repetida para llevar a cabo secuenciación. Esta amplificación por RCA, en definitiva, implica generar secuencias repetidas de la diana de forma artificial, que posteriormente son secuenciadas mediante secuenciación por ligación.

En la **Secuenciación por Química Dinámica in situ**, esta diana amplificada puede ser secuenciada mediante el uso de sondas DGL y la incorporación específica de las SMART-Nucleobases correspondientes. Esto permitiría aprovechar las ventajas de la especificidad así como de la sensibilidad de las sondas PNA detectando secuencias repetidas, como se ha demostrado en numerosas aplicaciones [146,148,150,151,156,163]. Con la ventaja añadida del uso de sondas DGL, esto es, sondas PNA con posiciones abásicas y la incorporación específica de SMART-Nucleobases, se podría llevar a cabo una secuenciación de un número de bases determinado, pero con la ventaja de (1) preservar la localización celular, pudiendo secuenciar dianas *in situ*, (2) la especificidad y sensibilidad de las sondas basadas en PNA (como demuestra su alta Tm y sus aplicaciones), (3) evitar reacciones enzimáticas en la secuenciación y (4) reducir el tiempo de secuenciación *in situ*.
Con este método, la amplificación mediante RCA genera de forma artificial secuencias repetidas una de las dos estrategias descritas anteriormente. Tras la amplificación isotermal RCA, en las repeticiones se encuentra contenida la diana que se desea secuenciar, por ejemplo, 4 de bases. Una vez generada la amplificación mediante RCA, es necesario diseñar cuatro sondas DGL de 18 pares de bases formada por tres regiones funcionales: dos regiones que hibridan con la secuencia repetida de 7-mer cada una y que flanquean a una tercera región formada por 4 bases universales, bases modificadas que forman pares de bases con todos los nucleótidos indiscriminadamente, junto con la posición abásica. Para secuenciar 4 bases, sería necesario diseñar 4 sondas de idéntica secuencia, pero en las que la posición abásica varía de posición (**Figura 75**).



Figura 75. Esquema de las 4 sondas DGL de 18-mer de longitud necesarias para secuenciar 4 bases mediante Química dinámica in situ. Todas las sondas comparten dos regiones que hibridan con la secuencia amplificada por RCA de 7-mer cada una. La región central incluye 4 nucleótidos universales, que son nucleótidos modificados que forman pares de bases con todos los nucleótidos indiscriminadamente.

Junto con las 4 sondas DGL, es necesario utilizar las 4 SMART-Nucleobases, en las que cada una está marcada con diferente fluorescencia. Para llevar a cabo la **Secuenciación por Química Dinámica** *in situ,* en primer lugar, se realizaría la Ronda 1 de secuenciación en la que se incuba la muestra con la sonda DGL#1 que contiene la posición abásica en la primera posición. Una vez incorporada la SMART-Nucleobase correspondiente y marcada con fluoróforos, la señal obtenida es registrada mediante microscopía y se lleva a cabo un lavado o *stripping* con formamida 100 % caliente, llevando a cabo la desnaturalización de la sonda de su diana. A continuación, se lleva a cabo la Ronda 2, en la que se incuba la muestra con una segunda sonda DGL#2 que contiene la posición abásica en segunda posición. Una vez incorporada la SMART-Nucleobase (que en caso de ser una SMART-Nucleobase diferente, llevará

marcaje fluorescente diferente), la imagen se registra por microscopía y se realiza de nuevo lavado o stripping con formamida 100 % caliente. Las rondas se repiten hasta 4 veces, tomando por tanto 4 registros de fluorescencia mediante microscopía que, puestos en sucesión, decodificarían la secuencia de 4 bases (**Figura 76**).



Figura 76. Secuenciación por química dinámica in situ. A) La diana (ARN retrotranscrito o ADN genómico) es incubada con la correspondiente sonda (dependiendo de la estrategia de amplificación) seguido de RCA. B) La secuencia repetida de forma artificial mediante RCA es incubada con una primera sonda DGL que contiene dos regiones que hibridan con la diana de 7-mer cada una y una región central para llevar a cabo la secuenciación de 4-mer, formada por una posición abásica seguida de tres bases universales. La incorporación de la SMART-NB correspondiente en la posición abásica identifica el primer nucleótido. A continuación, la incubación con formamida 100 % caliente desnaturaliza la sonda y permite llevar a cabo una segunda ronda con una sonda DGL similar, pero con la posición abásica a continuación, precedida de una base universal y seguida por dos bases universales. La incorporación de la SMART-NB correspondiente identificaría el segundo nucleótido. Tras cada ronda se realiza microscopía registrando la señal, y tras las 4 rondas, la sucesión de señales obtenidas en cada imagen permitiría decodificar la secuencia bajo estudio.



PARTE II

Detección de mutaciones puntuales in situ en ARN mensajero de KRAS en líneas celulares tumorales mediante marcaje por química dinámica (Objetivo 2)

Capítulo 3. Parte II. Detección de mutaciones puntuales *in situ* en ARN mensajero de KRAS en líneas celulares tumorales mediante marcaje por química dinámica (Objetivo 2)

3.5. Introducción

3.5.1. Justificación

La detección de transcritos de ARNm con técnicas ISH, preservando su localización, permite establecer perfiles moleculares individualizados de cada célula, y además abre la posibilidad de estudiar mecanismos genéticos implicados en procesos biológicos [46,131,164]. Los análisis con técnicas de hibridación *in situ* se diferencian de los estudios genéticos por RT-qPCR en el hecho de que no se lleva a cabo la extracción del material genético de las células y los tejidos, lo que implica la pérdida de su localización y la pérdida de la información individual de cada célula. En muchos casos, es importante conocer la localización de genes, así como de transcriptos de ARN (tanto codificantes como no codificantes), además de estudiar la variabilidad presente en las secuencias de estos transcritos. Por ejemplo, en cáncer, la presencia de mutaciones puntuales en determinados oncogenes origina poblaciones subclonales generando heterogeneidad intratumoral, una de las principales causas de recurrencia y resistencia a terapias [165,166].

El transcriptoma a nivel de célula única puede ser estudiado mediante *single-cell RNA-seq* (scRNA-seq) [167,168], sin embargo, presenta limitaciones en términos de rendimiento en el aislamiento de las células únicas. Sin necesidad de aislar las células únicas, existen métodos que permiten detectar ARNm *in situ* con resolución de una base, incluso con capacidad de secuenciación limitada, tal como se vio en la *sección 3.4*. Sin embargo, cabe resaltar que estos métodos están basados en múltiples reacciones enzimáticas, personal cualificado e instrumentación compleja, por tanto, el desarrollo de métodos accesibles que permitan analizar ácidos nucleicos *in situ* con resolución de una base sigue siendo un desafío.

En este contexto, consideramos que la aplicación de sondas PNA puede conferir ventajas en la detección de ARNm *in situ*, dadas sus características de gran afinidad y especificidad y, combinado con la tecnología de química dinámica, podría detectarse este ARNm *in situ* con resolución de una base, lo que daría lugar a una herramienta de diagnóstico molecular de gran valor. Considerando esto, en el *Capítulo 3. Parte II.* se realizará una aproximación para explorar la posibilidad de aplicar la química dinámica y averiguar si puede ser aplicada para la detección de ARNm *in situ* con resolución de una base.

147

Como diana, se escogió detectar mutaciones puntuales presentes en el codón 12 del ARNm del protooncogén KRAS variante B, concretamente en líneas celulares tumorales de adenocarcinoma de colon HT-29 (ATCC[®] HTB-38[™]) y pulmón H1975 (ATCC[®] CRL-5908[™]), dada la importancia de estas mutaciones en el desarrollo del proceso tumoral [89].

3.5.2. Single-cell RNA-seq y sus limitaciones

El transcriptoma de células únicas puede ser estudiado mediante *single-cell RNA-seq* (scRNAseq) [167–169]. En este método, las células se aíslan individualmente y se analizan mediante secuenciación. Existen varios métodos descritos para realizar scRNA-seq que pueden variar en el aislamiento de la célula única, en el proceso de amplificación de ácidos nucleicos o en la plataforma de secuenciación utilizada. Los métodos de aislamiento de una célula única pueden ser mediante micromanipulación con pipetas capilares, microdisección por captura láser (LSM, del inglés *"Laser Scanning Microscopy"*), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o mediante microfluídica [4]. Tras el aislamiento de la célula, esta es lisada para extraer el ARN. El 80 % del ARN celular lo constituye ARN ribosómico y ARN transferente, por ello, para separar el ARNm de esta fracción y evitar su enmascaramiento en el proceso de amplificación, se utilizan *primers* poli-dT, normalmente asociados a *beads*, para capturar el ARNm [167].

A continuación, se lleva a cabo la retrotranscripción de este ARNm y el ADNc obtenido es amplificado principalmente mediante métodos basados en PCR o *In Vitro Transcription Amplification (IVTA)* [167,169]. Finalmente, la amplificación generada debe ser analizada mediante microarray o secuenciación [167,170,171]. Los microarrays permiten analizar la expresión de genes y su sobre-expresión o desregulación, de un modo eficaz y comparativo. La secuenciación, además de analizar la expresión de genes, genera una mayor cantidad de información y permite estudiar variaciones en la secuencia de estos transcritos. Se requiere preparar una librería para secuenciar, en la mayoría de casos, en la plataforma Illumina. Existen numerosos procesos biológicos en los que estudiar la heterogeneidad de expresión génica a nivel de célula única es de gran interés. Como ya se mencionó, la heterogeneidad intratumoral es una de las principales causas de recurrencia y resistencia a terapias.

A pesar del poder de la técnica scRNA-seq, existen aún limitaciones, principalmente centradas en el aislamiento de la célula única, la baja concentración de ARNm en una sola célula y el bajo rendimiento de la retrotranscripción. Por tanto, estas técnicas tienen un rendimiento bajo en cuanto al número de células analizadas [168]. La posibilidad de detectar la distribución de

148

mutaciones puntuales o polimorfismos como SNPs, también está limitada por la variabilidad técnica introducida en el proceso de amplificación [168], además de requerir intensos análisis computacionales [172]. Esto hace que esta técnica no esté implementada como técnica de rutina en laboratorios clínicos. Evitar todas estas limitaciones es un desafío para realizar un análisis de célula única eficiente. Por lo tanto, el desarrollo de plataformas que permita detectar ácidos nucleicos preservando su localización, así como detectándolos con resolución de una base o con capacidad de secuenciación sigue siendo un desafío para establecer perfiles moleculares caracterizados a nivel de célula única.

3.5.3. RNA-FISH y detección de ARN in situ con resolución de una base

La aplicación más clásica de RNA-FISH consiste en el uso de sondas de ADN o ARN marcadas con una molécula de fluoróforo o una molécula como biotina o digoxigenina para ser reconocida y mediar una reacción de amplificación, en general, mediante inmunofluorescencia o amplificación enzimática [173]. Este enfoque permite la identificación relativa de la expresión génica, es decir, detectando la presencia del transcripto, pero sin poder realizar una cuantificación absoluta [173]. Si bien se ha publicado la PCR *in situ* [174], la amplificación previa hibridación presenta dificultades técnicas y el inconveniente de la difusión de los amplicones, lo que genera la difusión de la señal y dificulta la individualización de cada transcripto. Actualmente existen enfoques que permiten detectar de forma precisa el ARN mensajero *in situ* y llevar a cabo su cuantificación absoluta, técnicas conocidas como RNA-FISH de molécula única (sm-RNA-FISH, del inglés *"single-molecule RNA-FISH"*) [175]. Algunos de estos métodos, además, presentan la posibilidad de detectar ARN mensajero *in situ* con resolución de una base.

(1) Uso de sondas de gran longitud. Se trata de sondas de cientos de pares de bases que presentan un marcaje múltiple con moléculas de fluoróforo o biomoléculas para mediar una amplificación por inmunofluorescencia [173,176].

(2) Uso de un set de sondas. Se trata del uso de un set sondas (en general en torno a 50 sondas), cada una de ellas marcadas con una molécula fluoróforo que hibridan a lo largo de la cadena de ARNm [46,177, 178]. Con estos métodos, la consecución de señales en la misma sonda facilita la detección del transcrito y la cuantificación absoluta de la expresión génica. Se trata de uno de los métodos más utilizados actualmente, comercializado bajo el nombre de Stellaris[®] (Figura 77).



Figura 77. Esquema de detección de ARN in situ mediante Stellaris. La incubación con un set de sondas (cada una de ellas marcada con un fluoróforo) que hibridan a lo largo del ARN mensajero permite detectarlo mediante microscopía. La imagen ha sido adaptada de [46].

(3) Branched RNA-FISH: Uso de sondas Z y amplificación de señal. En esta técnica, se utilizan un set de parejas de "sondas Z", cada una de ellas con autocomplementariedad intrínseca y una región de 18 a 25 pares de bases complementarias al ARN secuencia de interés. Cuando las sondas hibridan con su diana, debido a la autocomplementariedad, cada sonda forma una estructura Z. Cada estructura Z tiene a su vez una región de 14 nucleótidos, que, ambas sondas Z hibridadas contiguamente, forman una región de 28 nucleótidos de anclaje para una sonda preamplificadora. A continuación, se unen amplificadores que contienen lugares de unión para sondas de detección, es decir, sondas marcadas bien con una molécula fluorescente o bien con enzimas cromogénicas para amplificar la señal. Constituye otro de los métodos bien establecidos de smRNA-FISH, comercializado bajo el nombre de RNAscope [164] (Figura 78). Usando un único par de sondas Z, se ha publicado la detección de ARN con resolución de una base, debido a que la existencia de un desajuste en la diana evita la hibridación de una de las sondas Z y por tanto evitando la detección de la diana [179–181].



Figura 78. Esquema de detección de ARN in situ mediante RNAscope. En primer lugar, se hibridan dos sondas Z con el ARN mensajero, seguido de la hibridación de preamplificadores, amplificadores y la unión de sondas marcadas con fluoróforos o amplificación enzimática. Reproducido de la referencia [164].

(4) Reacción en cadena de hibridación (HCR, del inglés "Hybridation Chain Reaction"). En este caso una sonda iniciadora con dos extremos salientes hibrida con el ARN mensajero, seguido de dos sondas en bucle que hibridan en los extremos del iniciador, marcadas con fluoróforos y generando nuevos extremos iniciadores para mantener la reacción en cadena [182].

(5) Amplificación enzimática isotermal. Se trata de la hibridación del ARN diana con sondas que son posteriormente ligadas, circularizadas y amplificadas mediante RCA, dando lugar a un amplicón detectable mediante sondas de detección [183]. El valor añadido reside en que la ligación de la sonda solo tiene lugar cuando la sonda hibrida totalmente con su secuencia diana. Si esta hibridación no es completa, debido a la presencia de un desajuste de un nucleótido como mutaciones puntuales, la ligación no tiene lugar, en tanto, discriminándose el ARN diana con especificidad de una base [160,184,185].

(6) *Whole-mount RNA-FISH* mediante sondas LNA. El uso de sondas LNA marcadas con digoxigenina ha sido utilizada para detectar ARNm así como microARNs *in situ* [47]. En la técnica Whole-mount RNA-FISH se utilizan sondas LNA que tras hibridar con su diana se lleva a cabo una degradación del ARN no hibridado, detectando estas sondas [186,187].

Por último, tal como se describió en la *sección 3.4.*, se han publicado métodos que permiten llevar a cabo secuenciación *in situ* de ARN de un número determinado de bases.

3.5.4. Imagen de ARN mediante FLAPs y microscopía de super-resolución.

Recientemente se están desarrollando nuevas aplicaciones que permiten detectar y localizar moléculas de ARN mediante el uso de Aptámeros de ARN de iluminación fluorescente, conocidos

como FLAPs (del inglés *"Fluorescent Light-Up Aptamers"*). En este sistema, se transfiere a las células un constructo de ADN que contiene la información codificada para una estructura de ARN, por ejemplo, ARN transferente (ARNt) junto con un aptámero, que conforma una estructura capaz de ser detectada mediante moléculas fluorógenicas que se unen a este aptámero de forma específica. Una vez integrada en el genoma celular, este ADN es transcrito a una estructura de ARN que contiene el aptámero al que puede unirse una molécula de fluorógeno [188].

Los fluorógenos utilizados son no-tóxicos y permeables. El primer fluorógeno utilizado en el sistema FLAPs fue el marcador de trifenilmetano verde de malaquita, si bien actualmente los fluorógenos más utilizados son principalmente derivados de 4,hidroxibenzlideno imidazolinona (HBI), encontrado en la (e)GFP, marcadores cianina y conjugados de fluoróforo-quencher [19]. Recientemente, se están desarrollando aptámeros para microscopía de super-resolución, permitiendo detectar estas estructuras de ARN con alta resolución. Específicamente son el aptámero SiRA y el aptámero Pepper [189]. Más aun reciente se ha publicado el aptámero RhoBAST, un conjugado fluoróforo-quencher con una resolución superior, no limitada por fotoblanqueo, que permite detectar la localización de ARN con alta precisión mediante microscopía de localización de molécula única (SMLM, del inglés "*Single-Molecule Localization Microscopy*"). RhoBAST no presenta fluorescencia en solución, mientras que al unirse al aptámero de interés genera una señal fluorescente precisa [181].

3.5.5. Aplicación de química dinámica *in situ* para detectar ARNm de KRAS con resolución de una base

En el presente capítulo se explorará la posibilidad de aplicar la química dinámica para detectar ARNm *in situ* con resolución de una base mediante el uso de sondas DGL preservando la localización celular del ARNm. La especificidad y sensibilidad superior de las sondas PNA debido a sus modificaciones de esqueleto peptídico podría aportar una detección sensible de ARN con la ventaja de presentar resolución de una base. No existen métodos publicados del uso de sondas PNA para detectar ARN mensajero, por tanto, para llevar a cabo esta aplicación es necesario establecer un protocolo de detección de ARN mensajero con sondas PNA. Tal como se indicó en la *sección 1.1.1. y 2.1.4.*, la detección de mutaciones puntuales implica un análisis histopatológico previo del porcentaje de tejido mutado seguido de un proceso de extracción del material genético, amplificación y detección. El objetivo final de aplicar química dinámica *in situ*

es analizar el estado mutacional de KRAS de forma directa en células, evitando el procesamiento de la muestra posterior y las etapas de amplificación de ácidos nucleicos posteriores.

Para ello, se han establecido tres estrategias que permitan detectar de forma específica transcritos de ARN mensajero para posteriormente detectarlos con resolución de una base (Figura 79). Las dos primeras estrategias están dirigidas a detectar ARNm usando sondas PNA. Debido a la limitación en el uso de una cantidad de fluoróforos o moléculas como biotina reducida, se exploró la especificidad de las sondas para detectar ARNm de KRAS. La primera estrategia consistió en obtener una señal co-localizada de detección del transcrito de ARNm de KRAS y la detección del codón 12 de KRAS. Para ello, en primer lugar, se validaron tres sondas PNA, dos de ellas dos sondas guías marcadas con el fluoróforo Cy3, ambas hibridando contiguamente a una tercera sonda marcada con biotina que cubre el codon 12 de KRAS. Esta tercera sonda se detectaría con una reacción TSA, produciéndose en tanto dos señales colocalizadas para detectar KRAS. La segunda estrategia consistió en diseñar un set de sondas marcadas tanto con Cy3 como con biotina para detectar no solo KRAS, si no también GAPDH como control positivo, así como sondas complementarias a transcriptos inexistentes en las líneas celulares testadas como controles negativos. Esta validación se hizo con sondas PNA para concluir si la detección del transcrito de KRAS es específica, valiéndose de los controles para especificarlo.

Por último, la tercera estrategia consistió en validar la química dinámica *in situ* mediante el uso de sondas DGL. La aplicación de la química dinámica *in situ* conlleva la limitación de detectar una única molécula, la SMART-Nucleobase incorporada específica. Se explorará la detección de esta SMART-Nucleobase con métodos de amplificación post-hibridación, concretamente con el sistema biotina-estreptavidina y la reacción TSA, usando por tanto una SMART-Nucleobase biotinilada. Además, se probaron dos sondas DGL con diferente esqueleto peptídico, para diferenciar la existencia de cargas en estas sondas, y se probó detectar la guanina del primer nucleótido del codón 12 *wild-type* de KRAS mediante la incorporación específica de la SMART-Citosina complementaria marcada con biotina.



Figura 79. Esquema estrategias para detectar ARNm de KRAS in situ con sondas PNA y química dinámica. A) La primera estrategia consiste en usar dos sondas PNA guía marcadas con Cy3 que hibridan contiguamente con una sonda PNA marcada con biotina (para ser detectada mediante TSA) que al hibridar abarca el codón 12 de KRAS. B) La segunda estrategia consiste en un set de sondas para detectar KRAS así como controles positivos (GAPDH) y negativos (GFP, SCRAMBLED) marcadas tanto con Cy3 para detección directa como con biotina para detección indirecta mediante TSA. C) La tercera estrategia consiste en química dinámica in situ, donde la sonda DGL hibrida con ARNm de KRAS con una posición abásica frente al segundo nucleótido del codón 12 de KRAS. A continuación, se incorpora la SMART-Nucleobase complementaria biotinilada y se reduce la reacción. Finalmente, la biotina es reconocida por una estreptavidina-HRP que amplifica la señal mediante TSA con tiramidas conjugadas a Alexa Fluor 488, generando una señal dispersa de Alexa Fluor 488 en el citoplasma correspondiente a la detección de dicho nucleótido.

3.6. Resultados

3.6.1. Validación de la detección de la secuencia de transcrito de ARN mensajero de KRAS mediante sondas PNA y co-localización de señales (Estrategia 1)

En primer lugar, se procedió a validar la estrategia de detección de ARN mensajero de KRAS usando dos sondas PNA guías neutrales de 18-mer de longitud y marcadas con el fluoróforo Cy3 en su extremo N-terminal, que hibridan de forma contigua en la secuencia del ARN mensajero de KRAS junto con una sonda PNA neutral de 18-mer de longitud marcada con biotina en su extremo N-terminal, contigua a las anteriores y que abarca la secuencia que contiene el codón 12 de KRAS (Transcript ID en GENBANK: NM_004985.4) (secuencias en **Figura 80**). Para la detección de la biotina se utilizó el kit TSA, reconociendo la biotina mediante estreptavidina-HRP que amplifica la señal mediante TSA (*Tyramide Superboost Kits with Alexa Fluor 488 tyramide, Thermofisher*) usando tiramida marcada con Alexa Fluor 488 que deposita en el entorno de la reacción. El resultado esperado sería obtener una señal co-localizada Cy3 y Alexa Fluor 488 indicativa de la detección de la localización del transcrito de ARN de KRAS.



Figura 80. Secuencia de las sondas PNA utilizadas para detección de ARNm de KRAS mediante FISH. Xx = mini-PEG.

Los ensayos FISH se realizaron utilizando la línea celular de adenocarcinoma colorrectal HT-29 (ATCC[®] HTB-38[™]) que presentan expresión de KRAS *wild-type*, de modo que la prueba de concepto comenzó detectándose una guanina correspondiente al primer nucleótido del codón 12 de KRAS *wild-type*.

Para esta validación se llevó a cabo una incubación a diferentes concentraciones de la sonda utilizando un protocolo optimizado a partir de la integración de protocolos de FISH junto con protocolos estándar de PNA-FISH [160]. La fijación se realizó con paraformaldehido 4 % y la permeabilización se realizó con Tritón-100 0,2 % en PBS. Los reactivos y condiciones del protocolo utilizado se muestran en la **Tabla 11**. Todos los detalles del tratamiento de las muestras para detectar ARN mediante marcaje por química dinámica *in situ* se detallan en la *sección 6.3.7*. del *Capítulo 6. Metodología*.

Tabla 11. Reactivos y condiciones utilizados para la validación de ARN mensajero de KRAS mediante sondas PNA guía marcadas con Cy3 y sonda PNA que abarca el codón 12 de KRAS marcada con biotina.

Parámetro	Reactivos y condiciones
Fijación	Paraformaldehído 4 % 10 min RT
Permeabilización	0,2% Triton-100 en PBS1X por 10 minutos
Deshidratación	Etanol 70 % / 85 % / 100 % (2 min)
Concentración sonda	25 nM / 50 nM / 100 nM
Buffer hibridación	60% formamida, 20mM Tris en agua
Tiempos y temperaturas de incubación	5 min 85 ºC Overnight 37 ºC
Lavados post-reacción	SSC2X 0,1 % Tween durante 5 min SSC2X 0,3 % Tween durante 5 min
Marcaje nuclear	Antifade mounting medium con DAPI
TSA	Tyramide Superboost Kits, Thermofisher

Los resultados mostraron que las células presentaban una señal procedente de Cy3 en toda la estructura celular, incluido el núcleo. Además, las variaciones en la concentración de la sonda no mostraron diferencias en la señal detectada en la célula (**Figura 81**).



Figura 81. Hibridación FISH usando sondas PNA guías marcadas con el fluoróforo Cy3 para localizar la secuencia de ARN mensajero de KRAS. La señal procedente de Cy3 se distribuyó por todo el citoplasma y núcleo de la célula indistintamente de la concentración. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 63x. Zoom factor 2.0. Barra escala: 20 µm.

A continuación, se llevó a cabo la validación de la sonda PNA marcada con biotina, seguida por una amplificación de señal TSA en las mismas condiciones recogidas en la **Tabla 11**. El resultado mostró una señal positiva procedente del PNA marcado con biotina, siendo negativa en ausencia de dicho PNA. Además, se probó un kit de bloqueo de biotina endógena, según instrucciones (*Endogenous Biotin-Blocking Kit, ThermoFisher Scientific*) para detectar si la señal procedente de la biotina endógena podía interferir con el resultado esperado. Dicho bloqueo de la biotina endógena se mostró fundamental para evitar señales positivas procedentes de la biotina endógena. Adicionalmente se probó un bloqueo de la peroxidasa endógena, debido a que, en caso de presentarse en abundancia, podría interferir con el resultado (**Figura 82**). Sin embargo, el bloqueo de la peroxidasa endógena no se mostró necesario en la línea celular HT-29.



Figura 82. Hibridación FISH usando una sonda PNA marcada con biotina para la secuencia de ARN mensajero de KRAS conteniendo el codón 12. La señal procedente de AF488 se distribuyó por todo el citoplasma. El bloqueo de la biotina endógena se mostró fundamental. El bloqueo de la peroxidasa endógena no mostró diferencias significativas. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 20x. Zoom factor 0.6. Barra escala: 20 μm.

Con los resultados obtenidos en estos ensayos podemos concluir, en primer lugar, que se genera una señal procedente de las sondas PNAs. Si bien esta señal es positiva con respecto a la muestra sin tratar con sondas PNAs, estos resultados no son concluyentes. Para confirmar la especificidad de la señal es necesario emplear un control negativo que incluya sondas PNAs que no presenten diana en la célula para demostrar que no se trata de señal inespecífica generada por la sonda PNA y que es una señal específica generada por la hibridación de la sonda PNA con su diana.

3.6.2. Set de sondas PNA para la validación de la detección de la secuencia de ARN mensajero de KRAS *in situ* (Estrategia 2)

Para validar la especificidad de la detección de ARN mensajero de KRAS *in situ*, se diseñó un set de sondas PNAs con varias características e incluyendo varios tipos de controles. Además, Se hicieron varios cambios en el protocolo para adaptarlo a condiciones de RNA-FISH (**Tabla 12**). Por un lado, para evitar la degradación del ARN celular durante el procesamiento de la muestra (por ARNasas principalmente), las muestras fueron procesadas en el mismo día en el que se procedió a su fijación y permeabilización, evitando así su conservación y posible degradación del ARN. La permeabilización se realizó con etanol 70 % en frío (2 °C – 8 °C) durante 1 hora. El etanol altera puentes de hidrógeno y uniones hidrofóbicas, eliminando lípidos y alterando la estructura de proteínas, como pueden ser las ARNasas. Adicionalmente, el buffer de hibridación se sustituyó por uno que contiene dextrán sulfato al 10 %, que aumenta la tasa de hibridación considerablemente, 10 % formamida, para eliminar las hibridaciones inespecíficas y se probaron diferentes concentraciones de la sonda.

Parámetro	Reactivos y condiciones.
Bloqueo	Biotin Blocking / 10% goat serum blocking / HCl blocking
Fijación	Paraformaldehído 4 %, 10 min, RT
Permeabilización	Etanol 70 % 1 hora frío (2 ºC – 8 ºC)
Deshidratación	Etanol 70 % / 85 % / 100 % (2 min)
Concentración sonda	25 nM / 50 nM / 75 nM / 100 nM
Buffer hibridación	10 % dextrán sulfato, 10 % formamida en SSC2X
Tiempos y temperaturas de incubación	Overnight 37⁰C
Lavados post-reacción	SSC2X 0,1 % Tween durante 5 min
Marcaje nuclear	Antifade mounting medium con DAPI
TSA	Tyramide Superboost Kits, Thermofisher

Tabla 12. Reactivos y condiciones utilizados la validación del set de sondas PNA.

Adicionalmente se incluyeron cambios en el procedimiento:

(1) Línea celular adenocarcinoma de pulmón H1975. La línea celular de adenocarcinoma de colón HT-29 presenta un citoplasma muy pequeño y cercano al núcleo, y, además, esta línea celular crece en grupos celulares dejando poco espacio citoplasmático entre células. Por este motivo, los ensayos continuaron con la línea celular H1975. Esta línea celular de adenocarcinoma de pulmón presenta un citoplasma extendido, siendo fácil individualizar las células entre sí y visualizar la señal generada por las sondas.

(2) Detección de KRAS, GAPDH (control positivo) y controles negativos. Se incluyeron sondas para detectar ARN mensajero de GAPDH (gen de expresión constitutiva) como control positivo (NCBI Reference Sequence: NM_002046.7). Se incluyó una sonda PNA de 19-mer frente a ARN mensajero de GFP, una proteína que no está expresada en estas células (GenBank: MN114103.1). Todas las secuencias con las que hibridan las sondas fueron obtenidas de GENBANK y analizadas por BLAST [126] (Figura 83).

(3) Longitud de la sonda PNA (22-mer). Para evitar posibles uniones inespecíficas de la sonda, las sondas fueron diseñadas con una longitud de 22-mer. Con este aumento 4-mer de longitud, las sondas presentan una mayor especificidad por su diana, como queda reflejado en un aumento de la temperatura de hibridación de las sondas, utilizando la herramienta de cálculo de Tm (del inglés, "Melting Temperature") de PNABio [190,191].

(4) Marcaje directo e indirecto. Por último, las sondas se diseñaron para realizar una detección directa y una detección indirecta. Para ello se marcaron en su extremo terminal por un lado con el fluoróforo Cy3 en el extremo N-terminal y por otro lado marcadas con biotina en el extremo N-terminal para su posterior detección mediante kit TSA.



Figura 83. Secuencias del set de sondas utilizado para detección de ARNm de KRAS y GAPDH mediante FISH por métodos directos e indirectos. Secuencia de la sonda PNA GFP como control negativo. Xx = mini-PEG.

Además, para el diseño de las sondas se tuvieron en cuenta una serie de pautas establecidas, recomendadas por la herramienta de diseño de PNABio [191], cumpliendo algunas características determinadas como un tamaño de la sonda inferior a 30-mer (ya que tamaños superiores las hacen insolubles), se evitaron secuencias complementarias en la secuencia de la sonda, se evitó un porcentaje de purinas superior al 50 % y un tramo de purinas superior a 6-mer, así como un contenido G superior a 35 %, ya que todo esto reduce la solubilidad de las sondas. Además, se incluyó un espaciador mini-PEG entre la molécula fluoróforo y la sonda, así como fueron disueltas en 10 % de DMSO para favorecer su solubilidad.

Una vez sintetizado el set de sondas, se procedió a su validación mediante FISH, para lo que se utilizó el protocolo detallado en la **Tabla 12**. Los resultados mostraron señales en la totalidad de las muestras en las que se realizó, independientemente de si se trató de controles positivos o controles negativos. El resultado mostró que las señales obtenidas fueron inespecíficas, existiendo señal positiva usando la sonda frente a GFP, e indistintamente de cuando se usaron métodos directos e indirectos. Incluso se mostró una señal inferior en GAPDH usando la correspondiente sonda PNA marcada con biotina. Por tanto, la señal obtenida proviene de uniones inespecíficas generadas por las sondas PNA y no por la detección de sus correspondientes dianas (**Figura 84**).



Figura 84. Hibridación FISH usando un set de sondas para detectar la secuencia de ARN mensajero de KRAS así como el control positivo GAPDH y el control negativo sin sonda y GFP. La señal procedente de Cy3 se distribuyó por todo el citoplasma y núcleo de la célula indiscriminadamente. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 63x. Zoom factor 1.0. Barra escala: 10 μm.

Para validar un control negativo y la señal inespecífica obtenida en este método, se diseñó un segundo control negativo, en este caso, una sonda PNA SCRAMBLED. La sonda SCRAMBLED consiste en una sonda de igual composición de nucleótidos y temperatura de hibridación que la sonda frente al ARN mensajero de KRAS, pero con un orden aleatorio de estos nucleótidos, que no presenta hibridación con diana alguna (**Figura 85**). Sin embargo, la sonda PNA SCRAMBLED continúo mostrando una señal inespecífica (**Figura 86**).



Figura 85. Secuencias de la sonda PNA SCRAMBLED como control negativo en la detección de ARN mensajero de KRAS. Xx = mini-PEG.



Figura 86. Hibridación FISH usando una sonda PNA SCRAMBLED como control negativo. La señal procedente de Cy3 se distribuyó por todo el citoplasma y núcleo de la célula indistintamente. Microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710, aumento 63x. Zoom factor 1.0. Barra escala: 20 μm.

Algunas de las explicaciones que podrían motivar esta inespecificidad encontrada pueden ser la baja solubilidad de las sondas, que puede provocar que, tras la incubación de las sondas en la muestra, esta sea difícilmente lavable. La ausencia de cargas en la estructura de las sondas PNA, que, al no presentar cargas en su esqueleto peptídico. Esto hace que los lavados de astringencia con SSC2× no facilite su lavado tras la hibridación. Para tratar de reducir el *background*, se probaron varias condiciones que incluyeron (a) el uso de Human DNA Cot-1, que bloquea la hibridación de las sondas con dianas inespecíficas, (b) la reducción de la concentración de la sonda, (c) se probaron varias condiciones de temperatura de hibridación, aumentándola, acorde a la alta Tm que presentan las sondas PNA y (d) se incluyeron lavados post-hibridación más fuertes, concretamente lavados con SSC2× 0,04 % SDS y SSC2× 0,04 % SDS 10% formamida. La formamida favorece la desnaturalización de las sondas que se han unido parcialmente e inespecíficamente (ver cambios en **Tabla 13**).

Tabla 13. Diferentes parámetros probados para eliminar las señales inespecíficas generadas por las sondas PNA.

Parámetro	Reactivos y condiciones
Bloqueo	Human DNA Cot-1 blocking
Concentraciones	20 nM, 50 nM, 100 nM
Temperatura de hibridación	48 ºC / 60 ºC / 70 ºC
Lavados post-hibridación	SSC2× 0,1 % Tween SSC2× 0,04 % SDS SSC2× 0,04 % SDS 10% formamida

Sin embargo, tras llevar a cabo todas estas modificaciones no se observó mejora y la señal inespecífica se mantuvo constante. Estos resultados nos llevan a concluir que sería necesario realizar una optimización exhaustiva que evalúe cada uno de los parámetros de forma independiente y permita esclarecer las condiciones que eviten la unión inespecífica de las sondas PNA en la muestra.

3.6.3. Marcaje por Química Dinámica *in situ* para la detección de ARN mensajero de KRAS con resolución de una base (Estrategia 3)

Considerando que tras la reacción por química dinámica *in situ*, sólo existirá incorporación de la SMART-Nucleobase complementaria en aquellas sondas DGL que hayan hibridado con su ácido nucleico diana, permitiría detectar específicamente tanto el ARN mensajero de KRAS mediante sondas DGL con resolución de una base. Para llevar a cabo esta validación, se procedió a utilizar dos sondas DGL que hibridan con la secuencia del transcrito de ARN mensajero KRAS conteniendo el codón 12. Para ello se utilizó una sonda DGL de 22-mer de longitud, similar a las sondas anteriormente utilizadas, y, por otro lado, se utilizó una sonda DGL de 18-mer de longitud, pero con dos modificaciones químicas, presentando tres grupos de ácido propanoico que confieren carga negativa a la sonda, lo que permitiría confirmar si la ausencia de cargas está relacionada con la señal inespecífica (**Figura 87**, **Figura 88**).



Figura 87. Secuencias de sondas DGL utilizadas para detectar ARNm de KRAS con resolución de una base mediante FISH. Los monómeros PNA quirales se muestran marcados en negro. El monómero PNA abásico quiral se encuentra marcado en amarillo. HAc = grupo acetato. Xx = mini-PEG.



Figura 88. Secuencias de sondas DGL utilizadas para detectar ARNm de KRAS con resolución de una base mediante FISH. Los monómeros PNA quirales se muestran marcados en negro. El monómero PNA abásico quiral se encuentra marcado en amarillo. HAc = grupo acetato. Xx = mini-PEG. Ver Figura 87 en detalle en Apéndice 4.

Concretamente se ha escogido analizar la mutación KRAS G12C, que está presente en aproximadamente el 13 % de los adenocarcinomas de pulmón, el 3 % en el cáncer colorrectal y el 2 % en otros tumores sólidos. Además, se han descubierto compuestos con el potencial de unirse específicamente a la proteína mutada más frecuente de KRAS en CPNM, KRAS G12C, debido a la presencia de una cisteína en su bolsillo alostérico. La aplicación de química dinámica *in situ* para detectar mutaciones de KRAS G12C en tejido podría ser una herramienta de diagnóstico precisa combinada con este tipo de tratamientos.

En este proceso de optimización se probaron varios parámetros de forma individual:

(1) Influencia de la biotina endógena y tiempo de incubación enzima Strep-HRP. Se realizó un ensayo para probar si la biotina endógena interfiere con el kit TSA y detectar el tiempo de incubación máximo de la enzima HRP para no detectar señales inespecíficas propias del citoplasma, aun con la biotina endógena bloqueada. El resultado mostró que el paso de bloqueo de la biotina es fundamental para evitar señales inespecíficas. Sin embargo, aun usando el bloqueo de biotina endógena, tras 10 minutos se observan señales inespecíficas, con lo que se recomienda no superar este tiempo de incubación (Figura 89 y 90).

Alexa Fluor 488
DAPI
Merged

ug
Image: I

Figura 89. TSA sin bloqueo de la biotina previo endógena. Las señales muestran una clara señal inespecífica debido a la presencia de biotina endógena. Microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager A.1, aumento 63×. Barra escala: 20 μm.



Figura 90. TSA con bloqueoprevio de la biotina endógena.Trasbloquearlabiotinaendógena, la señal hasta 10minutosdeincubaciónconestreptavidinaperoxidasafuereducida.MicroscopiodeepifluorescenciaZeissAxioImagerA.1,aumento63×.Barra escala: 20 μm.

(2) Incubación con diferentes sondas DGL. Por otro lado, se realizó un ensayo para incluir en la incubación la DGL, pero sin incluir la SMART-nucleobase y manteniendo el resto de condiciones para comprobar si hay señal inespecífica que provenga de la sonda DGL. El resultado mostró que la sonda, aun sin marcaje, produce señal inespecífica tanto en sondas PNA con monómeros neutrales como en sondas PNA con monómeros quirales, aunque de modo más reducido cuando la sonda presentaba cargas. La señal inespecífica encontrada fue muy similar a la señal inespecífica generada por la biotina endógena (Figura 91). Por tanto, podrían existir dos explicaciones. Por un lado, la cantidad de sonda inespecífica en el citoplasma celular podría ser tan considerable que favoreciese reacciones inespecíficas en el bolsillo químico o, que, el uso de reactivos como el agente reductor (NaBH₃CN) pueda interferir con el bloqueo previo de la biotina endógena, liberando esta biotina y generando de nuevo la señal inespecífica (Figura 92).



Figura 91. Incubación consonda DGL de esqueletopeptídico neutral. La sondaDGL genera señalesinespecíficas al ser incubadaen la muestra previareacción TSA. Microscopio deepifluorescencia Zeiss AxioImager A.1, aumento 63×.Barra escala: 20 μm



Figura 92. Incubación con sonda DGL de esqueleto peptídico con posiciones quirales. La sonda DGL con centros quirales genera señales inespecíficas al ser incubada en la muestra previa reacción TSA, sin embargo, la señal es más reducida que la aplicación de sondas PNA con esqueleto neutral. Microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager A.1, aumento 63×. Barra escala: 20 μm

(2) Incubación con SMART-Nucleobase. El resultado de la incubación de la muestra con la SMART-Citosina-biotina seguida por amplificación con TSA mostró claramente que la SMART-nucleobase se une inespecíficamente en el citoplasma celular (Figura 93). Incluso, la señal aumenta conforme aumenta la concentración de sonda utilizada en el ensayo. Este resultado muestra que es necesario realizarse un proceso de optimización para bloquear estas señales inespecíficas. O bien realizar una fijación más intensa que bloquee las posibles aminas primarias y/o secundarias presentes en las biomoléculas de la célula, o bien incubar con SMART-Nucleobases sin marcaje previa incubación con la SMART-Nucleobase específica en el marcaje por química dinámica.



Figura 93. Incubación con SMART-C-Biotina previa reacción TSA. La SMART-C-Biotina genera una señal inespecífica en la muestra, necesitando explorar métodos de bloqueo eficaces para ser eliminado. Microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager A.1, aumento 63×. Barra escala: 20 µm.

3.7. Discusión

En este capítulo se ha realizado los primeros ensayos para detectar transcritos de ARN, concretamente, ARN mensajero de KRAS variante B con resolución de una base con el fin de detectar variaciones de nucleótidos como presencia de mutaciones puntuales que lideran el desarrollo de procesos tumorales. Los protocolos utilizados para esta detección han sido combinaciones de protocolos usados en *single-molecule* RNA-FISH para detectar ARN *in situ* junto con protocolos de PNA-FISH para detectar secuencias repetidas.

Una diferencia importante de esta estrategia con las anteriores descritas para detectar variaciones de un nucleótido *in situ*, es que la aplicación de química dinámica *in situ* no resultaría en la detección de moléculas de ARN individuales con resolución de una base, si no en una señal dispersa y relativa en el citoplasma, indicativa de la presencia de la mutación. Si bien esto tiene la desventaja de no poder realizar cuantificación absoluta de moléculas de ARN con resolución de una base, presenta la ventaja de ser un método relativo de detección de presencia de mutaciones fácilmente aplicable en laboratorios clínicos y sin requerimientos complejos.

Sin embargo, estos protocolos han mostrado ser ineficaces en combinación con sondas PNA para detectar transcritos de ARN en citoplasma celular. Así mismo, el sistema utilizado de detección, biotina-estreptavidina, se ha mostrado ineficaz, debido a que, la señal que se espera de la incubación con sondas PNA marcadas con biotina o de la incorporación de la SMART-Nucleobase-Biotina es baja, y, por tanto, siendo difícil distinguirla de la biotina endógena presente en las líneas celulares. Actualmente no existen protocolos estandarizados para detectar transcritos de ARN mensajero con sondas PNA y FISH, sin embargo, si se han publicado protocolos para la detección de ARN ribosómico 16S con estas sondas. Esto nos hace pensar que las sondas PNA son aptas para los ensayos FISH en la detección de ARN mensajero. El ARN ribosómico 16S puede constituir hasta un 80 % del ARN total celular, siendo el ARN mensajero bastante menos expresado, variando entre el 1 – 5 % del ARN total [169]. Sin embargo, el hecho de que las sondas PNA se utilicen para detectar ARN ribosómico en citoplasma implica la posibilidad de detectar, al menos, transcritos de ARN mensajero abundantemente expresados. La existencia de protocolos de aplicación de las sondas PNA para detectar ARN ribosómico en microorganismos, incluidos eucariotas como levaduras, supone un punto de partida para aplicar el marcaje por química dinámica in situ. Se ha demostrado que la naturaleza sin carga del PNA permite la hibridación bajo condiciones de astringencia bajas, permitiendo incluso penetrar en la estructura secundaria del ARN ribosómico. Por ejemplo, en estos protocolos, se aconseja utilizar 1 % Tritón 100-X en aquellos materiales de carbón en el que se vayan a incubar las sondas, recomendando utilizar portaobjetos de teflón para evitar la unión inespecífica de las sondas al portaobjetos, así como lavados con 25 mM Tris-HCl, pH 10, 137 mM NaCl y 3 mM KCl para lavar los PNA [163]. Estas consideraciones, junto con el correspondiente protocolo de optimización necesario para evitar estas uniones inespecíficas, son necesarias.

Sería interesante, además, establecer un control negativo adecuado. Debido a que una de las sondas PNA diseñadas es frente a GFP, cabe la posibilidad de diseñar un sistema de control positivo con células transfectadas con plásmidos para expresar GFP junto con un control negativo de células no transfectadas, lo que daría lugar a una señal inequívoca de detección de ARN mensajero de GFP. Todos estos ensayos de optimización estarán encaminados a detectar ARN mensajero con sondas PNAs de una forma clara, para a continuación introducir la resolución de una base mediante la aplicación de química dinámica.

Otra consideración es tratar de identificar transcritos de KRAS abundantemente expresados en líneas celulares previamente testadas, como por ejemplo el miR-122, microARN específico hepático, que presenta una cantidad de copias de 66.000 copias por célula [192], pudiendo ser

170

un candidato para testar este sistema con otros tipos de ARN. Por último, el sistema de detección de biotina podría ser sustituido por otros sistemas como digoxigeninaantidigoxigenina, debido a que la biotina endógena presente en muchos tipos celulares podría interferir con los resultados obtenidos. Además, este análisis podría ser aplicado a otros tipos de genes como EGFR, HER-2 o ALK entre otros, en los que la aparición de mutaciones puntuales puede provocar el desarrollo de procesos tumorales.

Como conclusión, es necesario realizar un proceso de optimización intenso para, en primer lugar, eliminar las señales inespecíficas y, en segundo lugar, detectar ARN mensajero con sondas PNA. Este sistema de detección de transcritos de ARN con resolución de una base estará supeditado, al menos inicialmente, a detectar transcritos abundantemente expresados, siendo, además, la amplificación de señal enzimática necesaria. Cabe destacar que esta aplicación puede ser combinada con tecnologías de amplificación post-hibridación, para detectar aquellas moléculas de ARN mensajero amplificadas, lo que permitiría reducir la concentración de sonda utilizada y diferenciar la señal obtenida de la señal inespecífica. Además, la aparición de nuevas moléculas de unión a aptámeros de ARN para detectar ARN con microscopía de superresolución, abre la posibilidad de combinar estas tecnologías para detectar de forma clara la presencia de ARN mensajero con sondas PNA.



Circle-to-circle Amplification para diagnóstico molecular del virus del Zika y evaluación de la eficacia de fármacos antiflavivirales (Objetivo 3)

Capítulo 4. Circle-to-circle Amplification para diagnóstico molecular del virus del Zika y evaluación de la eficacia de fármacos antiflavivirales (Objetivo 3)

4.1. Introducción

4.1.1. Justificación

Uno de los objetivos del diagnóstico molecular es realizar la detección de agentes infecciosos en el punto de atención (POC) del paciente, aun manteniendo una alta especificidad y sensibilidad. Esto permitiría realizar diagnósticos eficaces y controlar brotes epidemiológicos con mayor facilidad. Así mismo, la posibilidad de acoplar el diagnóstico molecular a sistemas de microfluídica que aumenten la sensibilidad de detección son algunas de las mejoras que permitirían facilitar el diagnóstico en el POC. La RT-qPCR es la técnica *gold-standard* para detectar patógenos y monitorizar la progresión de un brote epidemiológico, sin embargo, tal como se mencionó en la *sección 1.1.1 y 1.1.3*, la RT-qPCR no está exenta de limitaciones, ya que requiere de ciclos de temperatura complejos, necesitando en tanto un termociclador, y, por tanto, dificultando acoplar la detección a un sistema portátil y dificultando la obtención de resultados rápidos.

En el presente capítulo se explora la técnica *Circle-to-circle amplification* (C2CA) para llevar a cabo la detección de ADNc correspondiente al ARN del virus del Zika y monitorizar la eficacia de fármacos antiflavivirales. Esta investigación se llevó a cabo como parte de una estancia predoctoral en el laboratorio dirigido por Mats Nilsson en el *Science For Life Laboratory* del Karolinska Institutet Science Park, Suecia. C2CA es un método de amplificación isotermal preciso, que no requiere ciclos de temperatura y, por tanto, facilita su implementación tanto en sistemas portátiles como en sistemas de microfluídica, pudiendo mejorar la sensibilidad de detección [193].

En este capítulo se explorará la aplicación de C2CA para detectar el virus del Zika, causante de múltiples brotes epidemiológicos de la fiebre del Zika en África y en Asia, que además se extendió a la Polinesia Francesa y más tardé causó una gran epidemia en América del Sur, afectando especialmente a Brasil [194,195]. De entre sus síntomas, el nacimiento de neonatos con microcefalia es el más conocido, siendo de especial preocupación entre la población de mujeres embarazadas. El diagnóstico diferencial del virus del Zika es muy complicado, dada la

similitud de los síntomas con otras infecciones virales y el diagnóstico molecular se basa principalmente en RT-qPCR [196], difícil de implementar en diagnóstico POC.

Para ello se validará si la técnica C2CA es una alternativa sensible, específica y eficaz a la RTqPCR para detectar el virus del Zika, así como su capacidad de monitorizar fármacos antiflavivirales. Por último, se describe brevemente cómo estos resultados se implementaron en un dispositivo de microfluídica basado en cromatografía de afinidad para aumentar la sensibilidad de detección del virus del Zika.

4.1.2. Rolling Circle Amplification (RCA)

La Amplificación por Circulo Rodante, o, del inglés, Rolling Circle Amplification (RCA) es un método de amplificación de ácidos nucleicos unidireccional e isotermal, que utiliza como molde un ácido nucleico circular generando largas cadenas de ADN monocatenario [197,198]. Este método fue desarrollado basándose en el mecanismo molecular natural de Replicación por Circulos Rodantes (RCR, del inglés "Rolling Circle Replication") que tiene lugar en ácidos nucleicos circulares, como plásmidos, genomas bacterianos y virales. Para que la amplificación por RCA tenga lugar, es necesario un molde de ADN circular, un primer y una polimerasa que lleve a cabo la reacción. Tras la síntesis se genera un ADN monocatenario largo que contiene la secuencia de la diana circular repetida miles o cientos de miles de veces. El producto formado tras RCA puede ser detectado de múltiples modos, por ejemplo, mediante la incorporación de dNTPs marcados fluorescentemente, el uso de intercalantes de ácidos nucleicos fluorescentes como SYBR Green, por electroforesis en gel de agarosa o mediante sondas de hibridación en estas regiones repetidas, marcadas con moléculas fluorescentes o moléculas que permiten amplificaciones mediante inmunoensayos o amplificaciones enzimáticas [197,199]. Con estos tipos de marcajes, el ADN monocatenario amplificado puede ser detectado mediante técnicas basadas en fluorescencia, como citometría de flujo, microscopía de fluorescencia o espectrofluorometría.

Los primeros enfoques de RCA se llevaron a cabo utilizando la enzima minus-exo Klenow y Taq polimerasa. Actualmente la enzima principalmente usada en ensayos RCA es la enzima phi29 aunque otras polimerasas como Bst, Vent-exo-DNA y T7 (para amplificación de ARN) también son usadas según el objetivo de cada ensayo [198]. La enzima phi29, descubierta por la científica española Margarita Salas, procedente del fago phi29 de *Bacillus subtilis*, presenta una alta capacidad de procesamiento, alta actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5', capacidad de desplazamiento de cadena, baja tasa de errores y genera largos fragmentos amplificados [200,201]. Estas características hacen que la enzima phi29 se utilice en varias aplicaciones como RCA o Amplificación de Desplazamiento Múltiple (MDA, del inglés *"Multiple Displacement Amplification"*) [202].

La sonda circular para iniciar RCA puede ser diseñada y sintetizada mediante el uso de ligasas en el caso de ADN (como la T4 ADN ligasa o CircLigasa) o con el uso de la enzima T7 ARN polimerasa en el caso de ARN [198]. Cuando la reacción se lleva a cabo con un solo tipo de *primer*, tiene lugar una amplificación RCA lineal. Sin embargo, el uso de múltiples *primers* que reconocen la región repetida amplificada, lleva a cabo una amplificación RCA exponencial muy eficiente, conocida como *Hyperbranched RCA* (HRCA) [198,202], generando una amplificación ramificada (*Figura 94*).



Figura 94. Diferentes estrategias de Rolling Circle Amplification. A) Una diana circular es hibridada con un primer que permite iniciar la amplificación mediante la enzima phi29, generando una secuencia monocatenaria altamente repetida. La incubación con un detector (por ejemplo, una sonda de detección marcada con un fluoróforo) permite detectar dicha secuencia repetida. B) Si tras la amplificación por RCA se incuba el producto amplificado de nuevo con diferentes primers, cada uno de ellos inicia una amplificación por RCA. Este método es conocido como HRCA y genera un producto altamente amplificado y ramificado. C) El uso de una sonda Padlock que se circulariza permite reconocer a una diana lineal. Tras ser ligada, la diana es digerida mediante actividad exonucleasa de phi29, excepto la región hibridada con la sonda Padlock. Este fragmento de diana actúa como primer y permite la amplificación mediante la enzima phi29. Reproducido de la referencia [198] con permiso de ACS Publications.

Se han desarrollado numerosas estrategias basadas en RCA para detectar diferentes tipos de dianas, como ADN genómico, ARN mensajero, microARNs y proteínas de patógenos. También

se han desarrollado estrategias basadas en RCA para detectar modificaciones epigenéticas y para detectar pequeñas moléculas. En inmunoensayos como ELISA, se ha acoplado RCA para mejorar la sensibilidad de esta técnica y mejorar los límites de detección, acoplando un primer al antígeno diana y posteriormente llevando a cabo una reacción RCA (conocido como inmuno-RCA) [197,198,203,204]. La amplificación por RCA también ha sido adaptada a dispositivos de microfluídica para desarrollar plataformas de análisis de ácidos nucleicos y proteínas en sistemas portátiles [205]. Se han desarrollado estrategias que combinan el uso de nanopartículas con RCA [206], estrategias para la formación de nanoestructuras de ADN o nanoensamblajes en materiales de ADN [207], emergiendo como nuevas herramientas para una amplia variedad de aplicaciones biológicas como liberación de drogas o encapsulación [205].

La introducción de sondas Padlock (PLPs, del inglés "*Padlock Probes*") en la técnica RCA permitió amplificar ácidos nucleicos que no son inicialmente circulares añadiendo una alta especificidad a la técnica. Las sondas Padlock consisten en ADN monocatenario con dos secuencias en los extremos 5' y 3' complementarias a dos secuencias inmediatamente adyacentes en la diana [183,208,209]. Cuando se realiza la hibridación, los extremos hibridan inmediatamente uno adyacente del otro, generándose una forma circular de la diana. A continuación, la sonda es ligada mediante la adición de ligasas, generando una sonda circular unida covalentemente al ácido nucleico diana (ver **Figura 94C**). La enzima phi29 presenta actividad exonucleasa 5' \rightarrow 3', eliminando el ácido nucleico diana, a excepción de la secuencia que hibrida con la sonda Padlock. Esta secuencia actúa como *primer* de la enzima phi29, mediando la amplificación RCA. La combinación de sondas Padlock y RCA discrimina variaciones de un nucleótido como SNPs o mutaciones puntuales, debido a que la presencia de estos desajustes evita la ligación de la sonda [202].

Con esta técnica se pueden detectar ácidos nucleicos lineales con gran versatilidad, debido a que en las sondas Padlock pueden introducirse regiones funcionales para detectar y capturar el producto amplificado, o incluso secuencias que incluyan aptámeros de ADN como enzimas de ADN [210], dominios espaciadores o sitios de restricción de enzimas, dándole una gran versatilidad a la técnica. La reacción RCA se lleva a cabo en una temperatura constante, isotermal, es decir, no necesita ciclos de temperatura y, por tanto, no requiere instrumentación compleja, haciendo que la reacción tenga características favorables para su uso en el diagnóstico POC.
4.1.3. Circle-To-Circle amplification (C2CA)

A partir de la técnica RCA se ha desarrollado un método basado en más de un ciclo de RCA, conocido como *Circle-To-Circle Amplification* (C2CA). Se trata de un método muy sensible y robusto que permite detectar dianas en una baja concentración, generando altas concentraciones de producto amplificado. En C2CA, la sonda Padlock circularizada es amplificada por RCA. A continuación, la enzima polimerasa es inactivada y el amplicón generado es incubado con un oligonucleótido de restricción, generando un sitio de restricción que permite monomerizar el amplicón. Tras la restricción, las enzimas de restricción son inactivadas y los monómeros son ligados de nuevo mediante adición de enzima ligasa. El oligonucleótido utilizado para generar el sitio de restricción es usado ahora como primer de un segundo ciclo de RCA utilizando de nuevo la enzima phi29 (**Figura 95**). Cada ciclo de amplificación es lineal, de modo que se preserva la proporción de moléculas amplificadas, pudiendo comparar entre diferentes dianas [193].

La técnica C2CA es un método molecular muy versátil que ha sido adaptado a sistemas de microfluídica para detectar el patógeno *Pseudomonas aeruginosa* causante de neumonía en humanos [211], se ha desarrollado un método colorimétrico para detectar el virus causante de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo [212], ha sido adaptada a microchips de detección del patógeno *Vibrio cholerae* causante del cólera en humanos [213] así como ha sido adaptada a sistemas de detección electroquímicos para la detección del virus del ébola [214]. Recientemente se ha desarrollado un método optomagnético para detectar el virus SARS-CoV-2 [215].



Figura 95. Esquema de Circle-To-Circle Amplification. La sonda circular unida a su diana o bien una diana circular unida a un primer permite a la enzima phi29 iniciar la amplificación (primer ciclo de amplificación). El producto amplificado se hibrida con sondas que generan un sitio de restricción. Tras la incubación con la correspondiente enzima de restricción, el producto amplificado queda monomerizado. Cada monómero es a continuación circularizado mediante el uso de una enzima ligasa. La sonda utilizada para generar el sitio de restricción actúa ahora como primer, permitiendo a la enzima phi29 iniciar nuevamente la reacción (segundo ciclo de amplificación). Tras la amplificación, el producto amplificado puede ser nuevamente incubado con una sonda que genera un sitio de restricción para monomerizar el producto amplificado y, tras la ligación, realizar un nuevo ciclo de amplificación. Los colores del esquema permiten seguir la complementariedad existente entre diana circular y sonda en cada paso. Reproducido de la referencia [193].

4.1.4. Biología, epidemiología y diagnóstico del virus del Zika

El virus del Zika pertenece al género *Flavivirus*, compuesto por hasta 53 especies de virus. Es un arbovirus transmitido por mosquitos del género *Aedes*. Puede aparecer como reservorio en estos mosquitos y, en general, el ser humano es un hospedador accidental. Está relacionado con el Virus de la Fiebre Amarilla, el Virus Dengue y el Virus del Nilo Occidental.

El virus del Zika presenta un diámetro de 50-60 nm formado por una nucleocápsida y un genoma de ARN monocatenario de 10.794 nucleótidos de longitud de polaridad positiva en su interior. Basado en la secuencia de nucleótidos del gen NS5 se han descrito varias cepas: Polinesia Francesa, africana, asiática y americana. Contiene un marco de lectura único con una región no traducida (UTR) en los extremos 3' y 5' y codifica para una poliproteína que es dividida en tres proteínas estructurales y siete no estructurales [216–218].

El genoma del virus es de polaridad positiva y sirve de molde para sintetizar ARN mensajero viral que será traducido en la poliproteína viral, que es escindida en cada una de las proteínas estructurales y no estructurales y transcrito en ARN viral genómico. Las proteínas estructurales son la proteína de la cápsida (C), la proteína Pre-membrana (PrM) y la proteína envoltura (E), formando una estructura icosaédrica. La proteína E forma la superficie del virus y juega un importante papel en la unión del virus a la membrana y la entrada en la célula. Las proteínas no-estructurales reciben el nombre de NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 y cumplen funciones en la replicación del virus (**Figura 96**).



Figura 96. Estructura del genoma del virus del Zika. El genoma del virus del Zika es un ARN monocatenario de polarización positiva. Este presenta una longitud de 10.794 nucleótidos y está organizado en regiones codificantes de proteínas estructurales seguida de regiones codificantes de proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Reproducido de la referencia [219].

Capítulo 4. Introducción

Los datos acerca de la patogénesis del virus del Zika deben ser ampliados, pero el virus del Zika es capaz de afectar a una amplia gama de tejidos, que incluyen la médula espinal, el líquido cefalorraquídeo, el sistema hemolinfático, el sistema gastrointestinal, entre otros [220]. El periodo de incubación es de 3 a 14 días, la infección suele tener de 2 a 7 días de duración y las infecciones pueden ser de sintomatología leve, moderada o asintomática, existiendo casos de gravedad con complicaciones neurológicas. Los síntomas más frecuentes son fiebre, erupciones cutáneas, conjuntivitis, dolor muscular y articular, malestar y cefaleas. Los casos más graves pueden dar lugar a afecciones neurológicas, como el síndrome de Guillain-Barré, neuropatía, meningitis y mielitis. Además, se asocia con complicaciones durante el embarazo y aborto prematuro y causa malformaciones congénitas en neonatos, entre ellas microcefalia, uno de los síntomas más conocidos de esta enfermedad [194,196,221].

El virus del Zika se identificó en humanos por primera vez en 1968 en Nigeria y posteriormente hubo evidencias de infección por el virus del Zika en otros países africanos y algunos asiáticos. En abril y mayo de 2007 tuvo lugar un brote epidemiológico del virus del Zika en el estado de Yap, perteneciente a los estados de la Micronesia en el Pacífico Este. El 73 % de la población mostró evidencias serológicas de una infección por virus del Zika reciente [194,221,222]. La segunda epidemia tuvo lugar en 2013, en las islas de la Polinesia Francesa, en el que todos los archipiélagos de la polinesia francesa fueron afectados. Para el final de la pandemia, se confirmaron un total de 30.000 casos y, según evidencias serológicas, se llegó a una infección de hasta el 50 – 60 % de la población. El tercer brote epidemiológico tuvo lugar en 2015, momento en el que el virus emergió en América del Sur, concretamente en Brasil. La epidemia fue bastante importante debido a su alta diseminación. Es posible que la Copa del Mundo y el Campeonato mundial de Canoa introdujese y ayudase a diseminar la enfermedad. Las afecciones llegaron a alcanzar hasta medio millón de personas en Brasil [194]. No existe tratamiento efectivo para la fiebre del Zika. En general, los síntomas leves son tratados con medicamentos comunes antiinflamatorios y analgésicos, así como antihistamínicos para las erupciones [194].

El diagnóstico diferencial del virus del Zika es difícil, debido a que los síntomas son similares a otros virus como el Dengue o el virus Chikungunya. Puede sospecharse que personas con síntomas que hayan viajados a zonas donde haya transmisión del virus o mosquitos del género *Aedes*. Sin embargo, son necesarias pruebas de laboratorio para diagnosticar el virus del Zika [223,224]. Estas pruebas se basan fundamentalmente en la identificación del ARN viral por RT-qPCR. La RT-qPCR permite detectar el virus de forma sensible y específica, e incluso permite diferenciar entre el linaje asiático y africano. También puede identificarse mediante test

182

serológicos de anticuerpos IgM que aparecen de forma temprana [196]. La organización Mundial de la Salud ha establecido medidas para la prevención, vigilancia y control de la enfermedad, y, además recomienda reforzar los laboratorios de todo el mundo para poder llevar a cabo pruebas de detección del virus del Zika y aumentar los esfuerzos para controlar las poblaciones de mosquitos *Aedes* [225]. Concretamente, la OMS recomienda fomentar la investigación y el desarrollo de una prevención efectiva y un diagnóstico temprano para el control de posibles brotes futuros. Otros parámetros en informes clínicos utilizados para el diagnóstico son la gamma-glutamil-transferasa, leucopenia, serum lactato deshidrogenasa, trombocitopenia y algunas proteínas marcadoras elevadas (como la proteína C reactiva, fibrinógeno o ferritina) pueden ayudar a diagnosticar o sospechar de la infección.

También se han desarrollado métodos NAAT para el diagnóstico del virus del Zika, como la amplificación isotermal mediada por bucle (LAMP, del inglés *"Loop-mediated isothermal Amplification"*) y la amplificación isotérmica mediada por bucle combinada con retrotranscripción (RT-LAMP) [224]. Existen varios métodos basados en LAMP y RT-LAMP que difieren en el gen diana detectado del virus del Zika o en el método de detección de la amplificación, en general mediante turbidimetría o marcadores fluorescentes. También se ha desarrollado un método de diagnóstico basado en amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA, del inglés *"Nucleic Acid Sequence Based Amplification"*) acoplada a reacciones enzimáticas amplificadoras de señal y detección colorimétrica. Por último, se ha publicado el método SHERLOCK (del inglés *"Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing"*), que está basado en la detección de ácidos nucleicos y escisión colateral mediada por Cas13a de ARN reportero, pudiendo realizarse en tiempo real (detallado en *sección 1.2.2.6*) [41,224,226].

4.1.5. Aplicación de C2CA para detectar el virus del Zika en PBMC infectadas

En este capítulo se llevará a cabo la aplicación de la técnica C2CA para detectar el virus del Zika. Para ello, el ARN extraído de células sanguíneas periféricas mononucleares (PBMC) infectadas con el virus del Zika es retrotranscrito en ADNc viral e incubado con sondas Padlock que hibridan con dicho ADNc. A continuación, se media una ligación, circularizándose la sonda, seguido de una amplificación mediante la enzima phi29. Tras esta amplificación los productos generados (RCPs, del inglés *"Rolling Circle Product"*) son incubados con oligonucleótidos de restricción que generan sitios de restricción, de modo que, tras la correspondiente incubación con la enzima de restricción, se generan monómeros que pueden volver a ser ligados y circularizados. Estos nuevos círculos son amplificados en una segunda ronda por la enzima phi29 utilizando el primer del oligonucleótido de restricción como primer iniciador de la amplificación (**Figura 97**). En este capítulo se utilizará la técnica C2CA basada en dos rondas de amplificación para detectar secuencias del virus del Zika, establecer el límite de detección, detectar el virus en células PBMC infectadas y realizar un ensayo preliminar para evaluar la eficacia de fármacos anti-flavivirales.



Figura 97. Esquema de C2CA para detección de secuencias sintéticas del virus del Zika. El ARN del virus del Zika es retrotranscrito en ADNc. El ADNc es incubado con una sonda Padlock (PLP) que se circulariza al hibridar sus extremos con la diana. A continuación, se lleva a cabo la ligación y amplificación mediante RCA. El producto RCP formado es incubado con oligos de restricción (RO), que permiten monomerizar el RCP (tras la adición de la enzima de restricción AluI) y los monómeros formados son nuevamente ligados. RO actúa como primer de una segunda ronda de amplificación. Los RCPs formados son marcados con DO (Cy3) y CO (Biotina) para su captura y detección mediante microscopía.

4.2. Resultados

4.2.1. Cuantificación de RCPs obtenidos por RCA y C2CA mediante microscopía fluorescente

En todos los casos, tras la amplificación por un ciclo de RCA o dos ciclos de amplificación RCA (C2CA), los productos RCA obtenidos (RCPs, del inglés *"Rolling Circle Product"*) fueron cuantificados a través de imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia (**Figura 98**). En concreto, los ensayos fueron realizados por duplicado o triplicado y se tomaron 5 imágenes mediante microscopía en el canal para detectar Cy3, pero, además, también se tomaron en 6 canales distintos para detectar si existen señales inespecíficas y descartarlas: Atto, Texas Red, FITC, Cy5, DAPI y Cy7. En aquellas imágenes en las que se llevó a cabo la cuantificación de los RCPs, el análisis se realizó mediante los softwares *Cell profiler e ImageJ*. Todos los detalles metodológicos se detallan en la *sección 6.4.5. del capítulo 6. Metodología*.



Figura 98. Flujo de trabajo seguido para cuantificar los RCPs obtenidos tras RCA y C2CA y establecer las curvas de calibración y así como analizar ADNc correspondiente al ARN viral. A) Las muestras fueron visualizadas por microscopía de epifluorescencia en el canal Cy3, donde se analizó el número de RCPs, el diámetro de cada RCP y la intensidad de señal de los RCPs. B) De cada duplicado se cuantificaron 5 regiones diferentes, analizándose un total de 10 imágenes. C) Las imágenes fueron tomadas por Z-Stack, para asegurar contabilizar todos los RCPs en todos los planos y fueron analizadas mediante Cell profiler e ImageJ. D) Las imágenes se visualizaron en 6 canales diferentes para descartar las señales inespecíficas.

4.2.2. Validación de RCA para detectar secuencias sintéticas del virus del Zika

Para validar las sondas Padlock y la amplificación por RCA, se llevó a cabo un ensayo empleando dos sondas Padlock conteniendo cinco regiones funcionales cada una. Estas sondas Padlock son de 88-mer cada una, y son complementarias a una región de 36-mer que se corresponde con el ADNc del ARN viral que codifica las proteínas C y PrM del virus del Zika. Las regiones funcionales de las sondas Padlock incluyen dos secuencias en los extremos 5' y 3' complementarias a estos 36-mer de la diana, de modo que, al hibridar la sonda Padlock con su diana, se circulariza (secuencias en rojo y verde en la **Tabla 14**). A continuación, incluye una tercera región que contiene una secuencia para ser detectada por un oligonucleótido de detección Cy3 (DO), que está marcado con el fluoróforo Cy3 (secuencias en naranja en la **Tabla 14**). Estos DO se unirán a las secuencias amplificadas en los RCPs permitiendo detectarlos.

La cuarta región contiene una secuencia que será reconocida por oligonucleótidos de captura (CO), marcados con biotina (secuencias en azul en la **Tabla 14**). Los CO hibridan con el RCP y permiten su captura a través de la biotina, una característica que permitirá adaptar la detección de los RCPs a un sistema de microfluídica. La quinta región se corresponde a una secuencia de restricción de 4 nucleótidos, que es reconocida por un oligonucleótido de restricción (RO) (secuencia subrayada en **Tabla 14**), generando un sitio de restricción de la enzima *Alul* que permitirá monomerizar el RCP obtenido para llevar a cabo una segunda ronda de amplificación cuando se realice C2CA, detallado en las siguientes secciones. Este RO actúa como primer del segundo ciclo de amplificación. Cabe destacar que las regiones que serán reconocidas por los oligos de detección y de captura, así como la secuencia que será reconocida por el oligo de restricción son de igual secuencia en todas las sondas Padlock.

Para validar estas sondas y las regiones funcionales incluidas en estas, se diseñaron oligonucleótidos sintéticos de 89-mer miméticos al ADNc correspondiente del ARN viral que codifica las proteínas C y PrM. Estos dos oligonucleótidos sintéticos contienen la secuencia de 36-mer complementaria a los extremos de las sondas Padlock (secuencias marcadas en rojo y verde en la **Tabla 14**). Estas secuencias marcadas en rojo y verde son complementarias a las secuencias marcadas con rojo y verde en las sondas Padlock, y se corresponden con las secuencias de reconocimiento entre la sonda Padlock y la diana. Tras la unión con su diana y la circularización, la sonda Padlock es ligada y amplificada mediante RCA por la enzima Phi29. En la **Tabla 14** se detallan todas las secuencias utilizadas para la validación y en la **Figura 99** se detalla el esquema seguido para la validación.

Tabla 14. Secuencias de las sondas Padlock, dianas sintéticas miméticas a ADNc correspondiente a las regiones codificantes de la proteína C y la proteína PrM del virus del Zika, oligos de detección y captura utilizados para validar RCA.

Sondas PLPs y dianas sintéticas para validar RCA			
PLP C_Protein	5' TAATAAAGAAGTTCAAGAAA GTGTATGC <u>AGCTCCTCAGTAATAGTGTCTTACCTCAGCCGATGCAGTGTAAT</u> AAAGAGGCTATGGAAA 3'		
Diana sintética C_Protein	5' TITCTTGAACTTCTITATTA TTTCCATAGCCTCTTTTTTCCCCACTGAACCCCATCTATTGATGAGACCCAGTGATGG CTTGATTGCCG 3'		
PLP Pr_M1	5' CATATCTTTTCCAACCA GTGTATGC <u>AGCT</u> CCTCAGTAATAGTGTCTTACCTCAGCCGATGCAGTGTAAT CGATGCTGGGGAGGC 3'		
Diana sintética Pr_M1	5' TGGTTGGAAAAGATATG GCCTCCCCAGCATCGTTTCTGTCCAAGTACATATAGTATGCACTCCCACGTCTAGTGA CCTCCGCTGC 3'		
Oligo Detección (DO) 1 (RCA)	5' - <mark>CTCAGCCGATGCAGTGTAATTTTT</mark> – Cy3 – 3'		
Oligo Captura (CO) 1 (RCA)	5' – Biotin - TTTTTCCTCAGTAATAGTGTCTTAC		



Figura 99. Esquema de RCA para detección de secuencias sintéticas del virus del Zika. La sonda Padlock se une a la diana, circularizándose. A continuación, se lleva a cabo la ligación y amplificación mediante RCA. El producto RCP formado contiene cientos de repeticiones de la secuencia azul y naranja, correspondiente a los oligonucleótidos DO y CO. A continuación, se lleva a cabo una incubación del producto RCP con oligo DO marcado con Cy3 para su detección por microscopía y CO marcado con biotina para su captura y análisis por microfluídica (ver siguientes secciones).

Tras realizar el protocolo de validación de las dianas sintéticas, los RCPs generados se depositaron en un portaobjetos y se visualizó por microscopía confocal para detectar cada punto

individual como una molécula amplificada por RCA. La concentración de cada sonda, diana y oligos se detallan en la **Figura 99**. Cabe destacar que el rendimiento de la reacción (moléculas de ADN sintético añadidas frente a moléculas RCP detectadas) no es total, por ello, el uso de 100 pM de sonda es adecuado para la detección de 1 nM de diana sintética sin generar señal inespecífica. La validación de ambas dianas sintéticas dio como resultado la formación de RCPs visualizados por microscopía confocal (**Figura 100**).

Diana	C_Protein/Pr_M1	1 nM / 100 pM
PLP	C_Protein PLP/Pr_M1 PLP	100 pM
DO	Oligo detección 1 (RCA)	10nM
со	Oligo captura 1 (RCA)	10nM



Figura 100. Resultado RCA para la detección de secuencias sintéticas mímicas al ADNc de la región codificante de la proteína C y la proteína PrM del virus del Zika. A) La tabla indica las concentraciones de las dianas, las sondas Padlock y los oligos DO y CO utilizados para validar RCA. B) Imagen microscopía fluorescencia. Cada punto representa una molécula diana amplificada por RCA. Microscopio Zeiss Axio Imager Z2. Objetivo 20×.

4.2.3. Evaluación de la interferencia de los oligos DO y CO

Α

Los oligonucleótidos DO y CO para detectar y capturar los RCPs se diseñaron para que el fluoróforo Cy3 y la biotina se encontrasen en extremos opuestos, evitando problemas estéricos al hibridar. Para validar si la incubación exclusivamente con DO y la incubación con ambos oligos, DO y CO, interfiere en la detección de los RCPs detectados por microscopía, se realizó un ensayo por triplicado utilizando una concentración de 100 pM de PLP y 100 pM de diana sintética correspondiente a ADNc de la región codificante de la proteína C del virus del Zika junto con un exceso de 10 nM de DO y CO. Además del número de RCPs detectados, se midió la media de la intensidad de señal de todos los RCPs detectados y la media del diámetro de cada RCP detectado, utilizando el software *Cell profiler*. Una gran variación indicaría cierta interferencia, sin embargo, el resultado mostró una detección similar en ambos casos (**Figura 101**).

	C_inotelli	100 bivi
PLP	C_Protein PLP	100 pM
DO	Oligo detección 1 (RCA)	10 nM
CO	Oligo captura 1 (RCA)	10 nM



Figura 101. Comparativa de la señal obtenida de RCA utilizando solo el oligo DO y ambos oligos DO+CO. A) La tabla muestra las concentraciones utilizadas de la diana, sonda y los oligos DO y CO. B) Imagen de RCPs obtenidos por microscopía de epifluorescencia. C) Comparación de número de RCPs obtenidos incubando con un DO y con DO+CO. No se apreció una variación significativa en el número de RCPs. Media de intensidad y de diámetro de cada RCP analizado. Estos parámetros son obtenidos de forma automática mediante análisis por Cell profiler y carecen de unidades. Microscopio Zeiss Axio Imager Z2. Objetivo 20×.

4.2.4. Curva de calibración 1RCA para la diana sintética correspondiente a ADNc de la región codificante de la proteína C del virus del Zika

A continuación, se procedió a establecer una curva de calibración 1RCA para la diana sintética correspondiente a ADNc de la región codificante de la proteína C del virus del Zika para calcular el límite de detección y establecer si la técnica mantiene una regresión lineal de amplificación con respecto a la concentración. El ensayo se realizó utilizando 100 pM de sonda Padlock, 10 nM de DO y CO y las siguientes concentraciones de diana sintética: 1000 pM, 100 pM, 10 pM, 1 pM (**Figura 102**).

Diana	C_Protein	1 nM / 100 pM / 10 pM / 1 pM
PLP	C_Protein PLP	100 pM
DO	Oligo detección 1 (RCA)	10 nM
CO	Oligo captura 1 (RCA)	10 nM



Figura 102. Imágenes de microscopía de los RCPs obtenidos en la curva de calibración y analizados mediante microscopía de fluorescencia. La tabla muestra las concentraciones usadas. Se observa una disminución de los RCPs obtenidos conforme disminuye la concentración. Por debajo de 1 pM no se encontraron RCPs en la muestra. Microscopio Zeiss Axio Imager Z2. Objetivo 20×.

El resultado mostró una señal proporcional a la concentración de la diana sintética, donde puntos de concentración inferiores a 1 pM no mostraron RCPs. Para analizar estas señales obtenidas, se llevó a cabo la cuantificación de cada uno de los puntos de concentración con el método anteriormente descrito y utilizando los siguientes parámetros:

-Cell profiler ajustando parámetros al ruido de fondo. En este caso se ajustan los parámetros según el ruido de fondo de cada una de las imágenes tomadas. Cada imagen es transformada al

formato *Black* & *White* siguiendo la opción del programa *Zeiss Zen Black Edition* y se identifican los RCPs presentes.

-*Cell profiler fijando parámetros*. Es posible analizar todas las imágenes en conjunto. Para ello, las imágenes son transformadas al formato ORG en el programa *Zeiss Zen Black Edition* y se fijan los parámetros con los que se cuantifican todos los RCPs, independientemente del ruido de fondo. Este método es eficaz, pero también puede suponer la pérdida de algunos RCPs.

-*ImageJ*. ImageJ permite contar RCPs con la función *FindMaxima* y escogiendo el umbral adecuado para cuantificar los RCPs. Es un método de cuantificación rápido y eficaz, especialmente en aquellas imágenes bien con un alto número de RCPs o bien un bajo número de RCPs y es posible contabilizarlos con la función *"contaje manual"*.

Los análisis se realizaron cuantificando 5 imágenes, y se mostró que cuando la concentración disminuye un orden de magnitud, el número de RCPs cuantificados también disminuye un orden de magnitud, mostrando que los tres métodos tienen una relación de concentración y número de RCPs detectados similar. La **Tabla 15** recoge los parámetros y resultados de RCPs obtenidos.

Tabla 15. Métodos y parámetros utilizados para cuantificar los RCPs (n = 5) obtenidos mediante 1RCA. El umbral escogido para distinguir la señal inespecífica en cell profiler varía en imágenes BW y ORG. Se muestra la media de los RCPs contabilizados según cada método. Se muestran los RCPs contados de forma manual con Image J.

Parámetros usados							
	Cell profile		filer.	Cell profiler.		Image I	
		Imágene	Imágenes BW		s ORG	intage 5	
		Parámetro	Contaje RCPs	Parámetro	Contaje RCPs	Parámetro	Contaje RCPs
1 - 1 - 1 - 1	Diámetro máximo.	25	6206	25	6250	Tolerancia	0640.8
TUN	Rango diámetro.	1-25	6306	1-25		10	9649.8
	Umbral	0.025		0.01			
	Diámetro máximo	25	784	25	560	Tolerancia	
100 pM	Rango diámetro	1-25		1-25		10	960
	Umbral	0.1		0.01			
	Diámetro máximo	25		25		Tolerancia	
10 pM	Rango diámetro	1-25	76.5	1-25	50.75		68.75
	Umbral	0.3		0.01		55	
		Image	J (contaje i	manual)			
1pM				8.4			
100fM	0.34						
10fM	1.6						
Negativo	0.8						

Se escogió el análisis con Cell profiler (Imágenes BW) y el contaje manual con Image J de imágenes con un reducido número de RCPs para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos, mostrando un coeficiente de variación del conjunto de la media de los RCP contados en un rango de entre 5 % y 20 % (**Tabla 16**).

Tabla 16. Concentración, copias de target, media (n = 5) de RCPs detectados tras 1RCA y desviación estándar. El coeficiente de variación presentó un rango entre el 5 % y 21 %, excepto para 0,1 pM (fuera del límite de detección) y el negativo.

Concentración	Media RCPs	Desviación Coeficiente variación		Signal to noise
	Detectados (n = 5)	estándar (SD)	RCPs detectados	ratio
1000 pM	6306	771,5	12,23 %	3941,25
100 pM	784	152,5	19,45 %	490
10 pM	76.5	15,70	20,52 %	47,8125
1 pM	8.4	0,5477	6,521 %	5,25
0,1 pM	0,8	0,5774	173,2%	-
Negativo	1.6	1,140	71,26%	-

La representación de los datos en la curva de calibración mostró una regresión lineal, por tanto, mostrando la capacidad analítica del método 1RCA (**Figura 103**). El límite de detección experimental (LoD), es decir, la concentración mínima detectada experimentalmente, mostró ser de ~1 pM. El LoD teórico, es decir, tres veces la desviación estándar del control negativo entre la pendiente de la recta, mostró ser 0,55 pM.





Figura 103. Curva de calibración 1RCA para ADN sintético correspondiente a ADNc del ARN del virus del Zika. Cada punto representa la media de RCPs detectadas en una concentración (n = 5) y la desviación estándar. En la gráfica se muestra el LoD (0,55 pM).

Por último, se calculó el número de copias de ssDNA diana que se detectó. Para ello se realizó una estimación teniendo en cuenta el volumen y peso molecular de la sonda. Es posible calcular el número de copias de ssDNA diana detectado, realizando una estimación teniendo en cuenta el volumen y el peso molecular de la sonda. La mezcla de reacción total fue de 60 μ L con una concentración 1 pM, por tanto, se depositaron 6 \cdot 10⁻⁵ pmoles de diana sintética. Considerando la longitud de la sonda (89-mer), ayudándonos de herramientas para calcular el peso molecular de esta sonda, se calculó que en los 60 μ L de mezcla de reacción se corresponden con 1,6512 pg de diana inicial, por tanto, se depositaron 3,72 x 10⁷ copias de ssDNA diana, en tanto, el límite de detección experimental es de 6,2 x 10⁵ copias / μ L o 6,2 x 10⁸ copias / mL.

4.2.5. Curva de calibración C2CA para la diana sintética ADNc de la región codificante de la proteína C del virus del Zika

Una vez comprobada la eficacia de RCA para amplificar las dianas sintéticas correspondientes a ADNc del virus del Zika, la ausencia de interferencia entre DO y CO y que la amplificación presenta una regresión lineal, se procedió a la validación del sistema C2CA. Para ello, se utilizó la diana sintética correspondiente al ADNc de la región codificante de la proteína C del virus del Zika, pero en este caso una secuencia biotinilada. Este sistema mimetiza al ADNc biotinilado que se obtendrá en la siguiente sección realizando la retrotranscripción del ARN viral con primers biotinilados. A continuación, se realiza la primera ronda de RCA, y tras la amplificación, el producto RCP biotinilado es capturando empleando *beads* magnéticas marcadas con estreptavidina, concretamente, *Estreptavidin T1 Dynabeads™ MyOne™ (ThermoFisher Scientific, CA, USA*).

El sobrenadante (que incluye sondas Padlock que no hayan hibridado, la enzima phi29 y dNTPs) es lavado y las *beads* magnéticas son lavadas varias veces para eliminar todos los productos que no hayan reaccionado. A continuación, los RCPs fueron incubados con el oligo de restricción (RO) y la enzima de restricción *Alul*. Esto monomerizó los RCPs en pequeños fragmentos que, tras la adición de ligasa, se ligan y vuelven a circularizarse. En este punto se descartaron las *beads* magnéticas. En los RCPs circularizados, el oligo de restricción actúa como primer iniciando la segunda amplificación C2CA. Los nuevos RCPs obtenidos fueron incubados con los oligos de detección y captura (DO y CO) y visualizados por microscopía de fluorescencia. Todos los detalles del metodológicos se indican en la *sección 6.4.5*. de metodología. Todas las secuencias utilizadas para realizar C2CA se detallan en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Secuencias de la diana sintética biotinilada correspondiente al ADNc correspondiente a la región codificante de la proteína C del virus del Zika, las sondas Padlock (PLPs) utilizadas, así como los oligos de detección (DO), captura (CO) y restricción (RO) para llevar a cabo la validación de C2CA.

Sondas PLPs y dianas sintéticas para validar RCA				
Diana sintética C_Protein	5' – Biotin - TTTCTTGAACTTCTTTATTA TTTCCATAGCCTCTTTTTTCCCCACTGAACCCCATCTATTGATGAGACCCAGTGATGG CTTGATTGCCG 3'			
PLP C_Protein	5' - TAATAAAGAAGTTCAAGAAA GTGTATGC <u>AGCT</u> CCTCAGTAATAGTGTCTTACCTCAGCCGATGCAGTGTAAT AAAGAGGCTATGGAAA 3'			
Oligo captura (CO) 2 (C2CA)	5' – GTAAGACACTATTACTGAGGATTTT – Biotin - 3'			
Oligo detección (DO) 2 (C2CA)	5' – Cy3 – TTTTATTACACTGCATCGGCTGAG – 3'			
Oligo restricción (RO)	5' - <u>AGCT</u> – 3'			

El ensayo se realizó utilizando 100 pM de sonda Padlock, 10 nM de DO y CO y las siguientes concentraciones de diana sintética: 1000 fM, 100 fM, 10 fM, 1 fM, 100 aM, 10 aM. Tras la amplificación mediante C2CA se obtuvieron imágenes que muestran la disminución de los RCPs obtenidos conforme disminuye la concentración de la diana (**Figura 104**).

Diana	C_Protein	1 pM / 100 fM / 10 fM / 1 fM / 100 aM / 10 aM
PLP	C_Protein PLP	100 pM
DO	Oligo detección 2 (C2CA)	10 nM
CO	Oligo captura 2 (C2CA)	10 nM



Figura 104. RCPs obtenidos en la curva de calibración C2CA y analizados mediante microscopía de fluorescencia. La tabla muestra las concentraciones usadas. Se observa una disminución de los RCPs obtenidos conforme disminuye la concentración. El número de RCPs por debajo de 10 aM es indistinguible con respecto al negativo. Microscopio Zeiss Axio Imager Z2. Objetivo 20×.

A continuación, se llevó a cabo el análisis descrito en la *sección 4.2.5*. para cuantificar la media de RCPs obtenidos. De nuevo, los tres métodos mostraron que cuando la concentración disminuye un orden de magnitud, el número de RCPs cuantificados también disminuye un orden de magnitud, mostrando que los tres métodos muestran una relación de concentración y número de RCPs detectados similar. En el caso de 1000 fM, la medición se realizó con Image J, función *Find Maxima Tolerancia 10*, debido a que Cell Profiler fue incapaz de realizar la cuantificación debido al alto número de RCPs. La **Tabla 18** recoge los parámetros y resultados de RCPs obtenidos.

Tabla 18. Métodos y parámetros utilizados para cuantificar los RCPs obtenidos mediante C2CA. El umbral escogido para distinguir en cell profiler la señal inespecífica varía en imágenes BW y ORG. Se muestra la media de los RCPs contabilizados según cada método. Se muestran los RCPs contados de forma manual con Image J.

Parámetros usados							
		Cell profiler.		Cell profiler.		Image J	
		Imágenes BW		Imágenes ORG			
		Parámetro	Contaje RCPs	Parámetro	Contaje RCPs	Parámetro	Contaje RCPs
100 614	Diámetro máximo	25	15026.6	25	15750.0	Tolerancia 20	17277.2
TOO UM	Rango diámetro	2-50	15030.0	1-25	15/50.6		
	Umbral	0.025		0.01			
10.614	Diámetro máximo	25	5151.75	25	847.8	Tolerancia 20	2263
TO LINI	Rango diámetro	2-50		1-25			
	Umbral	0.025		0.01			
1 fN 4	Diámetro máximo	25	216.4	25	150.6	Tolerancia 20.	336.6
TIM	Rango diámetro	2-50	310.4	1-25	150.6		
	Umbral	0.1		0.01			
			Image J (tol	10)			
1000 fM			13	0974.4			
		Imag	ge J (contaje	manual)			
100aM	100aM 70						
10aM	48.2						
Negativo	42.4						

A continuación, se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos obtenidos, mostrando un coeficiente de variación del conjunto de la media de los RCP contados en un rango de entre 5 % y 13 % (Tabla 19).

Comontración	Media RCPs	Desviación	Coeficiente variación	Signal to noise	
Concentracion	Detectados (n = 5)	estándar (SD)	RCPs detectados	ratio	
1000 fM	130974.4	67645	15,77 %	3089,01	
100 fM	15036.6	863,1	5,740 %	354,62	
10 fM	5151,75	1504	29,20 %	121,5	
1 fM	316,4	39.63	12,52 %	7,46	
100 aM	70,00	14.75	21,07 %	1,65	
10 aM	48,20	12.83	26,63 %	1,13	
Negativo	42.4	-	-	-	

Tabla 19. Concentración, copias de target, media (n = 5) de RCPs detectados tras C2CA y desviación estándar. El coeficiente de variación presentó un rango entre el 5 % y 30 %. 0,1 fM (100 aM) mostró ser el punto más bajo detectado.

la representación de los datos en la curva de calibración mostró una regresión lineal (**Figura 105**). Por último, se calculó el LoD experimental, es decir, la concentración más baja que puede ser detectada experimentalmente, calculado en 100 aM. El LoD teórico, es decir, tres veces la desviación estándar del control negativo entre la pendiente de la recta, calculado como 112 aM.

C2CA calibration curve



Figura 105. Curva de calibración C2CA para ADN sintético correspondiente a ADNc del ARN del virus del Zika. Cada punto representa la media de RCPs detectadas en una concentración (n = 5) y la desviación estándar. En la gráfica se muestra el LoD (112 aM).

Por tanto, método C2CA incrementa 4 órdenes de magnitud el límite de detección (de ~1 pM a ~100 aM) con respecto al método 1RCA, detectándose en 100 aM un total de 3,72 x 10^3 copias de target en añadidas a la mezcla de reacción, lo que se traduce en 62 copias / μ L de diana detectada (o 6,2 x 10^3 copias / mL).

4.2.6. Aplicación de C2CA y análisis por microscopía para diagnóstico molecular del virus del Zika y evaluación de la eficacia de fármacos antiflavivirales

A continuación, se procedió a evaluar la eficacia de C2CA para diagnosticar y detectar el virus del Zika y monitorizar la eficacia de dos fármacos antiflavivirales mediante este método. Concretamente se probó el antiviral TH5487, un antiviral de amplio espectro [227] y el antiviral Ribavirina, un nucleósido sintético utilizado como fármaco antiviral frente al virus respiratorio sincitial (RSV, del inglés *"Respiratory Syncitial Virus"*) y, en combinación con interferón alfa, frente al virus de la hepatitis C (VHC), además de frente a otros virus que causan fiebres hemorrágicas [228].

Para ello, se colaboró con el grupo del *laboratorio de Helleday del Karolinska Institutet*, que realizó los ensayos de infección de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *"Peripheral Blood Mononuclear Cell"*) de donadores sanos del *Karolinska University Hospital (Suecia)*. Brevemente, las PMBC fueron aisladas de donadores sanos y separadas en dos grupos: PBMC no infectadas y cultivadas en su medio usual y PBMC incubadas en medio con virus del Zika con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 durante una hora. En este segundo grupo, a continuación, se sustituyó el medio conteniendo bien DMSO (como control), bien TH5487 (10 μ M) o bien Ribavirina (100 μ M). Tras 8, 24 o 48 horas de infección, las células fueron colectadas, lisadas y se extrajo el ARN. Este ARN fue retrotranscrito para analizar la presencia del virus del Zika mediante RT-qPCR o C2CA.

Para evaluar la eficacia de C2CA en detectar el virus y la eficacia de la Ribavirina, el ARN extraído fue retrotranscrito utilizando *random primers* de 10-mer de longitud biotinilados, obteniendo un ADNc del virus biotinilado. A continuación, se llevó a cabo el ensayo C2CA. Para aumentar el LoD, se realizó C2CA utilizando 12 sondas Padlock diseñadas para hibridar a lo largo de todo el ADNc del ARN viral del virus del Zika. El uso de 12 sondas permitirá aumentar el límite de detección de C2CA. Concretamente, estas sondas hibridan con el ADNc de las secuencias que codifican la proteína C, la proteína PrM, la proteína E y frente a regiones de proteínas no estructurales (proteínas NS) (**Tabla 20**). La **Figura 106** muestra una representación esquemática de las regiones del ADNc viral a las que se unen las sondas. Las regiones frente a las que hibridan

estas sondas Padlock son comunes a la cepa de la Polinesia Francesa, (H/PF2013), la cepa africana (AY632535) y la cepa americana (KU312312). Además, se comprobó que las sondas no hibridan con el ARN viral del virus del Dengue para evitar hibridación cruzada.

Tabla 20. Set de sondas PLPs utilizadas para detectar ADNc del virus del Zika. Las sondas hibridan a lo largo de todo el ADNc del virus del Zika. Al igual que en las Tablas 14 y 17, las secuencias marcadas en rojo y verde se corresponden a las secuencias que hibridan con el ADNc del virus del Zika, las secuencias marcadas en azul y naranja son detectadas por el DO y CO respectivamente, y la secuencia subrayada es reconocida por el RO, generando un sitio de restricción de Alul.

Sondas PLP usadas para la detección del virus del Zika				
C_Protein	5'TAATAAAGAAGTTCAAGAAAGTGTATGC <u>AGCT</u> CCTCAGTAATAGTGTCTTAC CTCAGCCGATGCAGTGTAT AAAGAGGCTATGGAAA 3'			
Pr_M1	5'CATATCTTTTCCAACCAGTGTATGC <u>AGCT</u> CCTCAGTAATAGTGTCTTAC CTCAGCCGATGCAGTGTAATCGATGCTGGGGAGGC 3'			
Pr_M2	5'CTTGGTCATGATACTGGTGTATGC <u>AGCT</u> CCTCAGTAATAGTGTCTTAC CTCAGCCGATGCAGTGTAATGAGCCAAAAAGTCATATA 3'			
E_1	5'CAATATGTCTGCAAAAGGTGTATGC <u>AGCT</u> CCTCAGTAATAGTGTCTTAC CTCAGCCGATGCAGTGTAATAAGCAATCAGACACT 3'			
E2	5'CATTGGAACGTTGCTGTGTGTGTGTGTCTCAGCAGCTCCTCAGTAATAGTGTCTTAC CTCAGCCGATGCAGTGTAATGGTTCTCACAAATTCT 3'			
NS1	5'TAAAAAACCCCATGTGGTGTATGC <u>AGCTCCTCAGTAATAGTGTCTTAC</u> CTCAGCCGATGCAGTGTAATTCGTTGTGGGATCTG 3'			
NS2A	5'ACTGGAGGAGATGTAGGTGTATGC <u>AGCT</u> CCTCAGTAATAGTGTCTTAC CTCAGCCGATGCAGTGTAATTTCGCGGAAATGAAC 3'			
NS2B	5'GGTGACATCACATGGGTGTATGC <u>AGCTCCTCAGTAATAGTGTCTTAC</u> CTCAGCCGATGCAGTGTAATGTACATTGAAAGAGCA 3'			
N3	5'TCAGGCTTTGATTGGGTGTATGC <u>AGCT</u> CCTCAGTAATAGTGTCTTAC CTCAGCCGATGCAGTGTAATGAGAGAGCCTGGAGC 3'			
NS4A	5'AGAGATTCCAGGAAGGTGTATGC <u>AGCT</u> CCTCAGTAATAGTGTCTTAC CTCAGCCGATGCAGTGTAATCAGGACACATGACAG 3'			
NS4B	5'TGTTGTTTGGTATGGGGTGTATGC <u>AGCT</u> CCTCAGTAATAGTGTCTTAC CTCAGCCGATGCAGTGTAATCCACGCAAGCTGGAG 3'			
NS5	5'TCTAGTCCTGAAGTGGGTGTATGC <u>AGCT</u> CCTCAGTAATAGTGTCTTAC CTCAGCCGATGCAGTGTAATCATAGGTGAGTCATCA 3'			



Figura 106. Representación esquemática de las regiones que conforman el genoma del virus del Zika y del set de 12 sondas Padlock utilizadas para su detección mediante C2CA.

Capítulo 4. Resultados

La retrotranscripción puede ser un importante paso limitante en la detección del virus, especialmente cuando el ARN viral se encuentra en una baja concentración. Para abordar esta limitación, los ensayos fueron realizados utilizando distintos kits comerciales de retrotranscripción: *Transcript Me (BLIRT, Poland), Superscript III (ThermoFisher Scientific, CA, USA)* y *Superscript IV (ThermoFisher Scientific, CA, USA)*. Los tres kits comerciales utilizan la enzima reverso-transcriptasa procedente del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV). El kit TranscriptMe utiliza una enzima recombinante que permite sintetizar cadenas largas de ADNc. Las enzimas de los kits *Superscript III y Superscript IV* presentan mutaciones que mejoran la eficacia de la retrotranscripción, reducen la actividad ARNasa de la enzima, presentan mayor resistencia a inhibidores y permiten la síntesis de cadenas largas de ADNc, siendo la enzima del kit *Superscript IV* la más eficaz. Por tanto, en los ensayos detallados a continuación se llevó a cabo una evaluación comparativa de la eficacia de los antivirales TH5487 y Ribavirina, de los tres kits comerciales de retrotranscripción y de los métodos RT-qPCR y C2CA para detectar el virus del Zika y monitorizar la eficacia de las drogas antiflavivirales.

A) Análisis comparativo utilizando el kit TranscriptMe y el antiviral TH5487. En este primer análisis, las PBMC de un donador sano voluntario fueron cultivadas e infectadas con virus del Zika a un MOI de 10. A continuación, se trataron con TH5487 (10 μ M) para evaluar la eficacia de este antiviral durante un tratamiento de 8 horas, 24 horas y 48 horas, empleando DMSO con control negativo. Tras el tratamiento, las células fueron lisadas, el ARN extraído y retrotranscrito para posteriormente ser analizado por RT-qPCR y establecer la carga viral, es decir, el número de partículas por mL (**Tabla 21**). Los resultados por RT-qPCR mostraron que la carga del virus era mayor en PBMC tratadas con el antiviral TH5487 que en aquellas tratadas con DMSO, lo cual no es indicativo de que esta droga sea un eficaz antiviral para el virus del Zika (**Tabla 21**).

A continuación, este mismo ARN fue retrotranscrito usando el kit *TranscriptMe* con *random primers* de 10-mer de longitud biotinilados y el ADNc biotinilado obtenido fue amplificado mediante C2CA. Debido al resultado obtenido por RT-qPCR, sólo se compararon los resultados obtenidos en las PMBC tratadas con DMSO (**Tabla 21**, fila resaltada en azul). Los resultados obtenidos por C2CA no mostraron relación con los resultados obtenidos por RT-qPCR (**Figura 107**) debido a que por RT-qPCR se detectaron 9791 partículas virales por mL.

Estos resultados podrían explicarse debido a una acción deficiente del antiviral TH5487. La correlación inexistente entre los resultados de RT-qPCR y C2CA puede deberse a una baja concentración de ARN viral y, por tanto, a una deficiente retrotranscripción con el kit *TranscriptMe*. Ambos resultados fueron analizados mediante una correlación, mostrando un

Coeficiente de Pearson de r = 0,7298 y p = 0,7298, por tanto, no significativo (α = 0,05), por tanto, no guardando relación.

Tabla 21. Carga viral detectada por RT-qPCR del set de muestras 1. La carga viral mostró ser mayor tras 24 horas y 48 horas de infección viral y tratamiento con 10 μ M de inhibidor viral TH5487, por tanto, la infección y el tratamiento antiviral no fueron eficaces. La fila resaltada en azul se analizó mediante C2CA.

Primer set de muestras Infectadas por el virus del Zika	Carga viral (número de partículas por mL)			
Set de muestras:	8h	24h	48h	
No infectada y tratada con DMSO.	No amplificada.	No amplificada.	No amplificada.	
Infectada con el virus del Zika, cepa polinesia francesa a un MOI de 10 y tratada con DMSO.	9791	194	225	
Infectada con el virus del Zika, cepa polinesia francesa a un MOI de 10 y tratada con 10 μM de TH5487.	3101	846	419	



Figura 107. Resultados obtenidos de la evaluación comparativa de retrotranscripción con el kit TranscriptMe y amplificación por RT-qPCR y C2CA. Los datos de RT-qPCR fueron cedidos. La carga viral detectada por RT-qPCR y por C2CA no guardaron relación.

B) Análisis comparativo utilizando el kit Superscript III y los antivirales TH5487 y Ribavirina. En el segundo set de muestras analizado, las células PMBC de tres donadores sanos diferentes (n = 3) fueron infectadas con virus del Zika y tratadas durante 8 horas con antiviral TH5487 (10 μ M) y Ribavirina (100 μ M) usando tratamiento con DMSO como control negativo. Fueron tratadas durante 8 horas y a continuación el ARN fue extraído, retrotranscrito y analizado por RT-qPCR para establecer el número de partículas virales (**Tabla 22**). A continuación, se llevó a cabo un ensayo C2CA utilizando el kit de retrotranscripción *Superscript III*.

Tabla 22. Carga viral detectada por RT-qPCR. De nuevo, la carga viral de las PMBC infectadas y tratadas con TH5487 no mostró ser menor (en los casos de los donadores 1 y 3) que las PMBC tratadas con DMSO por control. Sin embargo, la Ribavirina si mostró reducir la carga viral en los tres casos.

Segundo set de muestras PBMC infectadas con el virus del Zika					
Donador	Infección	Tratamiento	Tiempo de incubación	Muestra	Carga viral: partículas / mL
Donador 1	ZIKV	DMSO	8h	ARN	3446
	ZIKV	TH5487 10 uM	8h	ARN	5008
	ZIKV	Ribavirina 100 uM	8h	ARN	1627
	No infectado	DMSO	8h	ARN	-
Donador 2	ZIKV	DMSO	8h	ARN	5601
	ZIKV	TH5487 10 uM	8h	ARN	3833
	ZIKV	Ribavirina 100 uM	8h	ARN	1839
	No infectado	DMSO	8h	ARN	-
Donador 3	ZIKV	DMSO	8h	ARN	5740
	ZIKV	TH5487 10 uM	8h	ARN	5450
	ZIKV	Ribavirina 100 uM	8h	ARN	3907
	No infectado	DMSO	8h	ARN	-

En este set de muestras, la Ribavirina mostró reducir la carga viral comparada con las PBMC tratadas con DMSO y el antiviral TH5487 (**Tabla 22**). Sin embargo, al realizar el análisis mediante C2CA, el número de RCPs tampoco guardó relación alguna con el análisis por RT-qPCR (**Figura 108**).





Este resultado fue analizado mediante una correlación, calculando el coeficiente de Pearson. El coeficiente de Pearson fue negativo (r = -0,2787) y no significativo (p = 0,4677, α = 0,05), por tanto, mostrando que los análisis mediante PCR y C2CA no guardan relación (**Figura 109**).



C2CA - PCR correlation (SSIII)

Figura 109. Análisis de correlación entre los resultados obtenidos en el set de muestras 2 mediante PCR y C2CA usando SSIII. El coeficiente de Pearson negativo (r = 0.2787) mostró que ambos resultados no se correlacionan.

Estos resultados podrían ser explicados debido a que la concentración de ARN viral sea baja y el kit *Superscript III* no sea suficientemente eficaz para producir ADNc que pueda ser posteriormente detectado mediante C2CA. Para ello, se probó un tercer kit, *Superscript IV*.

C) Análisis comparativo utilizando el kit Superscript IV para retrotranscripción. El mismo set de muestras anterior fue analizado utilizando el kit comercial *Superscript IV*. Utilizando este kit, el resultado obtenido de análisis por C2CA y microscopía mostró una buena correlación con los resultados obtenidos por RT-qPCR. Además, en ambos casos la Ribavirina mostró una carga viral inferior en los tres donadores (**Figura 110**).



Figura 110. Evaluación comparativa de resultados obtenidos mediante RT-qPCR y C2CA realizando retrotranscripción mediante SSIIV. A) Resultados obtenidos mediante RT-qPCR. B) Resultados obtenidos mediante C2CA. En este caso los resultados mediante C2CA mostraron ser similares a los obtenidos mediante RT-qPCR.

Este resultado fue analizado mediante una correlación, calculando el coeficiente de Pearson. El coeficiente de Pearson fue positivo (r = 0,8144) y significativo (p = 0,0075, α = 0,05), por tanto, mostrando que ambos análisis correlacionan positivamente y significativamente (**Figura 111**). Las imágenes obtenidas para realizar la cuantificación se muestran en la **Figura 112**.





Figura 111. Análisis de correlación entre los resultados obtenidos en el set de muestras 2 mediante PCR y C2CA usando SSIII. El coeficiente de Pearson positivo (r = 0.8144) y significativo (p = 0,0075, $\alpha = 0,05$), por tanto, mostrando que ambos análisis correlacionan positivamente.



Figura 112. RCPs obtenidos en la curva de calibración C2CA y analizados mediante microscopía de fluorescencia. Se observa una disminución de los RCPs obtenidos en las muestras tratadas con Ribavirina. Las muestras tratadas con TH5587 no mostraron una disminución eficaz. Microscopio Zeiss Axio Imager Z2. Objetivo 20×.

Por tanto, el análisis mediante C2CA utilizando *Superscript IV* mostró que las PBMC infectadas con virus del Zika y tratadas con Ribavirina presentan una carga viral menor que las PBMC tratadas con DMSO y tratadas con TH5487. Por tanto, *Superscript IV*, C2CA y el tratamiento con Ribavirina de PBMC infectadas con virus del Zika fueron los parámetros escogidos para continuar una serie de experimentos que se continuaron en el laboratorio, sin formar parte de este capítulo, para acoplar la detección del virus del Zika mediante C2CA en un dispositivo de microfluídica para mejorar la señal detectada y monitorizar la eficacia de fármacos antiflavivirales.

4.2.7. Breve reseña: Aplicación de C2CA y análisis por microfluídica para el diagnóstico molecular de la fiebre del Zika y la evaluación de fármacos antiflavivirales

Los resultados obtenidos en este capítulo fueron utilizados en una fase final del proyecto para combinar C2CA con un análisis mediante microfluídica para la detección del virus del Zika. La aplicación de C2CA en microfluídica fue llevada a cabo por Ruben R.G. Soares, del grupo de Diagnóstico Molecular de SciLife, Estocolmo, Suecia. Este sistema consiste en una plataforma de cromatografía de afinidad enriquecida por microfluídica (µACE, del inglés "*microfluidic affinity chromatography enrichment*") formada por una cámara que contiene *beads* de agarosa marcadas con estreptavidina, un canal de entrada y un canal de salida. En la plataforma C2CA-µACE, a través de los canales circula un flujo que contiene los RCPs. Estos RCPs, marcados con el oligo DO con Cy3, pero también con el oligo CO con biotina, son atrapados por las *beads* de agarosa, mientras que el resto de la solución, con todo el resto de oligos DO marcados con Cy3 y cualquier señal inespecífica adicional, son eliminados por el canal de salida. (**Figura 113**).



Figura 113. Esquema de adaptación del método C2CA al sistema de microfluídica μACE (C2CA-μACE) para la cuantificación (media o discreta) de los RCPs capturados en beads de agarosa marcadas con estreptavidina. Adaptado de Ruben R.G. Soares et al (2021). Reproducido de la referencia [229].

Este sistema ha mostrado, en estudios previos, aumentar la sensibilidad hasta en 2 órdenes de magnitud la detección de RCPs procedentes de amplificaciones de RCA [230]. Una vez atrapados los RCPs por las *beads* de agarosa marcadas con estreptavidina, se toma una imagen de la señal fluorescente, que bien puede ser una media de toda la señal obtenida, o bien una señal discreta de cada RCP mediante el microscopio de fluorescencia Nikon Ti-Eclipse (objetivo 40×), equipado con una luz SOLASE y una cubeta de filtro TRITC.

La plataforma C2CA- μ ACE mostró ser eficaz para detectar el virus del Zika, detectando menos de 1.7 × 10³ copias / mL del ARN viral del Zika, y, además, y mostró que la Ribavirina reduce en un orden de magnitud número de partículas virales detectadas en PMBC tratadas con DMSO frente a las partículas virales detectadas en PMBC tratadas con Ribavirina (**Figura 114**) [229].



Figura 114. Análisis de detección del virus del Zika mediante la plataforma C2CA-µACE. A) Cuantificación de títulos de ARN viral del Zika en concentraciones mediante C2CA-µACE crecientes en sobrenadantes de PBMC infectadas in vitro y cuantificados por RT-qPCR (señal fluorescente media y señal discreta). B) Imágenes representativas de los datos obtenidos en µACE mediante fluorescencia. Barra escala 100 µm. C) Medición de los títulos de ARN del Zika en PBMC cultivadas de 3 donadores sanos, infectados in vitro y tratados con Ribavirina, mostrando una reducción del título viral en aquellas muestras tratadas con Ribavirina. Reproducido de la referencia [229].

En conjunto, la plataforma C2CA-µACE constituye una herramienta para la detección del virus del Zika con algunas ventajas como son el diseño de sondas de forma simple y versátil, la

facilidad de llevar a cabo *multiplexing* a través de sondas funcionalizadas y *barcoding*, amplificación isotermal a 37 °C, fácilmente aplicable a sistemas portátiles. El rango de detección de la plataforma es de 10³ y 10⁵ copias de ARN viral / mL. Todas estas características son demandadas en un momento actual, en el que al estar afectados por la pandemia es necesario diagnosticar y monitorizar con eficacia el virus, así como monitorizar el efecto de terapias.

4.2.8. Exploración de un método de RCA cuantitativo en tiempo real (RT-qRCA)

Paralelamente a este trabajo desarrollado en muestras del virus del Zika, se desarrolló un método de RCA cuantitativo utilizando un oligonucleótido sintético del virus NDV (del inglés *"Newcastle Disease Virus"*), causante de gripe aviar principalmente en animales domésticos [231]. En primer lugar, se utilizaron sondas Padlock para realizar RCA y C2CA y comprobar que la amplificación tuvo lugar con éxito empleando esta diana sintética (**Figura 115A**). Una vez chequeado, se procedió a realizar RCA en tiempo real utilizando *SYBR gold* como intercalante de ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN de cadena sencilla y doble. De este modo, conforme se produce la amplificación del producto RCP, se incorpora marcador fluorescente (**Figura 115B**).





El método mostró monitorizar la amplificación de la señal en tiempo real, lo cual abre la posibilidad a realizar análisis RCA cuantitativos. Sin embargo, la señal en tiempo real solo se

monitorizó cuando se utilizó una concentración de partida de oligonucleótido sintético de 10 nM, lo que indica que la sensibilidad del método es baja y requiere una optimización.

4.2.9. Aplicación de RCA en superficie

Adicionalmente, se analizó el funcionamiento de RCA en superficie, para lo que se utilizó el sistema del virus NDV. Para ello, el oligonucleótido sintético diana correspondiente a ADNc del ARN viral de NDV estaba marcado con biotina. Este fue incubado en una superficie con neovidina, molécula de unión a biotina, por lo que el oligonucleótido sintético se unió a la superficie (**Figura 116A**). Tras realizar varios lavados, a continuación, se incubaron las sondas Padlock y se llevó a cabo una amplificación mediante RCA. El resultado mostró que la amplificación puede tener lugar atrapando el oligonucleótido sintético en superficie (**Figura 116B**), mostrando una señal ligeramente superior a RCA en solución (**Figura 116C**). Esto podría abrir la posibilidad a realizar futuras amplificaciones en sistemas que requieran inmovilizar la diana en superficie.



Figura 116. Resultados obtenidos realizando RCA en superficie. A) Esquema representativo de la amplificación RCA en superficie. Un portaobjetos marcado con neovidina es incubado con la diana biotinilada, que posteriormente es reconocida por las sondas Padlock y amplificada por RCA. B y C) La amplificación RCA mostró un alto número de RCPs y una señal ligeramente superior a los RCPs amplificados en solución. Microscopio Zeiss Axio Imager Z2. Objetivo 20×.

4.3. Discusión

En este capítulo se ha explorado la eficacia de protocolos 1RCA y C2CA para la detección de secuencias sintéticas del virus del Zika, correspondientes a ADNc del ARN viral del virus del Zika, la eficacia en la detección del virus del Zika en PBMC infectadas, así como la eficacia de fármacos antiflavivirales. Para ello se han utilizado sondas Padlock funcionales y oligos de detección y captura de estas sondas, marcados con Cy3 y biotina respectivamente. Los productos amplificados obtenidos tras 1RCA y C2CA han sido analizados por microscopía de fluorescencia y cuantificados.

Se han establecido curvas de calibración para ambos métodos 1RCA y C2CA, detectando la secuencia sintética correspondiente a ADNc de la región codificante del ARN viral de la proteína C. Estas curvas de calibración mostraron una regresión lineal con un coeficiente de variación entre 5 % y 21 % en caso de 1RCA y 5 % y 30 % en caso de C2CA, con LoD experimentales de ~1 pM y ~100 aM, respectivamente, correspondiéndose a 6,2 x 10^5 copias / μ L y 6,2 copias / μ L sintéticas detectadas respectivamente. En segundo lugar, se validó la capacidad de este sistema de diagnosticar y detectar ADNc procedente del ARN viral en PBMC de donadores sanos e infectadas con la cepa Polinesia Francesa del Virus Zika a un MOI de 10. Para ello se ha utilizado un set de 12 sondas PLPs que hibridan a lo largo del ADNc del genoma viral. Se realizó una evaluación comparativa del efecto de dos fármacos antivirales, TH5487 y Ribavirina. Además, se analizó la carga viral mediante RT-qPCR y se comparó con el método C2CA y microscopía de fluorescencia. Se probaron tres kits comerciales de retrotranscripción para probar la capacidad de detección del virus mediante C2CA. Los resultados mostraron que la combinación del kit Superscript IV, junto con el tratamiento Ribavirina permitió concluir la detección del virus del Zika así como detectar una disminución de la carga viral en aquellas PBMCs infectadas y tratadas con Ribavirina, tanto por RT-qPCR como por C2CA obteniendo datos similares. C2CA mostró por tanto ser un método de amplificación isotermal eficiente para detectar la carga viral de PMBC infectadas por virus del Zika y monitorizar el efecto del tratamiento con Ribavirina.

La ventaja del método C2CA permite utilizar combinaciones de sondas PLPs de forma versátil y abriendo la posibilidad de realizar *multiplexing* y estrategias *barcoding* con otro tipo de sondas. C2CA permite detectar la diana en una reacción de punto final de forma fluorométrica y sensible mediante una reacción isotermal de 37 °C, permitiendo además monitorizar la eficacia de fármacos anti-flavivirales. Todo este protocolo puede ser realizado en un total de 5 horas, por tanto, adaptable a laboratorios clínicos, lo que supone una herramienta de diagnóstico molecular eficiente.



Conclusiones | Conclusions
Capítulo 5. Conclusiones

1. Se ha desarrollado y validado un método rápido para la detección de secuencias sintéticas de KRAS y miR-122 con resolución de una base mediante la combinación de nanopartículas de poliestireno bifuncionalizadas y marcaje por química dinámica, donde la hibridación de sondas DGL tiene lugar en fase solución y el análisis mediante citometría de flujo.

2. Se han analizado variaciones de nucleótido en secuencias sintéticas correspondientes a mutaciones puntuales en el codón 12 de KRAS, concretamente discriminando secuencias de tipo salvaje de KRAS y secuencias mutadas KRAS G12C.

3. Se ha detectado secuencias de KRAS con resolución de una base en plasma humano, estableciendo una curva de calibración que muestra una regresión lineal, con un límite de detección (LoD) de 2.5 pmoles, correspondiente a la detección de 1,5055E + 12 moléculas de diana.

4. Se ha combinado el marcaje por química dinámica y FISH para detectar la secuencia α -satélite humana con resolución de una base en diferentes líneas tumorales humanas, abriendo la posibilidad de analizar polimorfismos en secuencias repetidas difíciles de secuenciar.

5. Se han realizado ensayos de sensibilidad y especificidad de las cuatro SMART-Nucleobases biotiniladas mediante química dinámica y FISH, mostrando la incorporación de SMART-C-Biotina, por tanto, detectándose específicamente guanina.

6. Se ha desarrollado un método para el análisis cuantitativo de las señales obtenidas de la detección de la secuencia α -satélite y se ha comparado con la señal obtenida de la resolución de una base, mostrando una relación de detección entre ambas señales del 80 %. Así mismo, se ha realizado un análisis en el que se ha comprobado que la media de señales de núcleos metafásicos se corresponde con el número modal cromosómico del cariotipo correspondiente.

7. En base a la estrategia desarrollada combinando marcaje por química dinámica y FISH, se ha establecido un planteamiento como futura aplicación de este método para realizar secuenciación por química dinámica *in situ*, lo que podría suponer un método eficaz de secuenciación *in situ* aprovechando las características de especificidad de las sondas PNA.

8. Se han llevado a cabo diferentes estrategias de detección de mutaciones puntuales *in situ* en ARN mensajero de KRAS en líneas celulares tumorales aplicando sondas PNA y DGL y combinando protocolos de RNA-FISH y PNA-FISH. Sin embargo, debido al límite de detección y a la señal inespecífica generada por el sistema biotina-estreptavidina, estas estrategias han sido ineficaces para detectar dichas mutaciones puntuales. Se han discutido posibles líneas de actuación futuras para completar este objetivo.

9. Se ha validado la eficacia de protocolos 1RCA y C2CA para la detección de secuencias sintéticas del virus del Zika, correspondientes a regiones codificantes del ARN del virus del Zika. Se han establecido curvas de calibración para ambos métodos 1RCA y C2CA mostrando la correspondiente regresión lineal y capacidad analítica y se ha calculado el Límite de Detección experimental (LoD) de ambas técnicas, siendo estas 1 pM y 100 aM respectivamente.

10. Se ha utilizado el método C2CA y el uso de un set de 12 sondas PLPs mediante microscopía para detectar el virus del Zika en PBMC infectadas. Los resultados son comparables a aquellos obtenidos por RT-qPCR. Se ha realizado un ensayo preliminar mediante C2CA para evaluar la eficacia de dos fármacos antiflavivirales, mostrando que a través de C2CA se puede detectar el virus del Zika y que la Ribavirina reduce la carga viral en PBCM infectados.

11. En esta tesis doctoral se han aplicado técnicas y métodos de detección de ácidos nucleicos alternativos al *gold-standard* de análisis de ácidos nucleicos, la RT-qPCR, con el objeto de aportar nuevos enfoques y mejoras en la detección de ácidos nucleicos y con el objetivo final de contribuir al diagnóstico molecular.

Chapter 5. Conclusions

1. A rapid method for the detection with single-base resolution of KRAS and miR-122 synthetic sequences have been developed by combining bifunctionalized polystyrene nanoparticles and dynamic chemistry labelling using solution-phase hybridization DGL probes, and analysis by flow cytometry.

2. Nucleotide variations in synthetic sequences corresponding to point mutations in codon 12 of KRAS have been analyzed, specifically discriminating between wild-type KRAS sequences and mutated KRAS G12C sequences.

3. KRAS sequences has been detected with single base-resolution in human plasma, establishing a linear regression calibration curve with a limit of detection (LoD) of 2.5 pmol, corresponding to the detection of 1.5055E + 12 target molecules.

4. Dynamic chemistry labelling and FISH have been combined to detect the human α -satellite sequence with single-base resolution in different tumor cell lines, thus opening the possibility of using this method to analyze polymorphisms in repeated sequences, which are difficult to sequence.

5. Sensitivity and specificity tests have been carried out for the incorporation of the four biotinylated SMART-Nucleobases using dynamic chemistry and FISH, showing a specific incorporation of SMART-C-Biotin detecting guanine.

6. The signals obtained from the DGL probes have been quantified and compared with the signal obtained from the nucleotide detection, showing a detection efficiency of 80%. Likewise, it has been compared with the expected signals of the chromosomal modal number of the karyotype corresponding to each tumor cell line analyzed.

7. Based on the strategy developed combining dynamic chemistry labelling and FISH, an approach has been established as a future application of this method to perform *in situ* dynamic chemistry sequencing, which could be an efficient sequencing method, taking advantage of the specificity characteristics of PNA probes.

8. Different strategies for *in situ* point mutation detection of KRAS messenger RNA have been analyzed in tumor cell lines applying PNA and DGL probes, and combining RNA-FISH and PNA-FISH protocols. However, due to the detection limit and nonspecific signals from the biotinstreptavidin system, these strategies have been ineffective in detecting point mutations. Possible future lines of action have been discussed to complete this objective.

9. The efficacy of 1RCA and C2CA protocols for the detection of synthetic Zika virus sequences, corresponding to coding regions of Zika virus RNA, has been validated. Calibration curves have been established for both 1RCA and C2CA methods, showing a lineal regression and analytical capability, and the experimental Limit of Detection (LoD) of both techniques have been calculated, these being 1 pM and 100 aM, respectively.

10. The C2CA method and the use of a set of 12 PLPs probes by microscopy have been used to detect the Zika virus in infected PBMC. The results are comparable to those obtained by RTqPCR. A trial using C2CA has been carried out to evaluate the efficacy of two antiflaviviral drugs, showing that the Zika virus can be detected through C2CA and that Ribavirin reduces the viral load in infected PBCM.

11. This doctoral thesis applies techniques and methods for the detection of nucleic acids alternative to the *gold-standard* for nucleic acid analysis, RT-qPCR, in order to provide new approaches and improvements in the detection of nucleic acids, with the ultimate goal of contributing to molecular diagnostics.



Metodología

Capítulo 6. Metodología

6.1. Metodología Marcaje por química dinámica

6.1.1. Marcaje por química dinámica (DCL). Información general

Los monómeros de PNA neutrales protegidos por grupos Fmoc / Bhoc / tBu, los monómeros de PNA quirales con carga neutra protegidos con grupos Fmoc / Bhoc y los monómeros abásicos con carga neutra y negativa fueron sintetizados y proporcionados por DESTINA Genomica S.L. (Figura 117, Figura 118, Figura 119). La posición abásica neutral es marcada como *_* mientras que la posición abásica negativa es marcada como *GL*. Todas las SMART-Nucleobases fueron proporcionadas por DESTINA Genomica S.L. Los extremos N-terminal de las sondas PNA y DGL fueron modificados añadiéndole un conector mini-PEG (nombrado como "xx") y un grupo nucleófilo -NH₂ o -SH o bien un marcador como fluoróforos o biotina. Todos los monómeros se encuentran protegidos por un grupo N-Fmoc para permitir la síntesis en fase sólida. Cuando es necesario llevar a cabo más reacciones, se utiliza otro grupo protector como el grupo Bhoc, que protege el –NH2 de adenina, citosina y guanina [73].



Figura 117. Estructura química de monómeros de PNA neutrales utilizados para la síntesis de sondas DGL.





Cglu= Cytosine gamma-modified PNA-COOH



Aglu= Adenine gamma-modified PNA-COOH

Gglu= Guanine gamma-modified PNA-COOH



Tglu= Thymine gamma-modified PNA-COOH

Figura 118. Estructura química de los monómeros de PNA quirales y cargados negativamente utilizados para la síntesis de las sondas DGL.



"_"= Neutral abasic PNA monomer



GL= Chiral and negatively charged abasic PNA monomer

Figura 119. Estructura química de los dos tipos de monómeros de PNA abásicos utilizados para introducir la posición abásica. El monómero quiral y cargado negativamente también lleva un grupo de ácido propiónico (protegido por tBu) en la posición γ.

Las sondas PNA y DGL fueron sintetizadas y proporcionadas por DESTINA Genomica S.L. La síntesis llevada a cabo se basa en técnicas estándar de síntesis en fase sólida (SPPS) sobre soportes poliméricos (resina Tentagel (Polymer, Reino unido)) utilizando un sintetizador Intavis

Bioanalytical MultiPrep CF (Intavis AG GmH, Alemania). La síntesis se realizó mediante rondas repetidas de acoplamiento de monómeros de PNA activados (con el grupo amino protegido) seguidos de desprotección del grupo amino-terminal con pasos de lavado después de cada etapa. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente en columnas de microescala con filtro de PTFE (Intavis, Alemania). La **Figura 120** muestra un esquema general de los pasos implicados en la síntesis de la sonda DGL.



Figura 120. Esquema de síntesis de sondas DGL por síntesis en fase sólida (SPPS). Las sondas DGL se sintetizan de extremo C-terminal a extremo N-terminal. En primer lugar, el monómero de PNA se acopla a la resina y luego se desprotege el grupo Fmoc, acoplándose los siguientes monómeros según la secuencia de la sonda. El monómero de PNA abásico se introduce en la síntesis. El acoplamiento final es la introducción de cualquier marcador a la sonda DGL, como un enlazador de amino-mini-PEG, un fluoróforo, una biotina o un grupo acetato. Una vez que se sintetiza la sonda DGL, se escinde de la resina utilizando una mezcla ácida, principalmente ácido trifluoroacético, que no solo separa la sonda de la resina, sino que también elimina los grupos protectores lábiles al ácido de los monómeros como Boc, Bhoc, tBu [73].

Tabla 23. Sondas PNA y sondas DGL utilizadas en este trabajo. La secuencia de las sondas se representa de extremo N-terminal a extremo C-terminal. "xx" representa un mini-PEG. "HAC" representa un grupo acetato bloqueando el extremo N-terminal. "Cys" representa una cisteína. *_* representa una posición abásica neutral. *GL* representa una posición abásica quiral con un grupo de ácido propanoico que confiere carga negativa. Cglu/Aglu/Tglu/Gglu representa monómeros PNA quirales con un grupo propanoico en posición gamma que confiere carga negativa.

Sonda PNA / Sonda DGL	Secuencia N → C	Modificación extremo N-terminal
PNA-miR-122-Biotin	CACCATTGTCACACTCCA	Biotin – xx
DGL-miR-122	CACCATTgluGT*_*ACgluACTgluCCA	HAc—Cys-xx
PNA-KRAS-wt-Biotin	CTACGCCACCAGCTCCAA	Biotin—xx
PNA-KRAS-wt-Cy5	CTACGCCACCAGCTCCAA	Cy5—xx
DGL-K12RC	CTACGCCAgluC*_*AGgluCTCCAA	HAc –Cys-xx
PNA-α-sat-Cy3.	AAACTAGACAGAAGCATT-Cy3.	HAc-xx
PNA-α-sat-Biotina.	AAACTAGACAGAAGCATT	Biotin—xx
PNA-α-sat quiral	AAACTgluAGACgluAGAAGCgluATTglu	Biotin—xx
PNA-telómero	СССТААСССТААСССТАА	Су5—хх
PNA-telómero quiral	CgluCCTgluAACgluCCTgluAACgluCCTgluAA	Biotin—xx
DGL-α-sat.	AAACTAGA*_*AGAAGCATT	НАс—хх
DGL-α-sat-Cy3.	AAACTAGA*_*AGAAGCATT	Су3—хх
PNA-KRAS-Cy3#1.	TACCACAAGTTTATATTC	Су3—хх
PNA-KRAS-Cy3#2.	TCATTTTCAGCAGGCCTC	Су3—хх
PNA-KRAS-Biotin #2	CTACGCCACCAGCTCCAA	Biotin—xx
PNA-KRAS-Biotin #3	ACCAGCTCCAACTACCACAAGT	Biotin—xx
PNA-KRAS-Cy3 #3	ACCAGCTCCAACTACCACAAGT	Сү3—хх-
PNA-GAPDH-Biotin	GCCAGTGGACTCCACGACGTAC	Biotin—xx
PNA-GAPDH-Cy3	GCCAGTGGACTCCACGACGTAC	Су3—хх
PNA-GFP-Cy3	ACGTGTCTTGTAGTTCCCG	Biotin—xx
PNA-GFP-Cy3	ACGTGTCTTGTAGTTCCCG	Су3—хх
PNA-SCRAMBLED-Biotin	TCCGACCACGCATCTCCACCAG	Biotin—xx
PNA-SCRAMBLED-Cy3	TCCGACCACGCATCTCCACCAG	Су3—хх
DGL-KRAS-G12C#2	GCCTACGCCAC*_*AGCTCCAACT	Hac—xx
DGL-KRAS-G12C#3	CTACGCCAgluC*GL*AGgluCTCCAA	3RCCxx

6.1.2. Resuspensión de sondas PNA y DGL liofilizadas

Las sondas liofilizadas fueron resuspendidas en agua libre de ARNasas con un 10 % de DMSO. A continuación, se realizó una dilución 1:5 y se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop[®] ND-1000 (ThermoFisher Scientific, USA). La concentración fue calculada usando como valores de coeficiente de extinción molar (E260) 6.6, 8.8, 13.7, 11.7 y 2.5 (mM⁻¹cm⁻¹) para C, T, A, G respectivamente, considerando el marcaje específico de cada sonda.

6.2. Metodología capítulo 2

6.2.1. Citometría de flujo

La citometría de flujo fue realizada utilizando el instrumento BD FACSCanto II [™] y los resultados fueron analizados con el software FlowJo (versión 10). Los análisis de reacciones DCL en BD FACSCanto II [™] se realizaron utilizando el canal FITC, con una línea de láser de excitación de 488 nm y la emisión recolectada con un filtro de paso de banda de 530 / 30 nm para la detección de FAM (que se muestra en el eje Y en los gráficos de dispersión), y el canal APC para la detección de Cy5, (mostrado en el eje X en los gráficos de dispersión), con una línea de láser de excitación de 633 nm y emisión recogida con un filtro de paso de banda de 670 / 14 nm. Los datos de FACS se analizaron usando la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) en el canal APC.

6.2.2. Síntesis y preparación de Strep-FAM-NP (13)

6.2.2.1.General

Todos los productos químicos y disolventes (cianoborohidruro sódico, formamida, dimetilformamida (DMF), piperidina, entre otros) se obtuvieron de Sigma Aldrich. El tampón SCD se preparó a partir de una solución SSC2× y dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1 % con el pH ajustado a 6.0 usando HCl. La Fmoc-Glicina-OH y el Poloxámero 407 fueron adquiridos de Sigma Aldrich. La estreptavidina (procedente de *Streptomyces avidinii*) se adquirió de VWR. El compuesto estreptavidina conjugado con Alexa Fluor™ 647 se adquirió de ThermoFisher (USA).

6.2.2.2. Síntesis de aminometil PS-NPs (1)



Las aminometil PS-NPs (1) fueron preparadas mediante polimerización por dispersión. En primer lugar, se disolvió polivinilpirrolidona (PVP) (MW 29.000, Sigma-Aldrich) en etanol al 86 % en un volumen final de 10 mL y se desoxigenó mediante burbujeo de argón. A continuación, se disolvió azobisisobutironitrilo (AIBN) en estireno con clorhidrato de vinilbencilamina (VBAH) y divinilbenceno (DVB). La dispersión se desoxigenó con burbujeo de argón antes de la adición a la solución de PVP / etanol. La mezcla se agitó bajo argón durante 1 hora antes de calendar a 68 °C durante 15 horas. Las NPs se obtuvieron por centrifugación (11.000G, 15 min) y se lavaron dos veces con 10 mL de metanol y dos veces con 10 mL de agua. Finalmente, las NPs fueron almacenadas en 10 mL de agua a 4 °C.

6.2.2.3. Síntesis de Strep-FAM-NPs (13)



Las reacciones de acoplamiento se realizaron siguiendo procedimientos SPPS con un paso previo de activación del ácido carboxílico del monómero a acoplar en una solución de oxyma (50 equivalentes) en DMF durante 4 minutos a 25 °C seguido de la adición de N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC) (50 equivalentes) y mezcla durante 8-10 minutos a 25 °C. Esta solución activada se añadió a la suspensión de las amino-metil NPs y se mezcló en un Thermomixer (eppendorf, Germany) a 1.400 rpm durante 2 horas a 60 °C. Los monómeros protegidos por grupo Fmoc fueron acoplados como sigue: (i) Fmoc-Gly-OH, Oxyma, DIC (1,400 rpm, 2h, 60°C); (ii) 20% piperidine in DMF (1,400 rpm, 3 × 20min, 25 °C); (iii) Fmoc-PEG-OH, Oxyma, DIC (1,400 rpm, 2h, 60°C); (iv) Fmoc-Lys-Dde(OH), Oxyma, DIC 1,400 rpm, 2h, 60°C); (v) 3.5 Hydroxylamine.HCl, Imidazole, NMP (1,400 rpm, 1h, 25 °C);

La funcionalización de las NPs en FAM-NPs (**10**) se logró eliminando el grupo protector Dde de la lisina. El fluoróforo se acopló a la amina libre resultante de la desprotección. Para ello, las NPs fueron lavadas tres veces en 1 mL de PBS y a continuación resuspendidas en N,N-dimetilformamida (DMF). A continuación, (vi) se disolvieron 50 equivalentes de 5(6)-carboxifluoresceína (FAM) y 50 equivalentes de oxyma en DMF en un volumen final de 1 mL y la solución se mezcló durante 4 minutos a 25 °C antes de la adición de 50 equivalentes de DIC. Tras la adición de DIC, la solución se mezcló durante 8-10 minutos a 25 °C y se mezcló en un Thermomixer a 1.400 rpm durante 2 horas a 60 °C. A continuación, se realizaron 5 lavados PBS (1.400 rpm durante 10 minutos cada lavado) obteniendo finalmente FAM-NPs (**10**).

A continuación, se llevó a cabo la desprotección del grupo Fmoc, tras lo cual las FAM-NPs (**11**) fueron (vii) resuspendidas en una solución de glutaraldehído (25 % p / v) en tampón PBS y fueron

incubadas en agitación durante 15 horas a 25 °C, obteniendo FAM-NPs (**12**). A continuación, las FAM-NPs (**12**) fueron lavadas con PBS (pH 7,4) tras lo cual se añadió (viii) estreptavidina (0,3 µg / mL en PBS, pH 7,4) y se trató con una solución de cianoborohidruro de sodio (20 mM) en PBS / EtOH (3:1) durante 2 horas. Finalmente, las Strep-FAM-NP (**13**) se lavaron con PBS y se trataron con una solución de unión (etanolamina 40 mM con BSA al 1% (p / v) en PBS). Para evitar agregados, las NPs se incubaron en una (ix) solución al 1% (p / v) Poloxámero 407 en agua desionizada durante 15 horas en agitación a 1.400 rpm a 25 °C. Finalmente, las NP se lavaron una vez en PBS, obteniendo Strep-FAM-NPs (**13**) listas para usar.

6.2.2.4. Protocolo general para la desprotección de Fmoc

La desprotección de Fmoc se logró mediante el tratamiento de NP protegidas con Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 ml; 3 x 20 min). Las NPs se obtuvieron por centrifugación y posteriormente se lavaron con DMF (3 x 1 mL), MeOH (3 x 1 mL) y agua desionizada (3 x 1 mL).

6.2.2.5. Protocolo general para la desprotección de Dde

La desprotección de Dde se facilitó tratando las NPs con la mezcla de solución de desprotección de Dde (se suspendieron 1,80 mmol de NH₂OH.HCl y 1,35 mmol de imidazol en 5 mL de NMP), y la mezcla se sonicó hasta su completa disolución. Justo antes de la reacción, se diluyeron 5 volúmenes de esta solución con 1 volumen de DMF (1 mL) durante 1 hora en una rueda giratoria. Las NPs se obtuvieron por centrifugación y posteriormente se lavaron con DMF (3 x 1 mL), metanol (3 x 1 mL), agua desionizada (3 x 1 mL) y finalmente DMF (3 x 1 mL).

6.2.3.Caracterización de las Strep-FAM-NPs (13)

6.2.3.1. Contenido sólido (SC) de la emulsión (%)

Se colocó una masa conocida de una suspensión de NP de poliestireno (0,5-1 mg, suspendida en agua) en un vidrio de reloj, se cubrió con papel de aluminio, se secó a 25 °C durante 15 horas y se pesó para obtener la masa de las NPs. A continuación, se calculó el contenido sólido de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% SC = \frac{M}{Vs} x \ 100$$

Donde M = masa de NP (mg), Vs = Volumen de suspensión (μ L).

SC: 2%, 2 mg de NP en 100 µL de solución.

6.2.3.2. Cálculo de la carga de las NPs utilizando la prueba Fmoc-NPs

Las Fmoc-Gly-OH-NP se resuspendieron en 1 mL de piperidina al 20% en DMF (3 x 20 min), después de lo cual las NPs se lavaron por centrifugación tres veces, los sobrenadantes se combinaron y la carga se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

Loading
$$\binom{mmol}{g} = \frac{(A_{302}xV)}{(\varepsilon_{302}xdxW)}x1000$$

Donde A302: absorbancia medida a 302 nm, V: volumen de sobrenadantes combinados en mL, ε302: coeficiente de extinción molar (7800 M-1cm-1) y W: masa de perlas en mg.

Resultado: Carga (prueba Fmoc): 0,022 mmol / g

6.2.3.3. Prueba cualitativa de ninhidrina

Las reacciones de acoplamiento se controlaron mediante una prueba cualitativa de ninhidrina. Se lavaron pequeñas muestras de NPs en metanol (12 μ L, 2 % SC) en un eppendorf de 0,5 mL de capacidad con metanol y se centrifugaron, después de lo cual se añadieron 6 μ L de reactivo A (4 % p / v fenol en etanol absoluto mezclado con 0,65 % p / v cianuro potásico en agua y diluido en piperidina) y 2 μ L de reactivo B (0,05 % p / v ninhidrina en etanol absoluto). A continuación se mezcló y calentó a 100 °C durante 3 min. Si la muestra se encuentra teñida de azul indica la presencia de aminas primarias. Si la muestra se encuentra teñida de amarillo indica la ausencia de aminas primarias.

6.2.3.4. Determinación de la concentración de NPs (NPs / μL) mediante el uso de un método espectrofotométrico

La concentración de NP (NP / μ L) se determinó mediante un método espectrofotométrico en el que se realizó la medición de la densidad óptica de turbidez a 600 nm de suspensiones de PS-NP, basándose en principios nefelométricos. La luz que atraviesa las suspensiones de NP se dispersa mediante fenómenos de reflexión, refracción y difracción y la intensidad de la luz dispersada, que es proporcional al número de NP en suspensión, se registra mediante espectrofotómetros estándar. De esta manera, se obtuvieron curvas estándar de calibración para muestras con concentración conocida de amino-metil PS-NPs de 360 nm. Las curvas de calibración ajustaron modelos de regresión lineal mediante los cuales se pudo determinar el número de NPs por microlitro correspondiente a una unidad de DO600 para cada tamaño. Por lo tanto, sobre la base de estas curvas utilizando lotes iniciales de suspensiones NPs, se puede determinar el número de NPs en lotes finales, midiendo su densidad óptica a 600 nm.

6.2.4. Diseño de oligonucleótidos diana, diseño sondas PNA, diseño sondas DGL

Los oligonucleótidos sintéticos de ADN monocatenario (ssDNA) que contienen el codón 12 de la secuencia tipo salvaje de KRAS y que contienen el codón 12 mutado G12C (ssDNA-KRAS-wt-Cy5, ssDNA-KRAS-wt-biotin y ssDNA-KRAS-G12C-Cy5) así como las secuencias de los oligonucleótidos sintéticos de ssDNA de miR-122 (ssDNA-miR-122-Cy5) se obtuvieron de GENBANK, se comprobaron mediante análisis BLAST y fueron adquiridos a través de Integrated DNA Technologies (IDT) (USA) y Microsynth AG (Switzerland).

Se diseñaron y sintetizaron sondas PNA complementarios a KRAS y miR-122 marcadas con Cy5 (PNA-KRAS-wt-Cy5) o biotina (PNA-KRAS-wt-Biotin), y una DGL complementaria a KRAS portando una posición abásica frente al segundo nucleótido del codón 12 (DGL-K12RC) y miR-122 (DGL-miR-122). La SMART-Cytosine-PEG₁₂-Biotin, SMART-Adenine-Deaza-PEG₁₂-Biotin y las sondas PNA y DGL fueron proporcionadas por DESTINA Genomica SL.

6.2.5. Ensayos de hibridación PNA:ADN en solución

Los ensayos de hibridación PNA:ADN se llevaron a cabo incubando 1 μ M de ssDNA y 1 μ M de sonda PNA junto con 5 μ M de SMART-C-biotina en las mismas condiciones descritas anteriormente. Una vez la temperatura alcanzó 41 °C, se añadió cianoborohidruro de sodio a una concentración final de 1 mM, y la reacción se incubó a 41 °C durante 1 h mientras se agitaba a 1400 rpm en un Thermomixer (eppendorf, Germany). A continuación, se agregaron 5 × 10⁸ Strep-FAM-NP (**13**) y se incubaron a 25 °C durante 1 h con agitación a 1400 rpm. Finalmente, las NPs se lavaron con PBS 0.1% Tween (3 x 200 μ L; 5 min a 12.000 rpm)), se resuspendieron en 200 μ L de PBS y se analizaron por citometría de flujo.

6.2.6. Ensayos de hibridación DGL:ADN en solución

Las reacciones DCL se llevaron a cabo incubando 1 μ M de ssDNA y 1 μ M de sonda DGL junto con 5 μ M de SMART-C-biotina en las mismas condiciones descritas anteriormente. Una vez la temperatura alcanzó 40 °C, se añadió cianoborohidruro de sodio a una concentración final de 1 mM, y la reacción se incubó a 41 °C durante 1 h mientras se agitaba a 1400 rpm en un thermomixer (eppendorf, Germany). A continuación, se agregaron 5 × 10⁸ Strep-FAM-NP (**13**) y se incubaron a 25 °C durante 1 h con agitación a 1400 rpm. Finalmente, las NPs se lavaron con PBS 0.1% Tween (3 x 200 μ L; 5 min a 12.000 rpm)), se resuspendieron en 200 μ L de PBS y se analizaron por citometría de flujo.

6.2.7. Reacción DCL en plasma humano. Curva de calibración en plasma humano

La curva de calibración se realizó añadiendo cinco cantidades de diana (ssDNA-KRAS-wt-Cy5) (2,5 pmol, 12,5 pmol, 25 pmol, 37,5 pmol y 50 pmol) en tampón SCD (pH 6; 1: 4) conteniendo 1 μ M de sonda DGL en 10 μ L de plasma humano en un volumen final de 50 μ L. La reacción se mezcló y se incubó a 80 °C durante 5 minutos y se enfrió a 40 °C durante 1 hora utilizando un termociclador Veriti 96-pocillos (Applied Biosystem, USA). Las muestras de plasma humano de donantes sanos fueron aportadas por el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (convenio número S1900297) aprobado por el Comité Ético de Investigaciones Biomédicas de Andalucía (código del estudio: 32.160.041). A continuación, se agregaron 5 × 10⁸ Strep-FAM-NP (**13**) y se incubaron a 25 °C durante 1 h con agitación a 1400 rpm en un Thermomixer. Finalmente, las NPs se lavaron con PBS 0.1% Tween (3 x 200 μ L; 5 min a 12.000 rpm)), se resuspendieron en 200 μ L de PBS y se analizaron por citometría de flujo.

6.2.8. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y end-point PCR

El ARN fue extraído de la línea celular de adenocarcinoma colorrectal HT-29 (ATCC[®] HTB-38™) utilizando el kit miRNeasy® Mini kit (Qiagen, Germany). La cuantificación y calidad del ARN fue medida utilizando el sistema nanodrop (Thermo, US). La síntesis de ADNc fue llevada a cabo utilizando el kit Transcriptor First Strand ADNc Synthesis (Roche, Switzerland). La reacción endpoint PCR fue llevada a cabo utilizando la PCR Master Mix (Thermo Scientific™, USA) utilizando el programa (desnaturalización 95 °C durante 1 minuto, 35 ciclos formados por una etapa de 95 °C 15 segundos, una etapa de 55 °C 15 segundos y una etapa de 72 °C 15 segundos). Los primers 5'utilizados fueron forward 5'-AGTCATTTTCAGCAGGCC-3' y reverse GCTGTATCGTCAAGGCACTCT-3'. La calidad de amplificación fue analizada por electroforesis en gel de agarosa (2 %) y analizado mediante Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA).

6.3. Metodología capítulo 3

6.3.1. Microscopía confocal y de epifluorescencia

-Microscopía confocal. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 710 con un factor de zoom de aceite plan-apocromático 63× / 1.4, 1.0, 2.0.
Los láseres utilizados fueron láser diodo de 405 nm al 3.0 % para DAPI, láser argón 488 nm al 2.2 % para Alexa Fluor 488, láser HeNe 543 nm al 10.0 % para Cy3 y láser HeNe 633 para Alexa Fluor 647. El *pinhole* en todos los casos fue de 1,0 unidades de aire y la adquisición se realizó de modo

secuencial, manteniendo cada filtro configurado individualmente para evitar interferencias entre canales. Rango de detección DAPI: 410 – 487 nm; Alexa Fluor 488: 555 – 681 nm; Cy3: 555 – 681 nm; Alexa Fluor 647: 638 – 759 nm.

-**Microscopía de epifluorescencia.** Las imágenes fueron capturadas con un microscopio de epifluorescencia ZEISS Axio Imager A1 equipado con una lámpara de mercurio HBO 100 como fuente de iluminación, una cámara monocromática ZEISS AxioCam MR como detector y el software ZEN versión 3.1. En la adquisición se utilizó un objetivo ZEISS Plan-Apochromat 63x con apertura numérica 1.4 de inmersión en aceite y el filtro DAPI (excitación 335-383; emisión 420-470), filtro GFP (excitación 450-490; emisión 500-550) y filtro Rhodamina (excitación 540-552; emisión 575-640) para la detección del marcador nuclear DAPI, AlexaFluor488 y Cy3, respectivamente.

6.3.2. Cultivos celulares

Las líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal HT-29 (ATCC[®] HTB-38^m), adenocarcinoma de glándula mamaria MDA-MB-468 (ATCC[®] HTB-132^m), adenocarcinoma de pulmón H1975 (ATCC[®] CRL-5908^m), adenocarcinoma de cérvix HeLa (ATCC[®] CCL-2^m) y fibroblastos de ratón (*Mus musculus*) MEF (CF-1) (ATCC[®] SCRC-1040^m) fueron obtenidas de ATCC (Manassas, VA, USA). En todos los casos las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco, Paisley, Reino Unido), a excepción de la línea celular H1975, que fue crecida en RPMI (Gibco, Paisley, Reino Unido). Ambos medios fueron suplementados con suero bovino fetal al 10% (Gibco, Paisley, Reino Unido), 100 U / mL de penicilina / estreptomicina (Gibco, Paisley, Reino Unido), 1× L-glutamina (Gibco, Paisley, Reino Unido) y 1 mM de piruvato de sodio (Sigma Aldrich). Las líneas celulares fueron cultivadas en un incubador húmedo con 5 % de CO₂ a 37 °C.

6.3.3. Choque hipotónico, fijación Carnoy, preparación de metafases

-Choque hipotónico. Las líneas tumorales fueron crecidas hasta un 80 % de confluencia y tripsinizadas (solución de tripsina-EDTA 1×, Sigma Aldrich) a 37 °C durante 5 minutos. A continuación, se recogieron y centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm. El pellet celular fue resuspendido en 8 mL de solución hipotónica (0,075 M de cloruro potásico (KCI)) y fueron

incubadas a 37 °C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, los núcleos obtenidos fueron fijados con solución Carnoy.

-Fijación con solución Carnoy. Tras los 30 minutos de choque hipotónico, los núcleos fueron centrifugados durante 5 minutos a 1500 rpm y fijados resuspendiendo lentamente el pellet celular con una solución Carnoy (3 partes de metanol por 1 parte de ácido acético glacial) e incubando durante 30 minutos a 4 °C. El proceso se repitió durante 4 veces y los núcleos fueron resuspendidos en 1 mL de solución Carnoy. Finalmente se agregaron dos gotas de la suspensión en un portaobjetos y se dejó secar durante toda la noche.

-**Preparación de metafases**. Cuando el ensayo requiere metafases, previo al choque hipotónico, las células crecidas a una confluencia del 80 % el medio fue reemplazado por medio con 5 % colcemid (Sigma Aldrich). Las células fueron incubadas 4 horas en estufa a 37 °C y transcurrido este tiempo el medio fue aspirado y se realizó un lavado con PBS. A continuación, la línea celular fue tripsinizada (solución de tripsina-EDTA 1×, Sigma Aldrich) y centrifugada 5 minutos a 1500 rpm previo choque hipotónico.

6.3.4. Hibridación in situ Fluorescente (FISH) con sondas PNA

Los ensayos FISH con sondas PNA fueron realizados sumergiendo los portaobjetos en PBS1× dos veces durante dos minutos cada vez y deshidratando en alcohol creciente (70 % - 85 % - 100 %). A continuación, los portaobjetos se dejaron secar y se añadió la solución de hibridación, consistente en 20 mM Tris, pH 7.4, 60 % formamida y una concentración final de la sonda de 50 nM. A continuación, la muestra se cubrió con un cubreobjetos y se selló con Parafilm, disponiendo los portaobjetos en un Thermobrite (Abbott), denaturalizando a 85 °C durante 5 minutos e hibridando a 40 °C durante 1 hora. A continuación, se realizaron los lavados posthibridación en jarras tipo Coplin, sumergiendo los portaobjetos en solución de lavado SSC2× 0,2 % Tween durante 5 minutos a 37 °C y aplicando un segundo lavado con SSC2× 0,1 % Tween durante 5 minutos y sumergiendo los portaobjetos en agua. Finalmente se dejaron secar los portaobjetos levemente y se dispuso una gota de marcaje nuclear Vectashield Antifade Mounting Medium con DAPI (1.5 μ g / mL), cubriendo con cubreobjetos evitando burbujas y sellando el cubreobjetos.

6.3.5. FISH y reacción química dinámica in situ

La reacción química dinámica *in situ* fue llevada a cabo sumergiendo los portaobjetos en PBS dos veces durante dos minutos cada vez y deshidratando en alcohol creciente (70 % - 85 % - 100 %). A continuación, se dispuso una cámara (Grace Bio-Labs, 9 mm de diámetro, 0,8 mm de profundidad), se llenó con PBS y fue sellada. A continuación, se llevó a cabo una desnaturalización a 94 °C durante 10 minutos en un Thermobrite (Abbott) tras lo cual la cámara fue sumergida en hielo durante 2 minutos. A continuación, el portaobjetos se extrajo del hielo, se retiró el PBS de la cámara y se llenó de la solución de hibridación y reacción. La solución de hibridación y reacción está formada por un buffer fosfato 10 mM con pH ajustado a 6, la sonda DGL en una concentración final de 50 nM, la SMART-Nucleobase en una concentración de 5 μ M y el agente reductor a una concentración final de 1 mM.

Una vez añadida la solución de hibridación y reacción, la cámara fue sellada y puesta en Thermobrite a 40 °C durante 2 horas. Tras la incubación, el sobrenadante fue retirado, la cámara retirada y los portaobjetos sumergidos en solución de lavado en jarras tipo Coplin SSC2× 0,2 % Tween durante 5 minutos a 37 °C, seguido de un segundo lavado con SSC2× 0,1 % Tween durante 5 minutos seguido de un lavado en agua, listo para proceder a la reacción TSA.

6.3.6. Tyramide Signal Amplification (TSA)

La reacción TSA fue realizada siguiendo las instrucciones del kit Tyramide SuperBoost^M con estreptavidina y Alexa Fluor-488 tyramida (ThermoFisher Scientific). En primer lugar, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en PBS seguido de una incubación de 1 hora con HRP-Peroxidasa a temperatura ambiente. Si la línea celular expresa abundante biotina, es necesario una incubación previa con kit de bloqueo de biotina endógena (ThermoFisher Scientific). A continuación, se realizaron otros tres lavados en PBS de 10 minutos cada uno, y se incubó la muestra con 100 μ L de solución de trabajo, que contiene la solución de reacción, el sustrato de HRP-Peroxidasa (tiramida conjugada con Alexa Fluor 488) y H₂O₂. La reacción fue incubada durante 10 minutos. A continuación, las muestras fueron enjugadas tres veces con PBS y se llevó a cabo el marcaje nuclear, depositando una gota de Vectashield Antifade Mounting Medium con DAPI (1.5 μ g / mL), cubriendo con cubreobjetos evitando burbujas y sellando el cubreobjetos.

6.3.7. RNA-FISH con sondas PNA. RNA-FISH con química dinámica in situ

-RNA-FISH con sondas PNA. Los ensayos de RNA-FISH fueron llevados a cabos el mismo día en el que las muestras fueron fijadas para evitar la degradación del ARN. Todos los buffers utilizados se prepararon libres de ARNasas. Hasta el paso de la hibridación, los ensayos fueron realizados en campana y el material esterilizado con lejía al 10 %. Los ensayos de RNA-FISH fueron realizados cultivando las células en portaobjetos con cámara (LAB TEK® II chamber slide[™]) a razón de 10.000 células por pocillo. Una vez alcanzado el 80 % de confluencia, se procedió retirar el medio de cultivo y se lavó una vez con PBS el portaobjetos, procediendo a la fijación con 4 % paraformaldehído en PBS frío e incubando durante 10 minutos. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS y se procedió a la permeabilización.

El proceso de permeabilización se realizó de diferentes métodos según el objetivo. En un caso, se llevó a cabo la permeabilización con PBS 0,2 % Tween durante 10 minutos. En otro caso con PBS 0,2 % Tritón 100 durante 10 minutos. En otro caso, utilizando etanol 70 % en frio (2 °C – 8 °C) para, además de permeabilizar, anular la actividad de ARNasas. Una vez fijada y permeabilizada la muestra, se realizaron dos bloqueos. Se añadió una gota de suero de cabra 10 % sobre la muestra y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se hicieron tres lavados en PBS de 30 minutos cada uno y se procedió a bloquear la biotina endógena (kit *endogenous biotin blocking* (ThermoFisher)).

Tras los bloqueos, la muestra fue lavada tres veces en PBS durante 10 minutos cada vez y a continuación se añadió una gota con el buffer de hibridación, consistente en 1 g / mL dextrán sulfato (Sigma D8906-50G) 10 % de formamida y buffer Tris 20 mM y se incubó durante 1 hora a 40 ° C. A continuación, se realizaron los lavados post-hibridación, sumergiendo los portaobjetos en solución de lavado SSC2× 0,2 % Tween durante 5 minutos a 37 °C y aplicando un segundo lavado con SSC2× 0,1 % Tween durante 5 minutos y sumergiendo los portaobjetos en agua. Finalmente se dejaron secar los portaobjetos levemente y se dispuso una gota de marcaje nuclear Vectashield Antifade Mounting Medium con DAPI (1.5 μ g / mL), cubriendo con cubreobjetos evitando burbujas y sellando el cubreobjetos.

-**RNA-FISH con química dinámica in situ.** Los ensayos de RNA-FISH con química dinámica *in situ* fueron llevados a cabo siguiendo las mismas directrices anteriormente indicadas, a excepción de la permeabilización, que fue realizada con etanol 70 %. La hibridación y reacción por química dinámica fueron llevadas a cabo en una cámara de hibridación (Grace Bio-Labs, 9mm de diámetro, 0,8 mm de profundidad). El buffer de hibridación y reacción consistió en buffer fosfato 10 mM con pH ajustado a 6, 50 nM de sonda DGL, 5 µM de SMART-Nucleobase y 1 mM de agente

236

reductor. El portaobjetos fue incubado 2 horas a 40 °C en un Thermobrite (Abbott). A continuación, se realizaron los lavados post-hibridación, sumergiendo los portaobjetos en solución de lavado SSC2× 0,2 % Tween durante 5 minutos a 37 °C y aplicando un segundo lavado con SSC2× 0,1 % Tween durante 5 minutos y sumergiendo los portaobjetos en agua. Finalmente se deja secar los portaobjetos levemente y se dispone una gota de marcaje nuclear Vectashield Antifade Mounting Medium con DAPI (1.5 μ g / mL), cubriendo con cubreobjetos evitando burbujas y sellando el cubreobjetos.

6.3.8. Ensayo de especificidad, sensibilidad y cuantificación de señales

-Especificidad. Para mostrar la especificidad de incorporación de SMART-Nucleobases, la reacción fue llevada a cabo en idénticas condiciones, tal y como está descrita en la *sección 6.3.7*. incubando con cada una de las SMART-Nucleobases biotiniladas de forma independiente. A continuación, se llevó a cabo el marcaje TSA y se analizaron las muestras en microscopía confocal.

-Sensibilidad y cuantificación de señales. La sensibilidad fue analizada a través de la cuantificación de las señales obtenidas. Para ello, se tomaron imágenes de 50 núcleos interfásicos en tres muestras independientes, y 25 núcleos metafásicos en 3 muestras independientes. A continuación, se utilizó ImageJ para identificar cada señal discreta de Cy3 y Alexa Fluor 488. A continuación, se estableció una relación de correspondencia entre cada señal Cy3 con señal Alexa Fluor 488 correspondiente y se analizó el número modal indicado en ATCC, de donde se obtuvieron las muestras.

6.4. Metodología capítulo 4

6.4.1. Síntesis de ADNc

El ARN viral obtenido de PBMC infectadas fue almacenado a – 80 °C. La retrotranscripción se realizó utilizando tres kits diferentes: TranscriptMe (Blirt, Poland), Superscript III (ThermoFisher, USA) y Superscript IV (ThermoFisher, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos, la retrotranscripción fue llevada a cabo utilizando *primers* decámeros aleatorios biotinilados (6 μ M) y el ADNc biotinilado obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

6.4.2. Sondas Padlock

Para la validación de los ensayos 1RCA y C2CA, así como para las curvas de calibración se utilizaron dos sondas Padlock complementarias al ADNc viral del ZIKV, concretamente a las regiones codificantes de la cápsida (C) y la premembrana (PrM). Para el análisis de las muestras del virus del Zika se utilizaron 12 sondas complementarias al ADNc de las regiones codificantes de la cápsida (C), la premembrana (PrM), la envoltura (E) y las proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS4, NS5). Todas las sondas incluyen dos regiones complementarias a la diana, dos secuencias reconocidas por una sonda de detección y una sonda de captura y un sitio de restricción Alul, requerido para realizar C2CA. Las sondas fueron solicitadas en Integrated DNA Technologies (USA) con extremos 5' fosforilados o biotinilados, dependiendo del ensayo.

6.4.3. Curva de calibración mediante Rolling Circle Amplification (RCA)

Diferentes concentraciones de diana sintética (1000 pM, 100 pM, 10 pM, 1 pM, 0,1 pM y 0,01 pM) fueron incubadas con 100 pM de la sonda Padlock para llevar a cabo la ligación correspondiente en una mezcla de ligación con 0,125 U / μ L de enzima ligasa Tth, 200 μ g / mL de BSA en buffer Ampl 1× (Tris-HCL 200 mM, pH 8,3, KCl 250 mM, MgCl₂ 100 mM, 5 mM NAD, Triton X-100 al 0,1%). La reacción se incubó a 60 °C durante 30 minutos. A continuación, se llevó a cabo la reacción RCA agregando una mezcla de amplificación con 0,4 U / μ L de enzima polimerasa Phi29, 1 U / μ L de enzima Exonucleasa I, 200 μ g / mL de BSA, 125 μ M de dNTPs y el buffer Phi29 a una concentración 1× (Tris-HCl 500 mM, pH 8,3, MgCl₂ 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM). La mezcla fue incubada a 37 °C durante 2 horas, seguida de una inactivación a 85 °C durante 15 minutos.

A continuación, se llevó a cabo el marcaje de los productos formados en la amplificación, incubando la solución con una mezcla que contiene los oligos de detección y de captura a una concentración final de 5 nM en agua miliQ. La mezcla se incubó a 75 °C durante 5 minutos seguido de 15 minutos a 55 °C. Finalmente se tomaron 10 µL de la solución y se depositaron en un portaobjetos de adhesión Plus Superfrost[®] Plus (VWR), se cubrió con cubreobjetos y se visualizó por microscopía.

6.4.4. Circle-To-Circle Amplification (C2CA). Curva de calibración. Análisis de ARN del virus del Zika. Evaluación eficacia de fármacos antiflavivirales

Diferentes concentraciones de diana sintética biotinilada (1000 fM, 100 fM, 10 fM, 1 fM, 0,1 fM y 0,01 fM) fueron incubadas con 100 pM de la sonda Padlock para llevar a cabo la ligación correspondiente en una mezcla de ligación con 0,25 U / μ L de enzima AMPligasa, 200 μ g / mL de BSA en buffer Ampl 1× (Tris-HCL 200 mM, pH 8,3, KCl 250 mM, MgCl₂ 100 mM, 5 mM NAD, Triton X-100 al 0,1%) y 0,125 U / μ L de ARNasa H, en un volumen final de 20 μ L. La reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos seguido de 60 °C durante 30 minutos.

A continuación, se añadieron 5 μ L de *beads* magnéticas conjugadas con estreptavidina (*Dynabeads* T1, ThermoFisher (USA)) lavadas 3 veces con tampón Wtw (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 5 mM, Tween 20 al 0,1%, NaCl 100 mM) y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las *beads* fueron lavadas una vez con buffer Wtw y se llevó a cabo la reacción RCA. La reacción se llevó a cabo añadiendo la mezcla de amplificación con 0,4 U / μ L de enzima polimerasa Phi29, 1 U / μ L de enzima Exonucleasa I, 200 μ g / mL de BSA, 125 μ M de dNTPs y el buffer Phi29 a una concentración 1× (Tris-HCl 500 mM, pH 8,3, MgCl₂ 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM). La mezcla fue incubada a 37 °C durante 1 hora, seguida de una inactivación a 65 °C durante 5 minutos.

A continuación, se descartó el sobrenadante y se llevó a cabo la digestión, añadiendo una mezcla que contenía 120 mU / μ L de enzima Alul, 120 nM de oligo de restricción, 200 μ g / mL de BSA y tampón Phi29 1×. La mezcla se incubó a 37 °C durante 5 minutos y se inactivó a 65 °C durante 2 minutos. Tras la digestión, se recogió el sobrenadante y las *beads* fueron descartadas. Se llevó a cabo un paso de ligación y amplificación combinado, añadiendo una concentración final de 20 mU / μ L de ligasa T4, 200 mU / μ L de polimerasa Phi29, 200 μ g / mL de BSA, 0,68 mM ATP y buffer tampón Phi29 1× y 125 μ M dNTPs. La solución se incubó a 37 °C durante 2 horas seguido de una inactivación a 65 °C durante 2 minutos.

Posteriormente, se llevó a cabo el marcaje de los productos formados en la amplificación, incubando la solución con una mezcla que contiene los oligos de detección y de captura a una concentración final de 5 nM en agua miliQ. La mezcla se incubó a 75 °C durante 5 minutos seguido de 15 minutos a 55 °C. Finalmente se tomaron 10 µL de la solución y se depositaron en un portaobjetos de adhesión Plus Superfrost[®] Plus (VWR), se cubrió con cubreobjetos y se visualizó por microscopía.

Cuando se llevó a cabo la detección del ARN viral en PBMC infectadas y se evaluó la eficacia de los fármacos anti-flavivirales, 10 μ L de ADNc biotinilado obtenido de la retrotranscripción (*sección 6.4.1*) se incubó con un *cocktail* de 12 sondas Padlock que hibridan a lo largo del ADNc del virus del Zika a una concentración final de 100 pM. El resto del proceso se realizó como se indica anteriormente.

6.4.5. Cuantificación de productos de amplificación por círculo rodante (RCPs)

Los productos RCPs fueron cuantificados a través de imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia. Las imágenes de epifluorescencia fueron tomadas con un Zeiss Axio Imager Z2 con un objetivo plan-apocromático 20× zoom 1.0. Tras la reacción, se depositó la muestra con los RCPs en un portaobjetos SuperFrost Plus[®] (VWR) para evitar la dispersión de la muestra, se cubrió con cubreobjetos de dimensiones 710,52 µm x 523,8 µm y se visualizó por microscopía. En los casos en los que la cantidad de RCPs fue abundante y ocupaban más de un plano, se realizó un ensayo Z-Stack, es decir, se tomaron imágenes de varios planos y se superpusieron en una única imagen para asegurar que todos los RCPs fueron cuantificados. Las imágenes fueron tomadas en el canal para detectar Cy3, pero, además, también se tomaron en 6 canales distintos para detectar señales inespecíficas: Atto, Texas Red, FITC, Cy5, DAPI y Cy7. Sólo se contabilizaron aquellas señales obtenidas en el canal Cy3. Los ensayos se realizaron por duplicado y para el recuento de RCP en los portaobjetos, se tomaron imágenes de 5 regiones de interés independientes y se realizó una media del número de RCPs contabilizados por región de interés.

En aquellas imágenes en las que se llevó a cabo la cuantificación de los RCPs, el análisis se realizó mediante los softwares Cell profiler e ImageJ. Cell Profiler (NIH, EE. UU.) es un software que permite establecer los parámetros exactos con los que realizar la cuantificación de cada una de las imágenes o de todas en conjunto, analizando intensidad de la escala de grises en un área determinada o realizando un análisis de partículas para contar el número de RCPs. Permite cargar a la vez varias imágenes, analizándolas todas de forma automática y devolviendo un número de RCPs detectados junto con otras características como el diámetro o la intensidad de señal. Adicionalmente las imágenes pueden ser analizadas mediante ImageJ y la función *Find Maxima*, generando una cuantificación que puede ser comparado con el obtenido por Cell Profiler para conocer la idoneidad de los datos de detección de los RCPs. Este mismo protocolo fue seguido para realizar la curva de calibración RCA y C2CA. Así mismo, este mismo protocolo se utilizó para analizar las muestras de virus obtenidas por C2CA.



APÉNDICES

















Tertiary Amine





Duplex DNA alpha sat / DGL probe

Iminium Hydrogen bonds

Biotinilated Reactive Base (SC-REX-PEG₁₂-Biotin)

Apéndice 4. Figura 88





Apéndice 5. Derechos y permisos

-La **Tabla 1** ha sido adaptada de la Tabla 1 de "J. Hernández-Losa, J. Sanz, S. Landolfi, F. López-Ríos, J. Palacios, M.D. Bautista, E. Díaz-Rubio, J. Tabernero, J. García Foncillas, S. Ramón y Cajal, Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon, Rev. Esp. Patol. 45 (2012) 76–85. 76–85. https://doi.org/10.1016/j.patol.2011.11.005" con permiso de Elsevier bajo la licencia 5071410783906 (Copyright © 2021 Elsevier).

-La **Figura 1** ha sido adaptada de la Figura 1, 2 y 3 de "E. Navarro, G. Serrano-Heras, M.J. Castaño, J. Solera, Real-time PCR detection chemistry, Clin. Chim. Acta. 439 (2015) 231–250. https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017" con permiso de Elsevier bajo licencia 5071410037128 (Copyright © 2014 Elsevier B.V.).

-La **Figura 7** ha sido reproducida de la Figura 1 de "M.J. Kellner, J.G. Koob, J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh, F. Zhang, SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases, Nat. Protoc. 14 (2019) 2986–3012. https://doi.org/10.1038/s41596-019-0210-2" con permiso de Nature Spring bajo la licencia 5071420291495.

-La **Figura 9** ha sido reproducida de "V.V.K. Gupta N., Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality., (2019)" con permiso de Springer Nature bajo licencia 5071420699050.

-La **Figura 10** ha sido reproducida de la Figura 15.2 "V.V.K. Gupta N., Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality., Microb. Technol. Welf. Soc. Microorg. Sustain. Vol 17. (2019) 313–341. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-13-8844-6_15" con permiso de Springer Nature bajo licencia 5071420927215.

-La **Figura 11** ha sido adaptada de la Figura 1 de "G.K. Geiss, R.E. Bumgarner, B. Birditt, T. Dahl, N. Dowidar, D.L. Dunaway, H.P. Fell, S. Ferree, R.D. George, T. Grogan, J.J. James, M. Maysuria, J.D. Mitton, P. Oliveri, J.L. Osborn, T. Peng, A.L. Ratcliffe, P.J. Webster, E.H. Davidson, L. Hood, Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs, Nat. Biotechnol. 26 (2008) 317–325. https://doi.org/10.1038/nbt1385" con permiso de Springer Nature bajo la licencia 5071421024914.

-La **Figura 74** ha sido reproducida de la Figura 1 "J.H. Lee, E.R. Daugharthy, J. Scheiman, R. Kalhor, T.C. Ferrante, R. Terry, B.M. Turczyk, J.L. Yang, H.S. Lee, J. Aach, K. Zhang, G.M. Church, Fluorescent in situ sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and

tissues, Nat. Protoc. 10 (2015) 442–458. https://doi.org/10.1038/nprot.2014.191" con permiso de Springer Nature bajo la licencia 5071790313872.

-La **Figura 94** ha sido reproducida de la **Figura 7**, de "M.G. Mohsen, E.T. Kool, The Discovery of Rolling Circle Amplification and Rolling Circle Transcription, Acc. Chem. Res. 49 (2016) 2540–2550. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00417" con permiso de ACS Publications. Copyright © 2016 American Chemical Society.

Las siguientes figuras han sido reproducidas sin necesidad de permiso:

La Figura 2 y Figura 3 han sido reproducidas de la Figura 1 y Figura 2 de la referencia [31]. La Figura 4 ha sido reproducida de la Figura 2 de la referencia [30]. La Figura 6 ha sido reproducida de la Figura 1 de la referencia [40]. La Figura 20 ha sido reproducida de la Figura 22 de [73]. La Figura 21 ha sido reproducida de la Figura 1 de la referencia [80]. La Figura 22 ha sido reproducida de la Figura 1 de la referencia [120]. La Figura 47 ha sido reproducida de la Figura 1 de la referencia [135]. La Figura 95 ha sido adaptada de la Figura 1 de la referencia [193]. La Figura 95 ha sido reproducida de la Figura 1 de la referencia [219]. La Figura 113 y la Figura 114 han sido reproducidas del Graphical Abstract y la Figura 3 de la referencia [229].

La Figura 5, Figura 48, Figura 68, Figura 72, Figura 75, Figura 76, Figura 77, Figura 79, Figura 97, Figura 98, Figura 99, Figura 106 y Figura 116A han sido creadas con Biorender.com



REFERENCIAS

Referencias

- M. Debnath, G.B.K.S. Prasad, P.S. Bisen, M. Debnath, G.B.K.S. Prasad, P.S. Bisen, Introduction to Molecular Diagnostics, Mol. Diagnostics Promises Possibilities. (2010) 1– 10. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3261-4_1.
- [2] V. V. Demidov, DNA diagnostics in the fifty-year retrospect, Expert Rev. Mol. Diagn. 3 (2003) 121–124. https://doi.org/10.1586/14737159.3.2.121.
- [3] M.E. Robson, C.D. Storm, J. Weitzel, D.S. Wollins, K. Offit, American Society of Clinical Oncology Policy Statement update: Genetic and genomic testing for cancer susceptibility, J. Clin. Oncol. 28 (2010) 893–901. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.0660.
- [4] L. O'Connor, B. Glynn, Recent advances in the development of nucleic acid diagnostics,
 Expert Rev. Med. Devices. 7 (2010) 529–539. https://doi.org/10.1586/erd.10.22.
- K.C.S. Oliveira, I.B. Ramos, J.M.C. Silva, W.F. Barra, G.J. Riggins, V. PalanD.E., C.T. Pinho,
 M. Frenkel-Morgenstern, S.E.B. Santos, P.P. Assumpcao, R.R. Burbano, D.Q. Calcagno,
 Current perspectives on circulating tumor DNA, precision medicine, and personalized
 clinical management of Cancer, Mol. Cancer Res. 18 (2020) 517–528.
 https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0768.
- [6] G.P. Patrinos, P.B. Danielson, W.J. Ansorge, Molecular Diagnostics: Past, Present, and Future, Elsevier Ltd, 2017. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00001-8.
- [7] C. Tan, X. Du, KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer, World J. Gastroenterol. 18 (2012) 5171–5180. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i37.5171.
- [8] H. Hampel, R.L. Bennett, A. Buchanan, R. Pearlman, G.L. Wiesner, A practice guideline from the American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors: Referral indications for cancer predisposition assessment, Genet. Med. 17 (2015) 70–87. https://doi.org/10.1038/gim.2014.147.
- [9] R.M. Nakamura, Y. Kasahara, Molecular Diagnostics in the Evaluation of Cancer: Modern Concepts and Overview, First Edit, Elsevier Inc., 2010. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369428-7.00019-7.
- S.B. Baylin, P.A. Jones, Epigenetic determinants of cancer, Cold Spring Harb. Perspect.
 Biol. 8 (2016) 1–35. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505.

- [11] U.S. Food and Drug Administration (FDA). Nucleic Acid Based Tests. Accessed April 6, (2021). https://www.fda.gov/medical-devices/in-vitro-diagnostics/nucleic-acid-basedtests.
- [12] M.L. Metzker, Sequencing technologies the next generation, Nat. Rev. Genet. 11 (2010) 31–46. https://doi.org/10.1038/nrg2626.
- [13] J. Hernández-Losa, J. Sanz, S. Landolfi, F. López-Ríos, J. Palacios, M.D. Bautista, E. Díaz-Rubio, J. Tabernero, J. García Foncillas, S. Ramón y Cajal, Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon, Rev. Esp. Patol. 45 (2012) 76–85. https://doi.org/10.1016/j.patol.2011.11.005.
- [14] G. Di Leva, C.M. Croce, The Role of microRNAs in Cancer, Target. Ther. Transl. Cancer Res. 79 (2015) 80–88. https://doi.org/10.1002/9781118468678.ch8.
- [15] M.H. Mo, L. Chen, Y. Fu, W. Wang, S.W. Fu, Cell-free Circulating microARN Biomarkers in Cancer, J. Cancer. 3 (2012) 432–448. https://doi.org/10.7150/jca.4919.
- [16] T. Matching, R. Test, Chapter 8 Chapter 8, Test. 1937 (2001) 162–173. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-944-4.
- C. Backes, E. Meese, A. Keller, Specific microARN Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects, Mol. Diagnosis Ther. 20 (2016) 509–518. https://doi.org/10.1007/s40291-016-0221-4.
- [18] M. De Planell-Saguer, M.C. Rodicio, Analytical aspects of microRNA in diagnostics: A review, Anal. Chim. Acta. 699 (2011) 134–152. https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.025.
- W. Kurt Roth, A. Schuller, M.P. Busch, H.W. Reesink, S. Panzer, International survey on NAT testing of blood donations: Expanding implementation and yield from 1999 to 2009, Vox Sang. 102 (2012) 82–90. https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2011.01506.x.
- [20] M. Mauk, C. Liu, J. Song, H. Bau, Integrated Microfluidic Nucleic Acid Isolation, Isothermal Amplification, and Amplicon Quantification, Microarrays. 4 (2015) 474–489. https://doi.org/10.3390/microarrays4040474.
- [21] A. S Khan, Rapid Advances in Nucleic Acid Technologies for Detection and Diagnostics of Pathogens, J. Microbiol. Exp. 1 (2014) 56–61. https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00009.
- [22] H. Zhu, Z. Fohlerová, J. Pekárek, E. Basova, P. Neužil, Recent advances in lab-on-a-chip technologies for viral diagnosis, Biosens. Bioelectron. 153 (2020). https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112041.
- [23] J. Akst, RNA extraction kits for covid-19 tests are in short supply in us. Accessed February
 8, (2021). https://www.the-scientist.com/news-opinion/rna-extraction-kits-for-covid-19-tests-are-in-short-supply-in-us-67250.
- [24] A.S. Fomsgaard, M.W. Rosenstierne, An alternative workflow for molecular detection of SARS-CoV-2 - Escape from the NA extraction kit-shortage, Copenhagen, Denmark, March 2020, Eurosurveillance. 25 (2020) 1–4. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.14.2000398.
- [25] A. Deshpande, P.S. White, Multiplexed nucleic acid-based assays for molecular diagnostics of human disease, Expert Rev. Mol. Diagn. 12 (2012) 645–659. https://doi.org/10.1586/erm.12.60.
- [26] R. Higuchi, G. Dollinger, P.S. Walsh, R. Griffith, Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences, Nat. Biotechnol. 10 (1992) 413–417.
- [27] M. Seifi, A. Ghasemi, S. Heidarzadeh, M. Khosravi, A. Namipashaki, V. Mehri, A. Alizadeh,
 N. Danaei, Overview of Real-Time PCR Principles, Polym. Chain React. (2012).
 https://doi.org/10.5772/39220.
- [28] E. Navarro, G. Serrano-Heras, M.J. Castaño, J. Solera, Real-time PCR detection chemistry, Clin. Chim. Acta. 439 (2015) 231–250. https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017.
- [29] L.M. Zanoli, G. Spoto, Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices, Biosensors. 3 (2013) 18–43. https://doi.org/10.3390/bios3010018.
- [30] O.L. Bodulev, I.Y. Sakharov, Isothermal Nucleic Acid Amplification Techniques and Their
 Use in Bioanalysis, Biochem. 85 (2020) 147–166. https://doi.org/10.1134/S0006297920020030.
- [31] B.W. Buchan, N.A. Ledeboer, Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory, Clin. Microbiol. Rev. 27 (2014) 783–822. https://doi.org/10.1128/CMR.00003-14.

- [32] H.D. De Paz, P. Brotons, C. Muñoz-Almagro, Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: Towards low-cost point-of-care diagnostics, Expert Rev. Mol. Diagn. 14 (2014) 827–843. https://doi.org/10.1586/14737159.2014.940319.
- [33] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, Nucleic Acids Res. 28 (2000) e63. https://watermark.silverchair.com/2800e63.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_ Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAmYwggJiBgkqhkiG9w0BBwagggJTMIICTwIBADCCAkg GCSqGSIb3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMy3AQPdcwVpshAVuIAgEQgIICGSfU5e hJRqbly2A_4pd12_oNbrQem7FM_kTE9ZYQL40XC4I.
- [34] Y.P. Wong, S. Othman, Y.L. Lau, S. Radu, H.Y. Chee, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms, J. Appl. Microbiol. 124 (2018) 626–643. https://doi.org/10.1111/jam.13647.
- [35] S. Barreda-García, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castañón, Helicase-dependent isothermal amplification: a novel tool in the development of molecular-based analytical systems for rapid pathogen detection, Anal. Bioanal. Chem. 410 (2018) 679–693. https://doi.org/10.1007/s00216-017-0620-3.
- [36] R.S. Lasken, Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method, Biochem. Soc. Trans. 37 (2009) 450–453. https://doi.org/10.1042/BST0370450.
- [37] F.B. Dean, S. Hosono, L. Fang, X. Wu, A.F. Faruqi, P. Bray-Ward, Z. Sun, Q. Zong, Y. Du, J. Du, M. Driscoll, W. Song, S.F. Kingsmore, M. Egholm, R.S. Lasken, Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 (2002) 5261–5266. https://doi.org/10.1073/pnas.082089499.
- [38] L. Huang, F. Ma, A. Chapman, S. Lu, X.S. Xie, Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 16 (2015) 79–102. https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090413-025352.
- [39] D.S. Boyle, R. McNerney, H. Teng Low, B.T. Leader, A.C. Pérez-Osorio, J.C. Meyer, D.M. O'Sullivan, D.G. Brooks, O. Piepenburg, M.S. Forrest, Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis by recombinase polymerase amplification, PLoS One. 9 (2014) 1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103091.

- [40] O. Piepenburg, C.H. Williams, D.L. Stemple, N.A. Armes, DNA detection using recombination proteins, PLoS Biol. 4 (2006) 1115–1121. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204.
- [41] M.J. Kellner, J.G. Koob, J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh, F. Zhang, SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases, Nat. Protoc. 14 (2019) 2986–3012. https://doi.org/10.1038/s41596-019-0210-2.
- [42] J.M. Levsky, R.H. Singer, Fluorescence in situ hybridization: Past, present and future, J.
 Cell Sci. 116 (2003) 2833–2838. https://doi.org/10.1242/jcs.00633.
- [43] D. Huber, L. Voith von Voithenberg, G. V. Kaigala, Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH?, Micro Nano Eng. 1 (2018) 15–24. https://doi.org/10.1016/j.mne.2018.10.006.
- [44] M.B.K. Lambros, R. Natrajan, J.S. Reis-Filho, Chromogenic and fluorescent in situ hybridization in breast cancer, Hum. Pathol. 38 (2007) 1105–1122. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.04.011.
- [45] Y. Chen, L. Liu, R. Ni, W. Zhou, Advances in HER2 testing, 1st ed., Elsevier Inc., 2019. https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.03.004.
- [46] A. Raj, P. van den Bogaard, S.A. Rifkin, A. van Oudenaarden, S. Tyagi, Imaging individual ARNm molecules using multiple singly labeled probes, Nat. Methods. 5 (2008) 877–879. https://doi.org/10.1038/nmeth.1253.
- [47] S. Jørgensen, A. Baker, S. Møller, B.S. Nielsen, Robust one-day in situ hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes, Methods. 52 (2010) 375–381. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.07.002.
- [48] E. V. Volpi, J.M. Bridger, FISH glossary: An overview of the fluorescence in situ hybridization technique, Biotechniques. 45 (2008) 385–409. https://doi.org/10.2144/000112811.
- [49] M.G. Marzancola, A. Sedighi, P.C.H. Li, DNA microarray-based diagnostics, Methods Mol.
 Biol. 1368 (2016) 161–178. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3136-1_12.
- [50] B.E. Slatko, A.F. Gardner, F.M. Ausubel, Overview of Next-Generation Sequencing Technologies, Curr. Protoc. Mol. Biol. 122 (2018) 1–11. https://doi.org/10.1002/cpmb.59.

- [51] S. Goodwin, J.D. McPherson, W.R. McCombie, Coming of age: Ten years of nextgeneration sequencing technologies, Nat. Rev. Genet. 17 (2016) 333–351. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49.
- [52] V.V.K. Gupta N., Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality., Microb. Technol. Welf. Soc. Microorg. Sustain. Vol 17. (2019) 313–341. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-13-8844-6_15.
- [53] R. Stark, M. Grzelak, J. Hadfield, RNA sequencing: the teenage years, Nat. Rev. Genet. 20 (2019) 631–656. https://doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2.
- [54] Z. Wang, M. Gerstein, M. Snyder, RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics, Nat Rev Genet. 10 (2010) 57–63. https://doi.org/10.1038/nrg2484.RNA-seq.
- [55] J.M. Eastel, K.W. Lam, N.L. Lee, W.Y. Lok, A.H.F. Tsang, X.M. Pei, A.K.C. Chan, W.C.S. Cho, S.C.C. Wong, Application of NanoString technologies in companion diagnostic development, Expert Rev. Mol. Diagn. 19 (2019) 591–598. https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1623672.
- [56] G.K. Geiss, R.E. Bumgarner, B. Birditt, T. Dahl, N. Dowidar, D.L. Dunaway, H.P. Fell, S. Ferree, R.D. George, T. Grogan, J.J. James, M. Maysuria, J.D. Mitton, P. Oliveri, J.L. Osborn, T. Peng, A.L. Ratcliffe, P.J. Webster, E.H. Davidson, L. Hood, Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs, Nat. Biotechnol. 26 (2008) 317–325. https://doi.org/10.1038/nbt1385.
- [57] S. Karkare, D. Bhatnagar, Promising nucleic acid analogs and mimics: Characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino, Appl. Microbiol. Biotechnol. 71 (2006) 575–586. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0434-2.
- [58] M. Taskova, A. Mantsiou, K. Astakhova, Synthetic Nucleic Acid Analogues in Gene Therapy: An Update for Peptide–Oligonucleotide Conjugates, ChemBioChem. 18 (2017) 1671–1682. https://doi.org/10.1002/cbic.201700229.
- [59] D.C. Ward, E. Reich, L. Stryer, Fluorescence Studies of Nucleotides and Polynucleotides,
 J. Biol. Chem. 244 (1969) 1228–1237. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)91833-8.
- [60] D.A. Braasch, D.R. Corey, Locked nucleic acid (LNA): Fine-tuning the recognition of DNA and RNA, Chem. Biol. 8 (2001) 1–7. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00058-2.

- [61] P.H. Hagedorn, R. Persson, E.D. Funder, N. Albæk, S.L. Diemer, D.J. Hansen, M.R. Møller, N. Papargyri, H. Christiansen, B.R. Hansen, H.F. Hansen, M.A. Jensen, T. Koch, Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery, Drug Discov. Today. 23 (2018) 101– 114. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.018.
- [62] P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg, O. Buchardt, Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine- Substituted Polyamide Author (s): Peter E. Nielsen, Michael Egholm, Rolf H. Berg and Ole Buchardt Published by: American Association for the Advancement of Science Stable, Science. 254 (1991) 1497.
- [63] J. Saarbach, P.M. Sabale, N. Winssinger, Peptide nucleic acid (PNA) and its applications in chemical biology, diagnostics, and therapeutics, Curr. Opin. Chem. Biol. 52 (2019) 112– 124. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.06.006.
- [64] A. Gupta, A. Mishra, N. Puri, Peptide nucleic acids: Advanced tools for biomedical applications, J. Biotechnol. 259 (2017) 148–159. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.026.
- [65] A. Manicardi, R. Corradini, Effect of chirality in gamma-PNA: PNA interaction, another piece in the picture, Artif. DNA. PNA XNA. 5 (2014) e1131801. https://doi.org/10.1080/1949095X.2015.1131801.
- [66] I. Sacui, W.C. Hsieh, A. Manna, B. Sahu, D.H. Ly, Gamma Peptide Nucleic Acids: As Orthogonal Nucleic Acid Recognition Codes for Organizing Molecular Self-Assembly, J. Am. Chem. Soc. 137 (2015) 8603–8610. https://doi.org/10.1021/jacs.5b04566.
- [67] G. He, S. Rapireddy, R. Bahal, B. Sahu, D.H. Ly, Strand invasion of extended, mixedsequence B-DNA by γPNAs, J. Am. Chem. Soc. 131 (2009) 12088–12090. https://doi.org/10.1021/ja900228j.
- [68] N.T.S. De Costa, J.M. Heemstra, Evaluating the Effect of Ionic Strength on Duplex Stability for PNA Having Negatively or Positively Charged Side Chains, PLoS One. 8 (2013) 2–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058670.
- [69] F.R. Bowler, J.J. Diaz-Mochon, M.D. Swift, M. Bradley, DNA analysis by dynamic chemistry, Angew. Chemie - Int. Ed. 49 (2010) 1809–1812. https://doi.org/10.1002/anie.200905699.
- [70] J.J.D.-M. M. Bradley, Nucleobase characterisation. in: PCT/GB2008/003185, 2009.

- [71] F.R. Bowler, P.A. Reid, C. Boyd, J.J. Diaz-Mochon, M. Bradley, Dynamic chemistry for enzyme-free allele discrimination in genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry, Anal. Methods. 3 (2011) 1656–1663. https://doi.org/10.1039/c1ay05176h.
- [72] S. Pernagallo, G. Ventimiglia, C. Cavalluzzo, E. Alessi, H. Ilyine, M. Bradley, J.J. Diaz-Mochon, Novel biochip platform for nucleic acid analysis, Sensors (Switzerland). 12 (2012) 8100–8111. https://doi.org/10.3390/s120608100.
- [73] M.A. Luque-González, Chem-NAT: A unique chemical approach for Nucleic Acid Testing, (2018). https://www.google.com/.
- [74] M. Angélica Luque-González, M. Tabraue-Chávez, B. López-Longarela, R. María Sánchez-Martín, M. Ortiz-González, M. Soriano-Rodríguez, J. Antonio García-Salcedo, S. Pernagallo, J. José Díaz-Mochón, Identification of Trypanosomatids by detecting Single Nucleotide Fingerprints using DNA analysis by dynamic chemistry with MALDI-ToF, Talanta. 176 (2018) 299–307. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.059.
- [75] B. López-Longarela, E.E. Morrison, J.D. Tranter, L. Chahman-Vos, J.F. Léonard, J.C. Gautier, S. Laurent, A. Lartigau, E. Boitier, L. Sautier, P. Carmona-Saez, J. Martorell-Marugan, R.J. Mellanby, S. Pernagallo, H. Ilyine, D.M. Rissin, D.C. Duffy, J.W. Dear, J.J. Díaz-Mochón, Direct Detection of miR-122 in Hepatotoxicity Using Dynamic Chemical Labeling Overcomes Stability and isomiR Challenges, Anal. Chem. 92 (2020) 3388–3395. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05449.
- [76] A. Marín-Romero, A. Robles-Remacho, M. Tabraue-Chávez, Ba. López-Longarela, R.M. Sánchez-Martín, J.J. Guardia-Monteagudo, M.A. Fara, F.J. López-Delgado, S. Pernagallo, J.J. Díaz-Mochón, A PCR-free technology to detect and quantify microRNAs directly from human plasma, Analyst. 143 (2018) 5676–5682. https://doi.org/10.1039/c8an01397g.
- [77] A. Delgado-Gonzalez, A. Robles-Remacho, A. Marin-Romero, S. Detassis, B. Lopez-Longarela, F.J. Lopez-Delgado, D. de Miguel-Perez, J.J. Guardia-Monteagudo, M.A. Fara, M. Tabraue-Chavez, S. Pernagallo, R.M. Sanchez-Martin, J.J. Diaz-Mochon, PCR-free and chemistry-based technology for miR-21 rapid detection directly from tumour cells, Talanta. 200 (2019) 51–56. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.039.

- [78] A. Marín-Romero, M. Tabraue-Chávez, J.W. Dear, R.M. Sánchez-Martín, H. Ilyine, J.J. Guardia-Monteagudo, M.A. Fara, F.J. López-Delgado, J.J. Díaz-Mochón, S. Pernagallo, Amplification-free profiling of microRNA-122 biomarker in DILI patient serums, using the luminex MAGPIX system, Talanta. 219 (2020) 121265. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121265.
- [79] S. Detassis, M. Grasso, M. Tabraue-Chávez, A. Marín-Romero, B. López-Longarela, H. Ilyine, C. Ress, S. Ceriani, M. Erspan, A. Maglione, J.J. Díaz-Mochón, S. Pernagallo, M.A. Denti, New Platform for the Direct Profiling of microRNAs in Biofluids, Anal. Chem. 91 (2019) 5874–5880. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00213.
- [80] M. Tabraue-Chávez, M.A. Luque-González, A. Marín-Romero, R.M. Sánchez-Martín, P. Escobedo-Araque, S. Pernagallo, J.J. Díaz-Mochón, A colorimetric strategy based on dynamic chemistry for direct detection of Trypanosomatid species, Sci. Rep. 9 (2019) 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39946-0.
- [81] H. Ravan, S. Kashanian, N. Sanadgol, A. Badoei-Dalfard, Z. Karami, Strategies for optimizing DNA hybridization on surfaces, Anal. Biochem. 444 (2014) 41–46. https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.09.032.
- [82] D. Irving, P. Gong, R. Levicky, DNA surface hybridization: Comparison of theory and experiment, J. Phys. Chem. B. 114 (2010) 7631–7640. https://doi.org/10.1021/jp100860z.
- [83] R. Levicky, A. Horgan, Physicochemical perspectives on DNA microarray and biosensor technologies, Trends Biotechnol. 23 (2005) 143–149. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.01.004.
- [84] Victoria Cano Cortés, Desarrollo de nanopartículas multifuncionalizadas con aplicaciones biotecnológicas en biomedicina, 2018.
- [85] R.M. Yusop, A. Unciti-Broceta, E.M.V. Johansson, R.M. Sánchez-Martín, M. Bradley, Palladium-mediated intracellular chemistry, Nat. Chem. 3 (2011) 239–243. https://doi.org/10.1038/nchem.981.
- [86] J.M. Cárdenas-Maestre, A.M. Pérez-Lõpez, M. Bradley, R.M. Sánchez-Martín, Microsphere-based intracellular sensing of caspase-3/7 in apoptotic living cells, Macromol. Biosci. 14 (2014) 923–928. https://doi.org/10.1002/mabi.201300525.

- [87] S. Li, A. Balmain, C.M. Counter, A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot, Nat. Rev. Cancer. 18 (2018) 767–777. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0076-6.
- [88] K. Rajalingam, R. Schreck, U.R. Rapp, Š. Albert, Ras oncogenes and their downstream targets, Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1773 (2007) 1177–1195. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.012.
- [89] S. Schubbert, K. Shannon, G. Bollag, Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer, Nat. Rev. Cancer. 7 (2007) 295–308. https://doi.org/10.1038/nrc2109.
- P.J. Starkey Lewis, J. Dear, V. Platt, K.J. Simpson, D.G.N. Craig, D.J. Antoine, N.S. French, N. Dhaun, D.J. Webb, E.M. Costello, J.P. Neoptolemos, J. Moggs, C.E. Goldring, B.K. Park, Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury, Hepatology. 54 (2011) 1767–1776. https://doi.org/10.1002/hep.24538.
- [91] A. Unciti-Broceta, E.M.V. Johansson, R.M. Yusop, R.M. Sánchez-Martín, M. Bradley, Synthesis of polystyrene microspheres and functionalization with pd0 nanoparticles to perform bioorthogonal organometallic chemistry in living cells, Nat. Protoc. 7 (2012) 1207–1218. https://doi.org/10.1038/nprot.2012.052.
- [92] M.T. Chevalier, J. Gonzalez, V. Alvarez, Biodegradable polymeric microparticles as drug delivery devices, IFMBE Proc. 49 (2015) 187–190. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13117-7_49.
- [93] J.J. Díaz-Mochón, L. Bialy, M. Bradley, Full orthogonality between Dde and Fmoc: The direct synthesis of PNA-peptide conjugates, Org. Lett. 6 (2004) 1127–1129. https://doi.org/10.1021/ol049905y.
- [94] R. Singh, J.W. Lillard, Nanoparticle-based targeted drug delivery, Exp. Mol. Pathol. 86 (2009) 215–223. https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004.
- [95] V.A. Hackley, J.D. Clogston, Measuring the Hydrodynamic Size of Nanoparticles, Charact. Nanoparticles Intend. Drug Deliv. 697 (2011) 35–52. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1.
- [96] V. Holzapfel, A. Musyanovych, K. Landfester, M.R. Lorenz, V. Mailänder, Preparation of fluorescent carboxyl and amino functionalized polystyrene particles by miniemulsion polymerization as markers for cells, Macromol. Chem. Phys. 206 (2005) 2440–2449. https://doi.org/10.1002/macp.200500372.

- [97] Z.L. Wang, Characterization of nanophase materials, Part. Part. Syst. Charact. 18 (2001)
 142–165. https://doi.org/10.1002/1521-4117(200110)18:3<142::AID-
 PPSC142>3.0.CO;2-N.
- [98] S. Stern, S. McNeil, A. Patri, M. Dobrovolskaia, Preclinical Characterization of Engineered Nanoparticles Intended for Cancer Therapeutics, Nanotechnol. Cancer Ther. (2006) 105– 137. https://doi.org/10.1201/9781420006636.ch7.
- [99] F. Thielbeer, E.M.V. Johansson, S. V. Chankeshwara, M. Bradley, Influence of spacer length on the cellular uptake of polymeric nanoparticles, Macromol. Biosci. 13 (2013) 682–686. https://doi.org/10.1002/mabi.201200455.
- [100] A. V. Delgado, F. González-Caballero, R.J. Hunter, L.K. Koopal, J. Lyklema, Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena, J. Colloid Interface Sci. 309 (2007) 194– 224. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.12.075.
- [101] J.D. Unciti-Broceta, V. Cano-Cortés, P. Altea-Manzano, S. Pernagallo, J.J. Díaz-Mochón, R.M. Sánchez-Martín, Number of nanoparticles per cell through a spectrophotometric method - A key parameter to assess nanoparticle-based cellular assays, Sci. Rep. 5 (2015) 1–10. https://doi.org/10.1038/srep10091.
- [102] V.K. Sarin, S.B.H. Kent, J.P. Tam, R.B. Merrifield, Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction, Anal. Biochem. 117 (1981) 147–157. https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90704-1.
- [103] G.B. Fields, R.L. Noble, Solid phase peptide synthesis utilizing 9fluorenylmethoxycarbonyl amino acids, Int. J. Pept. Protein Res. 35 (1990) 161–214. https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x.
- [104] J.G. Borger, J.M. Cardenas-Maestre, R. Zamoyska, R.M. Sanchez-Martin, Novel strategy for microsphere-mediated DNA transfection, Bioconjug. Chem. 22 (2011) 1904–1908. https://doi.org/10.1021/bc200289n.
- [105] M. Bradley, L. Alexander, K. Duncan, M. Chennaoui, A.C. Jones, R.M. Sánchez-Martín, pH sensing in living cells using fluorescent microspheres, Bioorganic Med. Chem. Lett. 18 (2008) 313–317. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.075.
- [106] R.M. Sanchez-Martin, L. Alexander, M. Muzerelle, J.M. Cardenas-Maestre, A. Tsakiridis, J.M. Brickman, M. Bradley, Microsphere-mediated protein delivery into cells, ChemBioChem. 10 (2009) 1453–1456. https://doi.org/10.1002/cbic.200900136.

- [107] R.M. Sánchez-Martín, M. Cuttle, S. Mittoo, M. Bradley, Microsphere-Based Real-Time Calcium Sensing, Angew. Chemie. 118 (2006) 5598–5600. https://doi.org/10.1002/ange.200601242.
- [108] M.V. Cano-Cortes, S.A. Navarro-Marchal, M.P. Ruiz-Blas, J.J. Diaz-Mochon, J.A. Marchal, R.M. Sanchez-Martin, A versatile theranostic nanodevice based on an orthogonal bioconjugation strategy for efficient targeted treatment and monitoring of triple negative breast cancer, Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 24 (2020) 102120. https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102120.
- [109] L. Goitre, E. Trapani, L. Trabalzini, S.F. Retta, The ras superfamily of small GTPases: The unlocked secrets, Methods Mol. Biol. 1120 (2014) 1–18. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-791-4_1.
- [110] L.Y. Tan, S.M. Walker, T. Lonergan, N.E. Lima, A.V. Todd, E. Mokany, Superior multiplexing capacity of PlexPrimers enables sensitive and specific detection of SNPs and clustered mutations in qPCR, PLoS One. 12 (2017) 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170087.
- [111] C. Jopling, Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function, RNA Biol. 9 (2012) 1–6. https://doi.org/DOI: 10.4161/rna.18827.
- [112] J. Hu, Y. Xu, J. Hao, S. Wang, C. Li, S. Meng, MiR-122 in hepatic function and liver diseases, Protein Cell. 3 (2012) 364–371. https://doi.org/10.1007/s13238-012-2036-3.
- [113] C. Coulouarn, V.M. Factor, J.B. Andersen, M.E. Durkin, S.S. Thorgeirsson, Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties, Oncogene. 28 (2009) 3526–3536. https://doi.org/10.1038/onc.2009.211.
- [114] H. Xu, J.H. He, Z.D. Xiao, Q.Q. Zhang, Y.Q. Chen, H. Zhou, L.H. Qu, Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development., Hepatology. 52 (2010) 1431–1442. https://doi.org/10.1002/hep.23818.
- [115] L.S. Howell, L. Ireland, B.K. Park, C.E. Goldring, MiR-122 and other microRNAs as potential circulating biomarkers of drug-induced liver injury, Expert Rev. Mol. Diagn. 18 (2018) 47– 54. https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1415145.

- [116] S. Thakral, K. Ghoshal, miR-122 is a Unique Molecule with Great Potential in Diagnosis, Prognosis of Liver Disease, and Therapy Both as microARN Mimic and Antimir, Curr. Gene Ther. 15 (2015) 142–150. https://doi.org/10.2174/1566523214666141224095610.
- Y. Liu, P. Li, L. Liu, Y. Zhang, The diagnostic role of miR-122 in drug-induced liver injury, Medicine (Baltimore). 97 (2018) e13478.
 https://doi.org/10.1097/md.00000000013478.
- [118] T. Kilic, M. Kaplan, S. Demiroglu, A. Erdem, M. Ozsoz, Label-Free Electrochemical Detection of MicroRNA-122 in Real Samples by Graphene Modified Disposable Electrodes, J. Electrochem. Soc. 163 (2016) B227–B233. https://doi.org/10.1149/2.0481606jes.
- [119] P.S. Laopa, T. Vilaivan, V.P. Hoven, Positively charged polymer brush-functionalized filter paper for DNA sequence determination following Dot blot hybridization employing a pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe, Analyst. 138 (2013) 269–277. https://doi.org/10.1039/c2an36133g.
- [120] A. Robles-Remacho, M.A. Luque-González, R.A. González-Casín, M.V. Cano-Cortés, F.J. Lopez-Delgado, J.J. Guardia-Monteagudo, M. Antonio Fara, R.M. Sánchez-Martín, J.J. Díaz-Mochón, Development of a nanotechnology-based approach for capturing and detecting nucleic acids by using flow cytometry, Talanta. 226 (2021). https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122092.
- [121] R. Arrigucci, Y. Bushkin, F. Radford, K. Lakehal, P. Vir, R. Pine, D. Martin, J. Sugarman, Y. Zhao, G.S. Yap, A.A. Lardizabal, S. Tyagi, M.L. Gennaro, FISH-Flow, a protocol for the concurrent detection of ARNm and protein in single cells using fluorescence in situ hybridization and flow cytometry, Nat. Protoc. 12 (2017) 1245–1260. https://doi.org/10.1038/nprot.2017.039.
- [122] D. Horejsh, F. Martini, F. Poccia, G. Ippolito, A. Di Caro, M.R. Capobianchi, A molecular beacon, bead-based assay for the detection of nucleic acids by flow cytometry., Nucleic Acids Res. 33 (2005). https://doi.org/10.1093/nar/gni015.

- S. Stolnik, B. Daudali, A. Arien, J. Whetstone, C.R. Heald, M.C. Garnett, S.S. Davis, L. Illum, The effect of surface coverage and conformation of poly(ethylene oxide) (PEO) chains of poloxamer 407 on the biological fate of model colloidal drug carriers, Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1514 (2001) 261–279. https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00376-5.
- Q.T.H. Shubhra, J. Tóth, J. Gyenis, T. Feczkó, Surface modification of HSA containing magnetic PLGA nanoparticles by poloxamer to decrease plasma protein adsorption, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 122 (2014) 529–536. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.07.025.
- [125] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, Anal. Biochem. 150 (1985) 76–85. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- [126] J. Zhang, T.L. Madden, PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation, Genome Res. 7 (1997) 649–656. https://doi.org/10.1101/gr.7.6.649.
- [127] O. Nordgård, S. Oltedal, E.A.M. Janssen, B. Gilje, H. Kørner, K. Tjensvoll, R. Smaaland, Comparison of a PNA clamp PCR and an ARMS/Scorpion PCR assay for the detection of K-ras mutations, Diagnostic Mol. Pathol. 21 (2012) 9–13. https://doi.org/10.1097/PDM.0b013e31821e59dc.
- [128] M. Van Haele, S. Vander Borght, A. Ceulemans, M. Wieërs, S. Metsu, X. Sagaert, B. Weynand, Rapid clinical mutational testing of KRAS, BRAF and EGFR: A prospective comparative analysis of the Idylla technique with high-throughput next-generation sequencing, J. Clin. Pathol. 73 (2020) 35–41. https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-205970.
- [129] M. Matsunaga, T. Kaneta, K. Miwa, W. Ichikawa, K.I. Fujita, F. Nagashima, J. Furuse, M. Kage, Y. Akagi, Y. Sasaki, A comparison of four methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed specimens from metastatic colorectal cancer patients, Oncol. Lett. 12 (2016) 150–156. https://doi.org/10.3892/ol.2016.4576.
- [130] L. Bolton, A. Reiman, K. Lucas, J. Timms, I.A. Cree, KRAS mutation analysis by PCR: A comparison of two methods, PLoS One. 10 (2015) 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115672.

- [131] S. McGinn, D. Bauer, T. Brefort, L. Dong, A. El-Sagheer, A. Elsharawy, G. Evans, E. Falk-Sörqvist, M. Forster, S. Fredriksson, P. Freeman, C. Freitag, J. Fritzsche, S. Gibson, M. Gullberg, M. Gut, S. Heath, I. Heath-Brun, A.J. Heron, J. Hohlbein, R. Ke, O. Lancaster, L. Le Reste, G. Maglia, R. Marie, F. Mauger, F. Mertes, M. Mignardi, L. Moens, J. Oostmeijer, R. Out, J.N. Pedersen, F. Persson, V. Picaud, D. Rotem, N. Schracke, J. Sengenes, P.F. Stähler, B. Stade, D. Stoddart, X. Teng, C.D. Veal, N. Zahra, H. Bayley, M. Beier, T. Brown, C. Dekker, B. Ekström, H. Flyvbjerg, A. Franke, S. Guenther, A.N. Kapanidis, J. Kaye, A. Kristensen, H. Lehrach, J. Mangion, S. Sauer, E. Schyns, J. Tost, J.M.L.M. van Helvoort, P.J. van der Zaag, J.O. Tegenfeldt, A.J. Brookes, K. Mir, M. Nilsson, J.P. Willcocks, I.G. Gut, New technologies for DNA analysis a review of the READNA Project, N. Biotechnol. 33 (2016) 311–330. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.10.003.
- [132] T.J. Treangen, S.L. Salzberg, Repetitive DNA and next-generation sequencing: Computational challenges and solutions, Nat. Rev. Genet. 13 (2012) 36–46. https://doi.org/10.1038/nrg3117.
- O.K. Tørresen, B. Star, P. Mier, M.A. Andrade-Navarro, A. Bateman, P. Jarnot, A. Gruca, M. Grynberg, A. V. Kajava, V.J. Promponas, M. Anisimova, K.S. Jakobsen, D. Linke, Tandem repeats lead to sequence assembly errors and impose multi-level challenges for genome and protein databases, Nucleic Acids Res. 47 (2019) 10994–11006. https://doi.org/10.1093/nar/gkz841.
- [134] A. De Bustos, A. Cuadrado, N. Jouve, Sequencing of long stretches of repetitive DNA, Sci.
 Rep. 6 (2016) 1–7. https://doi.org/10.1038/srep36665.
- [135] M.E. Aldrup-MacDonald, B.A. Sullivan, The past, present, and future of human centromere genomics, Genes (Basel). 5 (2014) 33–50. https://doi.org/10.3390/genes5010033.
- [136] M.E. Aldrup-MacDonald, M.E. Kuo, L.L. Sullivan, K. Chew, B.A. Sullivan, Genomic variation within alpha satellite DNA influences centromere location on human chromosomes with metastable epialleles, Genome Res. 26 (2016) 1301–1311. https://doi.org/10.1101/gr.206706.116.
- [137] A.K. Sperling, R.W. Li, Repetitive Sequences, Brenner's Encycl. Genet. Second Ed. 3 (2013)
 150–154. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01297-3.
- [138] M.A. Batzer, P.L. Deininger, Alu repeats and human genomic diversity, Nat. Rev. Genet. 3 (2002) 370–379. https://doi.org/10.1038/nrg798.

265

- H. Lu, F. Giordano, Z. Ning, Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly,
 Genomics, Proteomics Bioinforma. 14 (2016) 265–279.
 https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004.
- [140] B.A.S. Shannon M McNulty, Alpha satellite DNA biology: finding function in the recesses of the genome, 2018. https://doi.org/10.1007/s10577-018-9582-3.
- [141] V.A. Shepelev, L.I. Uralsky, A.A. Alexandrov, Y.B. Yurov, E.I. Rogaev, I.A. Alexandrov, Annotation of suprachromosomal families reveals uncommon types of alpha satellite organization in pericentromeric regions of hg38 human genome assembly, Genomics Data. 5 (2015) 139–146. https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.05.035.
- [142] E.M. Black, S. Giunta, Repetitive fragile sites: Centromere satellite DNA as a source of genome instability in human diseases, Genes (Basel). 9 (2018). https://doi.org/10.3390/genes9120615.
- K.A. Maloney, L.L. Sullivan, J.E. Matheny, E.D. Strome, S.L. Merrett, A. Ferris, B.A. Sullivan, Functional epialleles at an endogenous human centromere, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 13704–13709. https://doi.org/10.1073/pnas.1203126109.
- [144] S.M. McNulty, L.L. Sullivan, B.A. Sullivan, Human Centromeres Produce Chromosome-Specific and Array-Specific Alpha Satellite Transcripts that Are Complexed with CENP-A and CENP-C, Dev. Cell. 42 (2017) 226-240.e6. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.001.
- [145] L.L. Sullivan, K. Chew, B.A. Sullivan, α satellite DNA variation and function of the human centromere, Nucleus. 8 (2017) 331–339.
 https://doi.org/10.1080/19491034.2017.1308989.
- [146] P. Slijepcevic, Telomere length measurement by Q-FISH, Methods Cell Sci. 23 (2001) 17– 22. https://doi.org/10.1023/A:1013177128297.
- [147] A. Canela, E. Vera, P. Klatt, M.A. Blasco, High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (2007) 5300–5305. https://doi.org/10.1073/pnas.0609367104.
- [148] G.M. Baerlocher, I. Vulto, G. de Jong, P.M. Lansdorp, Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH), Nat. Protoc. 1 (2006) 2365–2376. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.263.

- [149] S. Uhrig, S. Schuffenhauer, C. Fauth, A. Wirtz, C. Daumer-Haas, C. Apacik, M. Cohen, J. Müller-Navia, T. Cremer, J. Murken, M.R. Speicher, Multiplex-fish for pre- and postnatal diagnostic applications, Am. J. Hum. Genet. 65 (1999) 448–462. https://doi.org/10.1086/302508.
- [150] F. Pellestor, P. Paulasova, M. Macek, S. Hamamah, The use of peptide nucleic acids for in situ identification of human chromosomes, J. Histochem. Cytochem. 53 (2005) 395–400. https://doi.org/10.1369/jhc.4R6399.2005.
- [151] H. Stender, PNA FISH: An intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases, Expert Rev. Mol. Diagn. 3 (2003) 649–655. https://doi.org/10.1586/14737159.3.5.649.
- G.N. Forrest, PNA FISH: Present and future impact on patient management, Expert Rev.
 Mol. Diagn. 7 (2007) 231–236. https://doi.org/10.1586/14737159.7.3.231.
- [153] J.E. Clarridge, Impact of 16S ARNr gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases, Clin. Microbiol. Rev. 17 (2004) 840–862. https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
- [154] D. Sune, H. Rydberg, Å.N. Augustinsson, L. Serrander, M.B. Jungeström, Optimization of 16S ARNr gene analysis for use in the diagnostic clinical microbiology service, J. Microbiol. Methods. 170 (2020) 105854. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105854.
- [155] R. Starke, V.S. Pylro, D.K. Morais, 16S ARNr Gene Copy Number Normalization Does Not Provide More Reliable Conclusions in Metataxonomic Surveys, Microb. Ecol. 81 (2021) 535–539. https://doi.org/10.1007/s00248-020-01586-7.
- [156] B. Williams, H. Stender, J.M. Coull, Chapter 12 PNA Fluorescent In Situ Hybridization for Rapid Microbiology and Cytogenetic Analysis Culture Identification by PNA FISH FISH has become firmly established in cytogenetics, with the vast majority of, Methods Mol. Biol. 208 (2002).
- [157] S. Zong, Z. Wang, H. Chen, Y. Cui, Assessing telomere length using surface enhanced raman scattering, Sci. Rep. 4 (2014) 1–8. https://doi.org/10.1038/srep06977.
- [158] PNABio. PNA FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Accessed April 12, (2021). https://www.pnabio.com/pdf/FISH_protocol_PNABio.pdf.
- [159] E.A. Hoffman, B.L. Frey, L.M. Smith, D.T. Auble, Formaldehyde crosslinking: A tool for the study of chromatin complexes, J. Biol. Chem. 290 (2015) 26404–26411. https://doi.org/10.1074/jbc.R115.651679.

- [160] J.H. Lee, E.R. Daugharthy, J. Scheiman, R. Kalhor, T.C. Ferrante, R. Terry, B.M. Turczyk, J.L. Yang, H.S. Lee, J. Aach, K. Zhang, G.M. Church, Fluorescent in situ sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues, Nat. Protoc. 10 (2015) 442– 458. https://doi.org/10.1038/nprot.2014.191.
- [161] R. Ke, M. Mignardi, A. Pacureanu, J. Svedlund, J. Botling, C. Wählby, M. Nilsson, In situ sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells, Nat. Methods. 10 (2013) 857– 860. https://doi.org/10.1038/nmeth.2563.
- [162] A.C. Payne, Z.D. Chiang, P.L. Reginato, S.M. Mangiameli, E.M. Murray, C.-C. Yao, S. Markoulaki, A.S. Earl, A.S. Labade, R. Jaenisch, G.M. Church, E.S. Boyden, J.D. Buenrostro, F. Chen, In situ genome sequencing resolves DNA sequence and structure in intact biological samples., Science. 908 (2020). https://doi.org/10.1126/science.aay3446.
- [163] H. Stender, B. Williams, J. Coull, PNA fluorescent in situ hybridization (FISH) for rapid microbiology and cytogenetic analysis, Methods Mol. Biol. 1050 (2014) 167–178. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-553-8_14.
- [164] F. Wang, J. Flanagan, N. Su, L.C. Wang, S. Bui, A. Nielson, X. Wu, H.T. Vo, X.J. Ma, Y. Luo, RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, J. Mol. Diagnostics. 14 (2012) 22–29. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002.
- [165] A. Baker, W. Huang, X.M. Wang, M. Jansen, X. Ma, J. Kim, C.M. Anderson, X. Wu, L. Pan, N. Su, Y. Luo, E. Domingo, T. Heide, A. Sottoriva, A. Lewis, A.D. Beggs, N.A. Wright, M. Rodriguez-justo, E. Park, I. Tomlinson, T.A. Graham, Robust RNA-based in situ mutation detection delineates colorectal cancer subclonal evolution, Nat. Commun. (1998) 1–8. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02295-5.
- [166] M. Shackleton, E. Quintana, E.R. Fearon, S.J. Morrison, Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution, Cell. 138 (2009) 822–829. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.017.
- [167] E. Hedlund, Q. Deng, Molecular Aspects of Medicine Single-cell RNA sequencing: Technical advancements and biological applications, Mol. Aspects Med. (2017). https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.07.003.
- [168] B. Hwang, J.H. Lee, D. Bang, Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines, Exp. Mol. Med. 50 (2018). https://doi.org/10.1038/s12276-018-0071-8.

- [169] F. Tang, K. Lao, M.A. Surani, Development and applications of single-cell transcriptome analysis, Nat. Methods. 8 (2011). https://doi.org/10.1038/nmeth.1557.
- [170] K. Taniguchi, T. Kajiyama, H. Kambara, Quantitative analysis of gene expression in a single cell by qPCR, Nat. Methods. 6 (2009) 503–506. https://doi.org/10.1038/nmeth.1338.
- [171] F.J. Livesey, Strategies for microarray analysis of limiting amounts of RNA, Briefings Funct.
 Genomics Proteomics. 2 (2003) 31–36. https://doi.org/10.1093/bfgp/2.1.31.
- [172] T. Stuart, R. Satija, Integrative single-cell analysis, Nat. Rev. Genet. 20 (2019) 257–272. https://doi.org/10.1038/s41576-019-0093-7.
- [173] A.P. Young, D.J. Jackson, R.C. Wyeth, A technical review and guide to RNA fluorescence in situ hybridization, PeerJ. 8 (2020) 1–27. https://doi.org/10.7717/peerj.8806.
- [174] O. Bagasra, Protocols for the in situ pcr-amplification and detection of ARNm and dna sequences, Nat. Protoc. 2 (2007) 2782–2795. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.395.
- [175] I. Gaspar, A. Ephrussi, Strength in numbers: Quantitative single-molecule RNA detection assays, Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 4 (2015) 135–150. https://doi.org/10.1002/wdev.170.
- [176] J.B. Randolph, A.S. Waggoner, Stability, specificity and fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes, Nucleic Acids Res. 25 (1997) 2923–2929. https://doi.org/10.1093/nar/25.14.2923.
- [177] M.J. Levesque, P. Ginart, Y. Wei, A. Raj, Visualizing SNVs to quantify allele-specific expression in single cells, Nat. Methods. 10 (2013) 865–867. https://doi.org/10.1038/nmeth.2589.
- [178] A. Orjalo, H.E. Johansson, J.L. Ruth, Stellaris fluorescence in situ hybridization (FISH) probes: A powerful tool for ARNm detection, Nat. Methods. 8 (2011) i–ii. https://doi.org/10.1038/nmeth.f.349.
- P. Barry, A. Vatsiou, I. Spiteri, D. Nichol, G.D. Cresswell, A. Acar, N. Trahearn, S. Hrebien,
 I. Garcia-Murillas, K. Chkhaidze, L. Ermini, I.S. Huntingford, H. Cottom, L. Zabaglo, K.
 Koelble, S. Khalique, J.E. Rusby, F. Muscara, M. Dowsett, C.C. Maley, R. Natrajan, Y. Yuan,
 G. Schiavon, N. Turner, A. Sottoriva, The spatiotemporal evolution of lymph node spread
 in early breast cancer, Clin. Cancer Res. 24 (2018) 4763–4770.
 https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3374.

- Z. Li, X. Lan, C. Li, Y. Zhang, Y. Wang, W. Xue, L. Lu, M. Jin, Z. Zhou, X. Wang, L. Li, L. Zhang,
 X. Li, X. Fu, Z. Sun, J. Wu, X. Zhang, H. Yu, F. Nan, Y. Chang, J. Yan, X. Wu, G. Wang, D.
 Zhang, Y. Zhang, K.H. Young, M. Zhang, Recurrent PDGFRB mutations in unicentric
 Castleman disease, Leukemia. 33 (2019) 1035–1038. https://doi.org/10.1038/s41375 018-0323-6.
- [181] D. Baumhoer, M. Kovac, J. Sperveslage, B. Ameline, A.C. Strobl, A. Krause, M. Trautmann,
 E. Wardelmann, M. Nathrath, S. Höller, J. Hardes, G. Gosheger, A.H. Krieg, V. Vieth, R.
 Tirabosco, F. Amary, A.M. Flanagan, W. Hartmann, Activating mutations in the MAPkinase pathway define non-ossifying fibroma of bone, J. Pathol. 248 (2019) 116–122. https://doi.org/10.1002/path.5216.
- [182] S.A.E. Marras, Y. Bushkin, S. Tyagi, High-fidelity amplified FISH for the detection and allelic discrimination of single ARNm molecules, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116 (2019) 13921–13926. https://doi.org/10.1073/pnas.1814463116.
- [183] P.M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D.C. Thomas, D.C. Ward, Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification, Nat. Genet. 19 (1998) 225–232. https://doi.org/10.1038/898.
- [184] Y. Tang, X.L. Zhang, L.J. Tang, R.Q. Yu, J.H. Jiang, In Situ Imaging of Individual ARNm Mutation in Single Cells Using Ligation-Mediated Branched Hybridization Chain Reaction (Ligation-bHCR), Anal. Chem. 89 (2017) 3445–3451. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04312.
- [185] N. Laytragoon Lewin, T. Luetragoon, B.Å. Andersson, D. Oliva, M. Nilsson, M. Strandeus, S. Löfgren, L.E. Rutqvist, F. Lewin, The influence of single nucleotide polymorphisms and adjuvant radiotherapy on systemic inflammatory proteins, chemokines and cytokines of patients with breast cancer, Anticancer Res. 39 (2019) 1287–1292. https://doi.org/10.21873/anticanres.13240.
- [186] F. Legendre, N. Cody, C. Iampietro, J. Bergalet, F.A. Lefebvre, G. Moquin-Beaudry, O. Zhang, X. Wang, E. Lécuyer, Whole mount RNA fluorescent in situ hybridization of Drosophila embryos, J. Vis. Exp. (2013) 1–8. https://doi.org/10.3791/50057.
- Y. Oka, T.N. Sato, Whole-mount single molecule FISH method for zebrafish embryo, Sci.
 Rep. 5 (2015) 1–8. https://doi.org/10.1038/srep08571.

- [188] M. Sunbul, J. Lackner, A. Martin, D. Englert, B. Hacene, F. Grün, K. Nienhaus, G.U. Nienhaus, A. Jäschke, Super-resolution RNA imaging using a rhodamine-binding aptamer with fast exchange kinetics, Nat. Biotechnol. (2021). https://doi.org/10.1038/s41587-020-00794-3.
- [189] S. Neubacher, S. Hennig, RNA Structure and Cellular Applications of Fluorescent Light-Up Aptamers, Angew. Chemie. 131 (2019) 1278–1291. https://doi.org/10.1002/ange.201806482.
- [190] U. Giesen, W. Kleider, C. Berding, A. Geiger, H. Ørum, P.E. Nielsen, A formula for thermal stability (T(m)) prediction of PNA/DNA duplexes, Nucleic Acids Res. 26 (1998) 5004–5006. https://doi.org/10.1093/nar/26.21.5004.
- [191] PNABio. PNA Tool. Accessed April 6, (2021). https://www.pnabio.com/support/PNA_Tool.htm.
- [192] E. Wienholds, W.P. Kloosterman, E. Miska, E. Alvarez-Saavedra, E. Berezikov, E. de Bruijn,
 H.R. Horvitz, S. Kauppinen, R.H. a Plasterk, MicroRNA expression in zebrafish embryonic
 development. Supporting Material, Science. 309 (2005) 310–1.
 https://doi.org/10.1126/science.1114519.
- [193] F. Dahl, J. Banér, M. Gullberg, M. Mendel-Hartvig, U. Landegren, M. Nilsson, Circle-tocircle amplification for precise and sensitive DNA analysis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 4548–4553. https://doi.org/10.1073/pnas.0400834101.
- [194] G. Kuno, Zika virus, Mol. Detect. Hum. Viral Pathog. 29 (2016) 313–320. https://doi.org/10.5206/uwomj.v85i2.4143.
- [195] D. Baud, D.J. Gubler, B. Schaub, M.C. Lanteri, D. Musso, An update on Zika virus infection, Lancet. 390 (2017) 2099–2109. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31450-2.
- [196] M.L. Landry, K. St George, Laboratory diagnosis of zika virus infection, Arch. Pathol. Lab.
 Med. 141 (2017) 60–67. https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0406-SA.
- [197] M.M. Ali, F. Li, Z. Zhang, K. Zhang, D.K. Kang, J.A. Ankrum, X.C. Le, W. Zhao, Rolling circle amplification: A versatile tool for chemical biology, materials science and medicine, Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 3324–3341. https://doi.org/10.1039/c3cs60439j.
- [198] M.G. Mohsen, E.T. Kool, The Discovery of Rolling Circle Amplification and Rolling Circle Transcription, Acc. Chem. Res. 49 (2016) 2540–2550. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00417.

- [199] L. Gu, W. Yan, L. Liu, S. Wang, X. Zhang, M. Lyu, Research progress on rolling circle amplification (Rca)-based biomedical sensing, Pharmaceuticals. 11 (2018) 1–19. https://doi.org/10.3390/ph11020035.
- [200] M. Salas, My life with bacteriophage φ29, J. Biol. Chem. 287 (2012) 44568–44579. https://doi.org/10.1074/jbc.X112.433458.
- [201] M. Salas, L. Blanco, J.M. Lázaro, M. De Vega, The bacteriophage φ29 DNA polymerase, IUBMB Life. 60 (2008) 82–85. https://doi.org/10.1002/iub.19.
- [202] K. Silander, J. Saarela, Whole genome amplification with Phi29 DNA polymerase to enable genetic or genomic analysis of samples of low DNA yield, Methods Mol. Biol. 439 (2008)
 1–18. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-188-8_1.
- [203] A.T. Christian, M.S. Pattee, C.M. Attix, B.E. Reed, K.J. Sorensen, J.D. Tucker, Detection of DNA point mutations and ARNm expression levels by rolling circle amplification in individual cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 14238–14243. https://doi.org/10.1073/pnas.251383598.
- [204] H. Liu, L. Li, L. Duan, X. Wang, Y. Xie, L. Tong, Q. Wang, B. Tang, High specific and ultrasensitive isothermal detection of microRNA by padlock probe-based exponential rolling circle amplification, Anal. Chem. 85 (2013) 7941–7947. https://doi.org/10.1021/ac401715k.
- [205] F. Akter, M. Mie, E. Kobatake, Immuno-rolling circle amplification using a multibinding fusion protein, Anal. Biochem. 416 (2011) 174–179. https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.05.004.
- [206] W. Zhao, M.M. Ali, M.A. Brook, Y. Li, Rolling circle amplification: Applications in nanotechnology and biodetection with functional nucleic acids, Angew. Chemie - Int. Ed. 47 (2008) 6330–6337. https://doi.org/10.1002/anie.200705982.
- [207] W. Xu, X. Xie, D. Li, Z. Yang, T. Li, X. Liu, Ultrasensitive colorimetric DNA detection using a combination of rolling circle amplification and nicking endonuclease-assisted nanoparticle amplification (NEANA), Small. 8 (2012) 1846–1850. https://doi.org/10.1002/smll.201200263.

- [208] M. Nilsson, H. Malmgren, M. Samiotaki, M. Kwiatkowski, B.P. Chowdhary, U. Landegren, Padlock Probes : Circularizing Oligonucleotides for Localized DNA Detection Author (s): Mats Nilsson, Helena Malmgren, Martina Samiotaki, Marek Kwiatkowski, Bhanu P. Chowdhary and Ulf Landegren Source : Science, New Series, Vol. 265, No. 5181, 265 (2016) 2085–2088.
- [209] J. Banér, M. Nilsson, M. Mendel-Hartvig, U. Landegren, Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication, Nucleic Acids Res. 26 (1998) 5073–5078. https://doi.org/10.1093/nar/26.22.5073.
- [210] W. Zhao, Y. Gao, S.A. Kandadai, M.A. Brook, Y. Li, DNA Polymerization on Gold Nanoparticles through Rolling Circle Amplification: Towards Novel Scaffolds for Three-Dimensional Periodic Nanoassemblies, Angew. Chemie. 118 (2006) 2469–2473. https://doi.org/10.1002/ange.200600061.
- [211] X.J. Kong, S. Wu, Y. Cen, R.Q. Yu, X. Chu, "Light-up" Sensing of human 8-oxoguanine DNA glycosylase activity by target-induced autocatalytic DNAzyme-generated rolling circle amplification, Biosens. Bioelectron. 79 (2016) 679–684. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.106.
- [212] R. Ke, A. Zorzet, J. Göransson, G. Lindegren, B. Sharifi-Mood, S. Chinikar, M. Mardani, A. Mirazimi, M. Nilsson, Colorimetric nucleic acid testing assay for RNA virus detection based on circle-to-circle amplification of padlock probes, J. Clin. Microbiol. 49 (2011) 4279–4285. https://doi.org/10.1128/JCM.00713-11.
- [213] L. Mahmoudian, J. Melin, M.R. Mohamadi, K. Yamada, M. Ohta, N. Kaji, M. Tokeshi, M. Nilsson, Y. Baba, Microchip electrophoresis for specific gene detection of the pathogenic bacteria V. cholerae by circle-to-circle amplification, Anal. Sci. 24 (2008) 327–332. https://doi.org/10.2116/analsci.24.327.
- [214] S. Carinelli, M. Kühnemund, M. Nilsson, M.I. Pividori, Yoctomole electrochemical genosensing of Ebola virus ADNc by rolling circle and circle to circle amplification, Biosens. Bioelectron. 93 (2017) 65–71. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.099.
- [215] B. Tian, F. Gao, J. Fock, M. Dufva, M.F. Hansen, Homogeneous circle-to-circle amplification for real-time optomagnetic detection of SARS-CoV-2 RdRp coding sequence, Biosens. Bioelectron. 165 (2020) 112356. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112356.

- [216] Y. Shi, G.F. Gao, Structural Biology of the Zika Virus, Trends Biochem. Sci. 42 (2017) 443–
 456. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.009.
- [217] S.S. Hasan, M. Sevvana, R.J. Kuhn, M.G. Rossmann, Structural biology of Zika virus and other flaviviruses, Nat. Struct. Mol. Biol. 25 (2018) 13–20. https://doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8.
- [218] D. Sirohi, R.J. Kuhn, Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors, J. Infect. Dis. 216 (2017) S935–S944. https://doi.org/10.1093/infdis/jix515.
- [219] M. Baz, G. Boivin, Antiviral agents in development for zika virus infections, Pharmaceuticals. 12 (2019). https://doi.org/10.3390/ph12030101.
- [220] D. Sirohi, R.J. Kuhn, Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors, J. Infect. Dis. 216 (2017) S935–S944. https://doi.org/10.1093/infdis/jix515.
- B. Mishra, B. Behera, The mysterious Zika virus: Adding to the tropical flavivirus mayhem,
 J. Postgrad. Med. 62 (2016) 249–254. https://doi.org/10.4103/0022-3859.191006.
- [222] A.R. Plourde, E.M. Bloch, A literature review of zika virus, Emerg. Infect. Dis. 22 (2016) 1185–1192. https://doi.org/10.3201/eid2207.151990.
- [223] S. Souf, Recent advances in diagnostic testing for viral infections, Biosci. Horizons. 9 (2016) 1–11. https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzw010.
- [224] K.S. George, B.A. Pinsky, Molecular diagnosis of Zika virus infections, Rev. Med. Microbiol.
 29 (2018) 8–16. https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000125.
- [225] B.H. Song, S.I. Yun, M. Woolley, Y.M. Lee, Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation, J. Neuroimmunol. 308 (2017) 50–64. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001.
- [226] J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh, J.W. Lee, P. Essletzbichler, A.J. Dy, J. Joung, V. Verdine, N. Donghia, N.M. Daringer, C.A. Freije, C. Myhrvold, R.P. Bhattacharyya, J. Livny, A. Regev, E. V. Koonin, D.T. Hung, P.C. Sabeti, J.J. Collins, F. Zhang, Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2, Science (80-.). 356 (2017) 438–442. https://doi.org/10.1126/science.aam9321.

- [227] T. Visnes, A. Cázares-Körner, W. Hao, O. Wallner, G. Masuyer, O. Loseva, O. Mortusewicz, E. Wiita, A. Sarno, A. Manoilov, J. Astorga-Wells, A.S. Jemth, L. Pan, K. Sanjiv, S. Karsten, C. Gokturk, M. Grube, E.J. Homan, B.M.F. Hanna, C.B.J. Paulin, T. Pham, A. Rasti, U.W. Berglund, C. Von Nicolai, C. Benitez-Buelga, T. Koolmeister, D. Ivanic, P. Iliev, M. Scobie, H.E. Krokan, P. Baranczewski, P. Artursson, M. Altun, A.J. Jensen, C. Kalderén, X. Ba, R.A. Zubarev, P. Stenmark, I. Boldogh, T. Helleday, Small-molecule inhibitor of OGG1 suppresses proinflammatory gene expression and inflammation, Science (80-.). 362 (2018) 834–839. https://doi.org/10.1126/science.aar8048.
- [228] N. Kamiyama, R. Soma, S. Hidano, K. Watanabe, H. Umekita, C. Fukuda, K. Noguchi, Y. Gendo, T. Ozaki, A. Sonoda, N. Sachi, L.R. Runtuwene, Y. Miura, E. Matsubara, S. Tajima, T. Takasaki, Y. Eshita, T. Kobayashi, Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice, Antiviral Res. 146 (2017) 1–11. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.08.007.
- [229] R.R.G. Soares, A. Pettke, A. Robles-Remacho, S. Zeebaree, S. Ciftci, M. Tampere, A. Russom, M.R. Puumalainen, M. Nilsson, N. Madaboosi, Circle-to-circle amplification coupled with microfluidic affinity chromatography enrichment for in vitro molecular diagnostics of Zika fever and analysis of anti-flaviviral drug efficacy, Sensors Actuators, B Chem. 336 (2021) 129723. https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129723.
- [230] R.R.G. Soares, J.C. Varela, U. Neogi, S. Ciftci, M. Ashokkumar, I.F. Pinto, M. Nilsson, N. Madaboosi, A. Russom, Sub-attomole detection of HIV-1 using padlock probes and rolling circle amplification combined with microfluidic affinity chromatography, Biosens. Bioelectron. 166 (2020) 1–8. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112442.
- [231] K. Ganar, M. Das, S. Sinha, S. Kumar, Newcastle disease virus: Current status and our understanding, Virus Res. 184 (2014) 71–81. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.02.016.