



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

SÍNTESIS DE UN SISTEMA DE ENTREGA DIRIGIDA  
DE NANOPARTÍCULAS DE ORO MEDIANTE LA  
TÉCNICA DE ORIGAMI DE ADN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

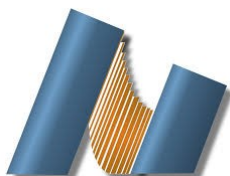
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A :

JOSÉ ELÍAS LEGORRETA CASTILLO

TUTOR DE TESIS

DR. ENRIQUE CUAHUTÉMOC SÁMANO TIRADO



ENSENADA, BAJA CALIFORNIA FEBRERO 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

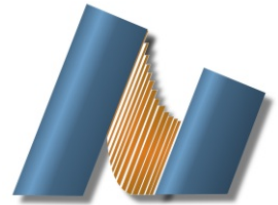
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA**



**LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA**  
**BIONANOTECNOLOGÍA**

*SÍNTESIS DE UN SISTEMA DE ENTREGA DIRIGIDA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO  
MEDIANTE LA TÉCNICA DE ORIGAMI DE ADN*

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

**PRESENTA**

JOSÉ ELÍAS LEGORRETA CASTILLO

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. ENRIQUE CUAHUTÉMOC SÁMANO TIRADO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA FEBRERO 2020

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

---

*JOSÉ ELÍAS LEGORRETA  
CASTILLO*

*A mi querido hermano Moisés.*

# Índice general

Agradecimientos	ix
Resumen	x
Abstract	xi
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2 Marco teórico</b>	<b>6</b>
2.1 Ácidos nucleicos . . . . .	6
2.1.1 Nucleótidos . . . . .	7
2.1.2 Polimerización y dirección . . . . .	8
2.1.3 Bases nitrogenadas . . . . .	8
2.1.4 La doble hélice . . . . .	9
2.1.5 Surcos . . . . .	11
2.1.6 Propiedades del ADN . . . . .	11
2.2 Técnicas de caracterización . . . . .	12
2.2.1 Electroforesis en gel de agarosa . . . . .	12
2.2.2 Microscopía de Fuerza Atómica . . . . .	14
<b>3 Antecedentes</b>	<b>17</b>
3.1 Planteamiento del problema . . . . .	25
3.2 Hipótesis . . . . .	25
3.3 Objetivos . . . . .	25
3.3.1 Objetivo general . . . . .	25

3.3.2	Objetivos específicos . . . . .	26
<b>4</b>	<b>Metodología</b>	<b>27</b>
4.1	Diseño . . . . .	27
4.1.1	Bosquejo en caDNAno . . . . .	27
4.1.2	Estabilidad en CanDo . . . . .	28
4.2	Síntesis . . . . .	28
4.2.1	Tratamiento de recocido . . . . .	29
4.2.2	Purificación . . . . .	30
4.3	Caracterización . . . . .	31
4.3.1	Electroforesis en gel de agarosa . . . . .	31
4.3.2	Microscopía de Fuerza Atómica . . . . .	31
<b>5</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>33</b>
5.1	Diseño . . . . .	33
5.2	Caracterización por gel de agarosa . . . . .	36
5.3	Caracterización por AFM . . . . .	38
<b>6</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>Referencias</b>	<b>44</b>

# Índice de figuras

2.1	Esquema de las subunidades en el ADN, se muestran también el esqueleto de azúcar fosfato, la direccionalidad de las cadenas y los puentes de hidrógeno en el ADN. . . . .	7
2.2	Estructura química de las bases nitrogenadas que componen al ADN. .	9
2.3	Esquema de la estructura helicoidal del ADN. . . . .	10
2.4	Monómeros de agarosa [adaptado de 19]. . . . .	13
2.5	Equipo básico del AFM [adaptado de 21]. . . . .	15
3.1	Estructuras formadas a partir de ADN. a) Se muestra una unión Holliday con extremos pegajosos, A y A' así como B y B' son complementarios entre sí. b) Entramado hecho a partir de múltiples uniones Holliday con extremos pegajosos complementarios. . . . .	18
3.2	Se esquematiza el intercambio recíproco y la resolución de un par de cadenas. Las barras verticales representan bases apareadas, que se conservan y generan un entrecruzamiento. . . . .	19
3.3	Isómeros del motivo DX. . . . .	19
3.4	Diagrama del autoensamble durante el recocido en el origami de ADN [adaptado de 1]. . . . .	20
3.5	Nanoestructuras elaboradas a partir de origami de ADN [1]. . . . .	21
3.6	Vista frontal del motivo 6HB. En números romanos se señalan las hélices que lo conforman. Las hélices poseen entrecruzamientos que mantienen la cohesión del motivo [adaptado de 23]. . . . .	22
3.7	“Caja” elaborada mediante origami de ADN [27]. . . . .	23



3.8	Modelo del nanorobot [29]. . . . .	24
5.1	Vista frontal del diseño de la nanoestructura en caDNAno. Se aprecia la distribución de las hélices acorde con los entrecruzamientos establecidos. La numeración corresponde a las dobles hélices correspondientes de la figura 5.2. . . . .	34
5.2	Bosquejo de la nanoestructura en caDNAno basado en el trabajo de Douglas y colaboradores [29]. Se muestra el entramado de entrecruzamientos en la nanoestructura hexagonal. En azul se muestra la secuencia del andamio, en gris se muestran las grapas y en amarillo las grapas que corresponden a los sitios de funcionalización de AuNPs. Las secuencias de los aptámeros se muestran En rojo se muestran las grapas guía que mantienen los dominios cerrados. . . . .	35
5.3	Simulación de la estabilidad de la nanoestructura en CanDo. En el inciso a) se observa la vista superior, mientras que en b) se muestra la vista frontal. . . . .	36
5.4	Gel de agarosa del recido de la nanoestructura. Los pozos se encuentran numerados como sigue: 1) Quick-Load 1kb DNA Ladder de New England BioLabs® Inc., 2) andamio p7308 a 5 nM, 3), 4) y 5) nanoestructura con 10, 20 y 40 nM de grapas respectivamente. 6), 7) y 8) duplicados de las muestras de los pozos 3, 4 y 5. La banda de las nanoestructuras se ubica a la altura de las 3 Kb. . . . .	37
5.5	Micrografía de la nanoestructura por AFM, en la imagen se exhibe una morfología parecida a las nanoestructuras esperadas. . . . .	39
5.6	Micrografía rotada de la nanoestructura por AFM. . . . .	40
5.7	Análisis seccional transversal de la nanoestructura. Se observa la micrografía en AFM y el registro de la señal de la punta del voladizo. . . . .	40
5.8	Análisis seccional longitudinal de la nanoestructura. Se observa la micrografía en AFM y el registro de la señal de la punta del voladizo. . . . .	41

# Índice de tablas

I	Volúmenes utilizados para el recocido de la nanoestructura de ADN . .	29
II	Rampa de temperatura para el recocido de la nanoestructura de ADN .	30

# Agradecimientos

Agradezco a mi mamá y a mi papá, quienes me han apoyado en esta travesía desde un principio.

A Moisés quién siempre me ayuda a ser mejor persona.

A mi familia quienes siempre me han apoyado, sin importar las circunstancias, para continuar este camino.

Al Dr. Enrique Samano por su invaluable apoyo y por permitirme llevar a cabo este proyecto. A Karen y a David por su confianza y por el apoyo brindado en el laboratorio.

A la Dra. Yanis Toledano, a la Dra. Vanessa Millán y a la Dra. Amelia Olivas por su apoyo y sugerencias.

A mis queridos amigos con quienes compartí inolvidables momentos durante la licenciatura.

Agradezco el apoyo del Proyecto PAPIIT AG1004017 por el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo.

# Resumen

El origami de ADN es una técnica de nanofabricación en la cual se pliega una secuencia monocatenaria circular de ADN denominada andamio con otras secuencias más pequeñas complementarias a distintos loci del andamio llamadas grapas. Este autoensamblable por apareamiento Watson y Crick de bases nitrogenadas de ADN produce una estructura prediseñada. Esta metodología ofrece la oportunidad de crear dispositivos de tamaño nanométrico con potenciales aplicaciones biomédicas como sistemas de entrega dirigida de fármacos.

En este trabajo, se llevó a cabo la síntesis de una nanoestructura por medio de la técnica de origami de ADN. Para ello, se acoplaron aptámeros con el potencial de ser utilizados como un sistema de reconocimiento molecular. La metodología consistió en el diseño, la síntesis, y la caracterización. Para corroborar su formación, las nanoestructuras se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa y microscopía de fuerza atómica.

# Abstract

DNA origami is a nanofabrication technique which consists of folding a single-stranded DNA molecule, called scaffold, with oligonucleotides of DNA, denominated staples, which are complementary to regions of the scaffold. The self-assembly of DNA nucleobases by Wattson-Crick base pairs yields a predesigned structure. This methodology allows the creation of nano-scaled devices with potential biomedical applications as systems for targeted drug delivery.

In the present, a nanostructure was synthesized by DNA origami. For this purpose, aptamers were coupled with potential to act as a key-lock system for molecular recognition. The methodology consisted in design, synthesis, and characterization of the nanostructure. For corroborating, the nanostructures were visualized by gel agarose electrophoresis and atomic force microscopy.

# Capítulo 1

## Introducción

El origami de ADN es una técnica empleada en la síntesis de nanoestructuras de ADN. Esta consiste en plegar una cadena sencilla de ADN, denominada andamio, a una geometría específica. Este doblamiento se logra mediante la unión complementaria al andamio de cadenas de ADN más pequeñas, denominadas “grapas”, que originan entrecruzamientos de las dobles hélices dispuestos en un patrón periódico. De esta forma la técnica de origami de ADN garantiza la producción de nanonestructuras prediseñadas de una manera sencilla con una alta precisión [1].

Las nanoestructuras creadas mediante origami de ADN se suelen acoplar con nanopartículas metálicas para utilizarse en múltiples de aplicaciones, sobre todo en microelectrónica y nanofabricación. Por ejemplo, se han diseñado nanolentes que tienen la capacidad de enfocar luz en el intervalo visible por debajo del límite de difracción clásico. También se han elaborado arreglos bidimensionales para sujetar nanopartículas a distancias específicas con el objetivo de aprovechar su efecto plasmónico. Además, pueden utilizarse para sintetizar nanoacarreadores y en el diseño de biosensores con moléculas fluorescentes [2].

Con el auge de la nanotecnología, se han diseñado nanodispositivos elaborados con base en nanomateriales con la capacidad de dirigirse a un tejido en específico y de poder detectar tumores de manera temprana. Estos dispositivos también pueden entregar agentes quimioterapéuticos al sitio donde se ubica un tumor que ven reducidos sus efectos citotóxicos en tejidos sanos [3]. Dentro de la amplia gama de nanomateriales

empleados se encuentran los nanotubos de carbono, los puntos cuánticos, los liposomas, las nanopartículas poliméricas y las nanopartículas metálicas [4].

Un tipo de nanopartículas metálicas de gran interés son las nanopartículas de oro (AuNPs). Las AuNPs poseen varias propiedades ventajosas: tienen un alto cociente entre área superficial y volumen, exhiben el fenómeno plasmón superficial de resonancia (SPR por sus siglas en inglés), su síntesis se lleva a cabo de una manera sencilla, son estables en un amplio intervalo de condiciones de temperatura, su superficie tiene un intervalo adecuado de reactividad y pueden funcionalizarse de manera múltiple [3].

En el área médica, las AuNPs encuentran aplicaciones en radiografía de rayos X como agentes de contraste y en entrega dirigida como nanoacarreadores. Su química superficial les permite ser funcionalizadas con principios activos que poseen propiedades terapéuticas tales como péptidos, cadenas de ADN y ARN de interferencia [5], Asimismo, la incorporación de biomoléculas a la superficie de las AuNPs, como el polietilenglicol (PEG), permite aumentar su biocompatibilidad [6].

Pero no solo las AuNPs se utilizan como nanoacarreadores, sino que las AuNPs por sí mismas también poseen propiedades terapéuticas. Por ejemplo, se han utilizado en terapia fotodinámica y fototérmica. Del mismo modo, se han administrado dosis de AuNPs en tumores malignos, en donde provoca el arresto de la fase de citocinesis en el ciclo celular y la formación de cuerpos binucleados que posteriormente induce a la muerte celular programada de las células de cáncer [7].

El cáncer se coloca como una de las principales causas de muerte en el mundo. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud, durante el 2018 se estimaron alrededor de 18.1 millones de casos nuevos de cáncer a nivel mundial, de los cuales 9.6 millones corresponden a casos fatales. Desafortunadamente, el panorama no se vislumbra alentador ya que la incidencia de cáncer y su mortalidad se encuentran al alza [8].

De manera convencional, para tratar el cáncer se recurre a la intervención quirúrgica, en donde se extirpa el tumor cuando se encuentra en etapas tempranas; a la radioterapia, que consiste en la exposición a altas dosis de radiación, y a la quimioterapia, en la que se realizan sesiones de dosificación sistémica de un fármaco con efectos citotóxicos. El

problema se hace patente cuando dichos agentes alcanzan tanto células sanas como células tumorales [8].

Dado que estos agentes actúan de manera no selectiva, se originan efectos adversos en tejidos sanos. Asimismo, la baja biodisponibilidad de estos agentes en circulación sistémica, implica el uso de dosis elevadas y por ende una mayor toxicidad. Esto se relaciona a una alta tasa de mortalidad en los pacientes que reciben quimioterapias como tratamiento principal contra el cáncer [9]. Bajo este panorama, se han invertido esfuerzos para desarrollar nuevos tratamientos basados en AuNP con ventajas frente a los tratamientos convencionales de quimioterapia.

Para aprovechar las propiedades farmacocinéticas de las AuNP y generar agentes farmacéuticos para su aplicación, se recurre a metodologías novedosas para optimizar su administración sistémica. Unas de estas involucran como el uso de nanoacarreadores y la entrega dirigida. El objetivo de la entrega dirigida es aumentar o facilitar la acción terapéutica, así como entregar los fármacos a su sitio de acción en una concentración y distribución que minimiza sus efectos colaterales. Para ello se requiere enlazar el agente activo a los nanoacarreadores. De esta manera, el fármaco puede ser enmascarado de tal forma que no interaccione con los tejidos sanos del organismo.

Los nanoacarreadores son estructuras constituidas con base en nanomateriales con la facultad de llevar consigo una o varias moléculas de un fármaco. Idealmente los nanoacarreadores entregan el fármaco en una tasa adecuada para maximizar su respuesta terapéutica, al aumentar la concentración del fármaco localmente en el sitio de acción. El fármaco interacciona con el tejido enfermo una vez que el nanoacarreador recibe la señal adecuada. De esta manera, se puede reducir la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos y hacer eficiente la administración de las AuNPs.

La entrega dirigida posee un enfoque pasivo y otro activo dependiendo de la manera en la que el nanoacarreador llega a su sitio de acción. La entrega dirigida pasiva aprovecha las características de los tumores que permiten una mayor acumulación de los nanoacarreadores por el efecto de permeabilidad mejorada (EPR por sus siglas en inglés) [10]. La EPR se genera por una alta irrigación sanguínea en el área tumoral que es producto de angiogénesis en dicha zona. Una vez en el sitio de acción los nanoaca-



readores tienden a esparcirse en el tumor ya que los vasos sanguíneos que los irrigan poseen un tamaño más grande de poros.

Por otro lado, en la entrega dirigida activa los nanoacarreadores son conjugados con sistemas de reconocimiento molecular que se unen a antígenos sobreexpresados únicamente en la superficie de las células diana. Para conformar tales sistemas se emplean anticuerpos u otro tipo de molécula afín que son complementarias a moléculas extracelulares presentes en la membrana plasmática de la célula tumoral [10]. El enfoque activo ofrece la posibilidad de crear nanoacarreadores sitio-dirigidos para diferentes tejidos, dependiendo del tipo de sistema de reconocimiento molecular empleado y de la señal a reconocer. El nanomaterial del cual está conformado el nanoacarreador le proporciona diferentes propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas. En este sentido, entre la gran variedad de nanomateriales el ADN se considera idóneo para construir nanoacarreadores dadas sus propiedades físicas, químicas y biológicas sobresalientes [11].

El ADN permite crear nanoestructuras a través del autoensamble de una forma sencilla y con una alta precisión, ya que es posible explotar su propiedad de complementariedad de bases nitrogenadas. Asimismo, es posible utilizar varios métodos para acoplar ADN con moléculas funcionales. Por ejemplo, el ADN puede conjugarse con AuNPs mediante un grupo tiol (-SH) que es añadido a un extremo de un oligonucleótido. Otras ventajas que poseen las nanoestructuras de ADN son tener una estructura bien definida y predecible, la posibilidad de ser internalizadas por células, estabilidad estructural bajo condiciones fisiológicas y buena biocompatibilidad [12]. En el caso de las nanoacarreadores basados en ADN se prefiere utilizar un sistema de reconocimiento molecular por medio de oligonucleótidos que aprovechen la propiedad de complementariedad para acoplarse a la nanoestructura, por ejemplo, los aptámeros.

La palabra aptámero proviene del griego *aptus* que significa “sujetar” o “unir” y de *meros* que significa “partícula” [13]. Este término hace referencia a ligandos de ribo o desoxirribonucleótidos que adoptan estructuras secundarias y son capaces de reconocer determinadas moléculas con una especificidad y afinidad comparables a los anticuerpos. Además, los aptámeros poseen características que les dan ventaja frente a los anticuerpos, tales como tener constantes de disociación en el orden de nanomolar

a picomolar, mantener una estructura estable en un amplio rango de condiciones de temperatura y la posibilidad de sintetizarse mediante métodos químicos [13].

Los aptámeros son ampliamente utilizados en reconocer antígenos expresados en la membrana plasmática de células y pueden conjugarse a las nanoestructuras de ADN de una forma simple. Es por ello que son adecuados para utilizarse como sistemas de reconocimiento molecular en el diseño de sistemas de entrega dirigida de fármacos. De este modo, en el presente trabajo se plantea diseñar, sintetizar y caracterizar una nanoestructura de ADN con un sistema de reconocimiento molecular a base de aptámeros específico para antígenos expresados en células tumorales de colon CT26. que sirva como un nanoacarreador de AuNPs con potencial aplicación como tratamiento contra el cáncer.

# Capítulo 2

## Marco teórico

### 2.1 Ácidos nucleicos

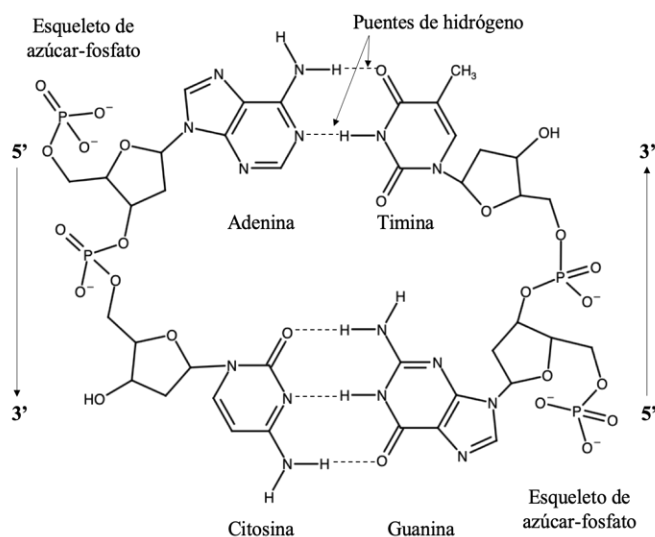
Los ácidos nucleicos son uno de los principales tipos de biomoléculas presentes en los organismos vivos. Su principal función consiste en ser el medio de transmisión de la información génica que estructura, organiza y regula las actividades vitales realizadas dentro de las células [15].

Estructuralmente los ácidos nucleicos son polímeros cuyas subunidades se denominan nucleótidos. Los nucleótidos están compuestos de tres tipos de moléculas: una pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato. En los organismos existen dos tipos de ácidos nucleicos: El ADN y el ARN. Ambos se diferencian por el tipo de pentosa presente en sus nucleótidos, el ARN posee una ribosa mientras que el ADN una desoxirribosa. Estas se distinguen la una de la otra por la presencia o ausencia de un oxígeno en el carbono 2' respectivamente [14]. En la figura 1, se puede apreciar la estructura de las subunidades del ADN enlazadas.

El papel que desempeñan ambos tipos de ácidos nucleicos es distinto. El ADN es encargado de contener y transmitir la información génica a través de generaciones sucesivas de organismos vivos mediante su replicación y herencia. Asimismo, pequeños cambios o variaciones dentro de la molécula posibilitan la adaptación de los organismos a diferentes condiciones ambientales, por medio de mecanismos de evolución y selección natural. No obstante, la información codificada en el ADN es de vital importancia para

la célula, por lo que esta ha desarrollado estrategias de reparación con el objetivo de corregir la mayor cantidad errores que se susciten [15].

Por otra parte, el ARN posee un múltiples funciones, que incluyen el uso de la información codificada en el ADN por medio de los procesos de transcripción y traducción, el transportar los aminoácidos a la cadena polipeptídica durante la síntesis proteica y el regular la expresión génica entre muchas otras. Esta versatilidad es debida en gran parte a que el ARN es más pequeño y posee una vida media más efímera en comparación con el ADN [15]; por esta razón, el ADN es estructuralmente más estable que el ARN lo que posibilita su empleo como componente en nanoestructuras.



**Figura 2.1.** Esquema de las subunidades en el ADN, se muestran también el esqueleto de azúcar fosfato, la direccionalidad de las cadenas y los puentes de hidrógeno en el ADN.

### 2.1.1 Nucleótidos

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los componentes de los nucleótidos es una pentosa, que en el ADN es una 2'-desoxi-D-ribosa en conformación de anillo de 5 miembros denominada -furanosa. En solución acuosa, la desoxirribosa no es una molécula plana, sino que tiende a adquirir conformaciones fruncidas en donde uno de sus átomos está ligeramente fuera del plano del resto de los carbonos que conforman la molécula. La desoxirribosa se une con la base nitrogenada en el carbono 1' por un

enlace N-glicosilo, mientras que la desoxirribosa y el fosfato se unen mediante una esterificación en el carbono 5' [14].

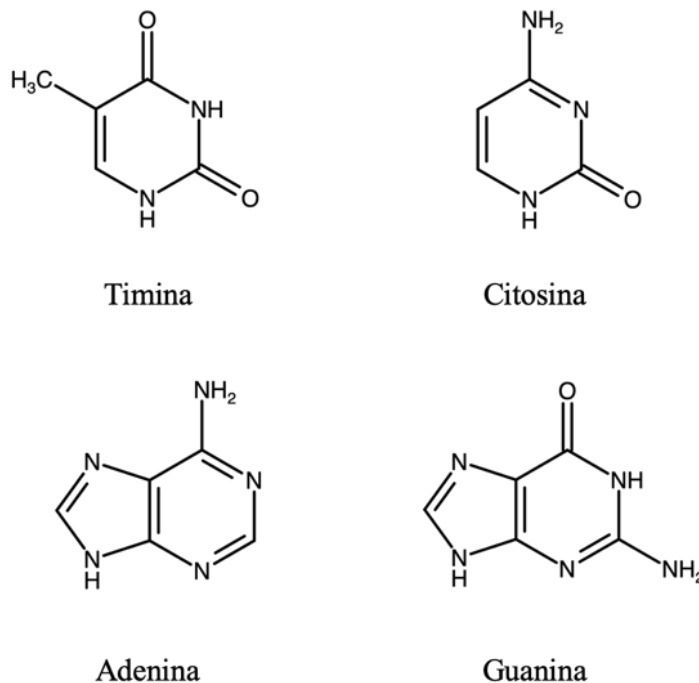
### 2.1.2 Polimerización y dirección

Los grupos fosfato le brindan la carga negativa al ADN y proveen la energía necesaria para polimerizar la molécula. Durante la polimerización, los nucleótidos trifosfatados sufren una hidrólisis, en donde un grupo pirofosfato actúa como grupo saliente y el grupo fosfato remanente en el carbono 5' forma un enlace fosfodiéster con el carbono 3' de un nucleótido aledaño. Mediante la formación de enlaces fosfodiéster entre unidades individuales o cadenas de nucleótidos, se puede conformar cadenas de ADN de hasta miles de millones de pares de nucleótidos de longitud [15].

La reacción de polimerización siempre ocurre en el extremo cuyo nucleótido tiene disponible su carbono 3', ya que es necesaria la hidrólisis de un pirofosfato de un nucleótido con un trifosfato en el carbono 5'; por ende, el crecimiento de las cadenas de ADN es en dirección de 5' a 3' [14]. Esta dirección se toma, por convención, para la lectura de la secuencia que poseen las cadenas de ADN. La secuencia de una cadena de ácidos nucleicos está dada por el orden de las bases nitrogenadas que contienen los nucleótidos cuando esta es leída en dirección de 5' a 3' [15].

### 2.1.3 Bases nitrogenadas

Las bases nitrogenadas son moléculas aromáticas heterocíclicas. Existen 4 diferentes tipos de bases nitrogenadas en el ADN: adenina (A), guanina (G), citosina (c) y timina (T). Estas se clasifican de acuerdo al número de anillos aromáticos que poseen: las purinas A y G contienen un par de anillos concatenados en forma de hexágono y pentágono, mientras que las pirimidinas C y T contienen un solo anillo hexagonal, las estructuras de las bases nitrogenadas se puede apreciar en la figura 2.2. Asimismo, la A forma dos puentes de hidrógeno con la T, mientras que la G forma tres con la C, originando así un tipo de apareamiento denominado Wattson-Crick. Un esquema de los puentes de hidrógeno formados en el ADN, se aprecia en la figura 2.1 [14].



**Figura 2.2.** Estructura química de las bases nitrogenadas que componen al ADN.

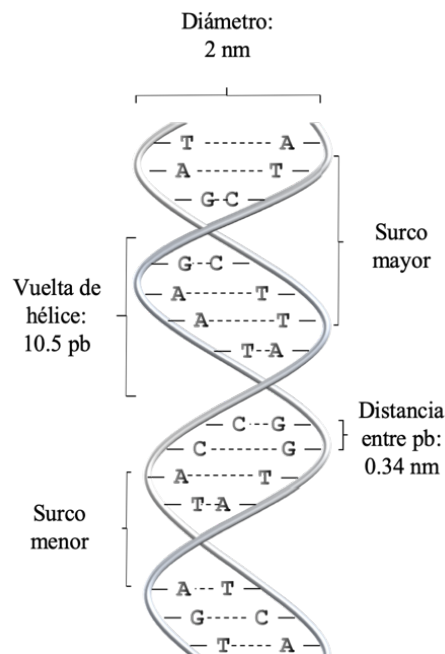
El ADN, en solución acuosa, puede encontrarse en cadena sencilla (ssADN) o hibridado en cadena doble (dsADN). Los puentes de hidrógeno permiten que dos cadenas puedan unirse mediante un proceso específico denominado hibridación. Únicamente los pares de bases (pb) que forman puentes de hidrógeno AT y GC son complementarios entre sí, lo cual ocasiona que solo puedan hibridar las cadenas cuyas secuencias son complementarias. Un par de cadenas complementarias con dirección antiparalela que se encuentran enlazadas en su centro mediante puentes de hidrógeno conforman una doble hélice [14].

#### 2.1.4 La doble hélice

La estructura doble hélice en el ADN fue deducida en las investigaciones de James Wattson y Francis Crick, quienes gracias a los trabajos de Rosalind Franklin en cristalografía de ADN, lograron averiguar la estructura que adopta el ADN dentro de las células. Su descubrimiento fue un hito en el campo de las ciencias biológicas y abrió la puerta a las investigaciones en biología molecular, que cambiaron el paradigma de

estudio de la biología durante la segunda mitad del siglo XX.

En la doble hélice las bases nitrogenadas se apilan en el centro, de tal forma que los planos donde se encuentran los pares de bases rotan un ángulo con respecto a los pares aledaños. Este desfase produce una estructura helicoidal dextrógira, es decir, el ángulo de giro va en sentido antihorario si se recorre la doble hélice de abajo para arriba [14].



**Figura 2.3.** Esquema de la estructura helicoidal del ADN.

La estructura helicoidal del ADN posee 3 variantes denominadas formas A, B y Z. La forma A se encuentra bajo condiciones de alta salinidad y posee una distancia de separación menor entre bases, mientras que la forma Z tiene una distancia mayor entre pares de bases y se obtiene en repeticiones alternantes de G y C. La forma B se encuentra bajo condiciones fisiológicas y posee las siguientes características: la hélice posee 10.44 pb por giro, la distancia entre pb es de 0.33 nm y su diámetro es de 2 nm [16]. Cabe señalar que a diferencia de las formas A y B que son dextrógiras, la forma Z es levógira.

### 2.1.5 Surcos

Los surcos juegan un papel importante en la interacción entre el ADN y los cationes disueltos en solución. Los surcos se forman debido a que los enlaces glucosídicos flanquean un par de ángulos, uno de  $145^\circ$  y otro de  $245^\circ$  aproximadamente. Esta característica produce espacios entre el esqueleto que se denominan surco mayor y surco menor y exponen las bases al medio acuoso [17].

El surco menor tiene una densidad de carga negativa mayor que el surco mayor, puesto que las cargas están más cerca la una de la otra en dichas zonas; por lo tanto, se presume que el surco menor es el sitio donde los cationes en solución interactúan con el ADN [18]. Esta interacción origina un fenómeno que neutraliza la carga que se denomina *apantallamiento*, dicho fenómeno es fundamental para evitar repulsiones electrostáticas entre los fosfatos y permite a la cadena de ADN plegarse a una geometría preestablecida [18].

### 2.1.6 Propiedades del ADN

La naturaleza aromática de las bases nitrogenadas confiere al ADN de características como la deslocalización de los electrones que origina interacciones  $\pi - \pi$  de apilamiento y la absorción de luz en el UV. Las interacciones  $\pi - \pi$  de apilamiento y la repulsión electrostática del esqueleto de fosfatos le proporcionan rigidez a la doble hélice de ADN [18]. Por otra parte, el ADN tiene una absorción característica en el UV a los 260 nm que puede cambiar si transita entre un estado bicatenario y monocatenario. Cuando el ADN bicatenario se desnaturaliza y sus cadenas se separan, se llega a un estado de hipercromicidad donde la amplitud de absorción aumenta. En cambio, si el ADN monocatenario es hibridado para formar una doble cadena, se pasa a un estado de hipocromicidad con una amplitud de absorción reducida. Este comportamiento es muy útil para monitorear la desnaturalización del ADN en tiempo real [18].

Por otro lado, el núcleo de bases nitrogenadas está rodeado por un esqueleto de fosfatos y pentosas de carácter hidrofílico. Las bases nitrogenadas son hidrofóbicas y presentan interacciones de apilamiento que involucran fuerzas de van der Waals y dipolo-



dipolo, éstas posicionan los planos de las bases de manera paralela a lo largo de la hélice. La principal fuerza impulsora que estabiliza la doble hélice son las interacciones no electrostáticas que producen el apilamiento de las bases [19]. El apilamiento minimiza las interacciones de las bases con el agua y estabiliza la estructura terciaria de los ácidos nucleicos. En un estudio se comparó el papel de los puentes de hidrógeno y del apilamiento de bases en la estabilidad de la doble hélice siendo la contribución del apilamiento mucho mayor [20].

Ahora bien, los puentes de hidrógeno ofrecen estabilidad a la doble hélice en un pequeño intervalo de temperatura. Si se aumenta la temperatura hasta cierto punto, los puentes de hidrógeno se rompen provocando la separación de las cadenas, a este proceso se le denomina desnaturalización y la temperatura a la que ocurre se le llama temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ). Esta varía dependiendo de la secuencia de las cadenas, una secuencia abundante en repeticiones de GC, con mayor cantidad de puentes de hidrógeno, posee una  $T_m$  mayor [17].

Otros factores que afectan la estabilidad de la doble hélice es el pH y la concentración de cationes en solución. Los cationes monovalentes como el  $\text{Na}^+$  aumentan la estabilidad de la cadena al incrementar la  $T_m$ . Asimismo, los pH ácidos protonan las bases, mientras que los pH básicos las desprotonan afectando así a los grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno. Por lo tanto, es preferible mantener condiciones neutras de pH para no interferir en la hibridación de moléculas de ADN [18]. A continuación, se discuten un par de técnicas empleadas en la caracterización de ADN.

## 2.2 Técnicas de caracterización

### 2.2.1 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis es una técnica de separación basada en el movimiento de partículas cargadas en un medio, bajo la influencia de un campo eléctrico. Es ampliamente utilizada para la caracterización de proteínas y ácidos nucleicos por peso molecular. Las separaciones electroforéticas simples pueden realizarse ya sea de manera horizontal o

vertical. El equipo básico de electroforesis consiste en una cámara que contiene un par de electrodos en extremos opuestos, en donde se coloca un gel elaborado a base de un polímero ya sea de agarosa o poliacrilamida. El gel se sumerge en la solución amortiguadora y la muestra se coloca en unos pozos localizados en un extremo del gel [21].

Las partículas cargadas negativamente migran hacia el ánodo, mientras que las partículas cargadas positivamente migran hacia el cátodo. La carga neta determina la fuerza o la velocidad a la cual estas moléculas se desplazarán, y posteriormente puede ser observado bajo luz UV mediante una tinción. El Bromuro de Etidio (EtBr) es un compuesto utilizado ampliamente como tinción que se intercala en las bases y genera una fluorescencia si se expone a luz UV [21].

El gel empleado en la electroforesis está conformado por subunidades interconectadas de un polímero lineal que forma una matriz porosa como si se tratase de un tamiz a nivel molecular. Uno de los polímeros más empleados es la agarosa, que es un polisacárido lineal proveniente del agar, que consiste en subunidades repetidas de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa [21]. La estructura de los monómeros de agarosa se aprecia en la figura 2.4.

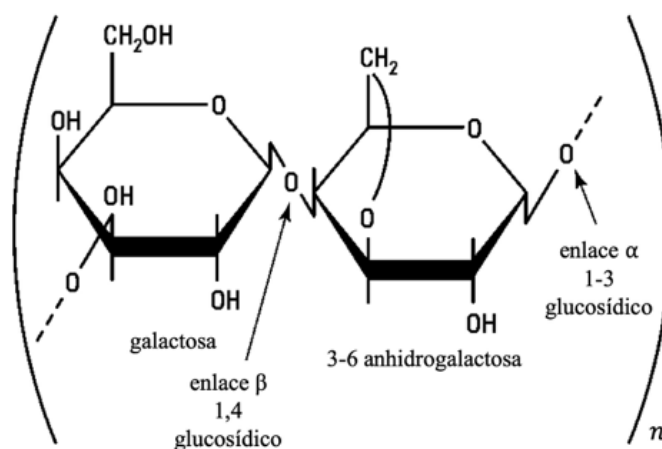


Figura 2.4. Monómeros de agarosa [adaptado de 19].

Para preparar el gel, la agarosa en polvo se mezcla con la solución amortiguadora de electroforesis a concentraciones de 0.5 a 3.0 de porcentaje en peso sobre volumen

(w/V). La mezcla se calienta y se remueve hasta disolver la agarosa, se vierte en una placa de vidrio y se deja enfriando para que se forme el gel [21].

La gelificación se produce por la formación de puentes de hidrógeno entre las subunidades de agarosa, lo que resulta en la formación de poros. El tamaño de poro es controlable ya que depende de la concentración de agarosa; a mayor concentración se forman poros más pequeños. La concentración de agarosa se ajusta dependiendo del tamaño de poros requerido en el gel, esto es muy útil para separar moléculas de un tamaño específico.

El tamaño de la molécula brinda resistencia a la movilidad debida a la fricción con el entramado del gel. Las moléculas más grandes tienen una migración más lenta. Del mismo modo, la forma de la molécula afecta su movilidad a través del tamiz molecular, por ejemplo, el ADN lineal migra a menor velocidad que el ADN circular [21]. Por último, la movilidad aumenta dependiendo del voltaje aplicado. Voltajes altos tienen una limitante práctica puesto que provocan que el gel se desgelifique en menos tiempo, por ello mientras el gel se corre es necesario un sistema de refrigeración para mantener el equipo y la muestra a bajas temperaturas.

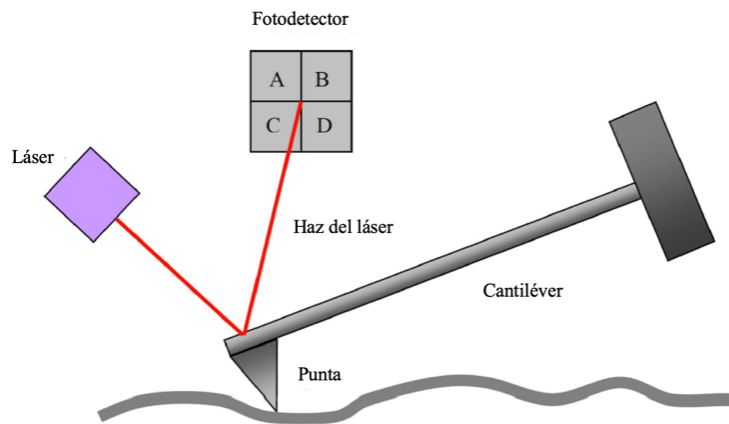
### 2.2.2 Microscopía de Fuerza Atómica

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) es una técnica de microscopía que se utiliza en la caracterización topográfica de superficies. El AFM adquiere información aprovechando las fuerzas que los átomos de la muestra ejercen sobre la punta de un voladizo. El origen de estas fuerzas es principalmente del tipo de Van der Waals y dependen de la separación entre la muestra y la punta [22]. En 1986, Binnig, Quate y Berger produjeron el primer AFM [22].

El AFM se basa en el principio de escanear con la punta de un voladizo sobre la superficie de una muestra, de manera homóloga a un dedo que siente la textura de un área que pasa rosando. Así, se obtiene una imagen de la topología mediante el registro de la posición vertical  $z$  como función de la posición lateral  $xy$ .

Un láser se encuentra proyectando un haz sobre la parte posterior de la punta del voladizo, de tal modo que el láser es reflectado hacia un fotodetector con cuatro

cuadrantes, tal y como se muestra en la figura 2.5. Idealmente, cuando el voladizo se encuentra en una posición de equilibrio, el haz reflejado incide justo sobre el punto central del fotodetector, que coincide con el punto de convergencia de los cuadrantes. Así, si se genera una desviación en el voladizo, producida por la interacción de la punta con una muestra, el haz reflejado se mueve de su posición de equilibrio y el fotodetector es capaz de identificar este movimiento, registra esta señal y forma una imagen de la muestra. El escaneo se realiza con una precisión subatómica gracias a dispositivos piezoeléctricos que controlan los movimientos en cada uno de los ejes.



**Figura 2.5.** Equipo básico del AFM [adaptado de 21].

El AFM supera una limitación del Microscopio de Efecto Túnel en donde la muestra tiene que ser lo suficientemente conductora como para generar una corriente de túnel y así el microscopio pueda adquirir información [22]. Ahora bien, el AFM posee tres tipos principales de operación: el modo contacto, el modo no contacto y el modo intermitente o *“tapping”*. En el modo de contacto, la punta del AFM se encuentra en contacto continuo con la muestra y debido a la cercanía de la punta, la muestra ejerce fuerzas de repulsión sobre la punta. Este modo de operación es recomendable para muestras con superficie lisa y resistente [23].

En el modo de no contacto, la punta del AFM es puesta a oscilar cerca de su frecuencia de resonancia a una distancia de la muestra en donde gobiernan las fuerzas de atracción [23]. Este modo se emplea para contadas aplicaciones, sobre todo para la caracterización de superficies hidrofóbicas.

Finalmente, en el modo intermitente o “*tapping*” la punta del AFM es puesta a oscilar a una frecuencia cercana a su frecuencia de resonancia, de tal forma que la frecuencia es amortiguada a medida que la punta entra en contacto con la muestra [23], así la punta está en contacto con la muestra en pequeños intervalos de tiempo, mientras la punta se acerca y se aleja de manera oscilatoria. Este modo, es adecuado para materiales “suaves” como es el caso del ADN, ya que se evita dañar la muestra producida por un contacto intensivo de la punta de un voladizo. Por ello, en el presente trabajo se realizará la caracterización de las nanoestructuras de ADN utilizando electroforesis en gel de agarosa y mediante AFM en modo intermitente.

# Capítulo 3

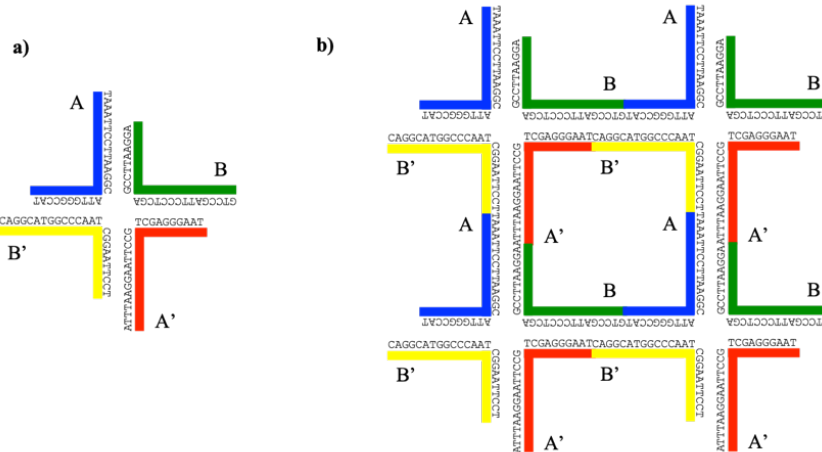
## Antecedentes

La nanotecnología estructural del ADN es un campo fundado por el bioquímico estadounidense Nadrian Seeman a principios de la década de los 80. En ese entonces, él intentaba cristalizar ácidos nucleicos en patrones periódicos y para ello empleó las uniones Holliday y los extremos pegajosos para mantener unidas múltiples hebras de ADN [17].

Los extremos pegajosos son regiones en donde una doble hélice de ADN pasa a conformarse como cadena sencilla dado que las cadenas tienen diferente longitud, ocasionando que la última parte de una cadena quede sin hibridar. Si los extremos pegajosos de diferentes dobles hélices son complementarios, al hibridar estos es posible concatenar múltiples dobles hélices, así como se observa en la figura 3.1.

Por otra parte, la unión Holliday es un intermediario generado durante la recombinación genética en los organismos vivos, en donde cuatro cadenas de ADN se hibridan para formar cuatro brazos o dobles hélices. La región de esta estructura en donde se unen los brazos o hélices se denomina entrecruzamiento como se puede apreciar en la figura 3.1.

Las uniones Holliday conforman una unidad rígida y con la adición de extremos pegajosos en las puntas de los brazos es posible adherir varias unidades para formar estructuras más complejas. La flexibilidad de estas uniones ha propiciado la formación de uniones de 3, 4, 6, 8 o hasta 12 brazos y la formación de objetos en 3D como cubos y octaedros [1]. Posteriormente se comenzó a emplear otra forma para generar

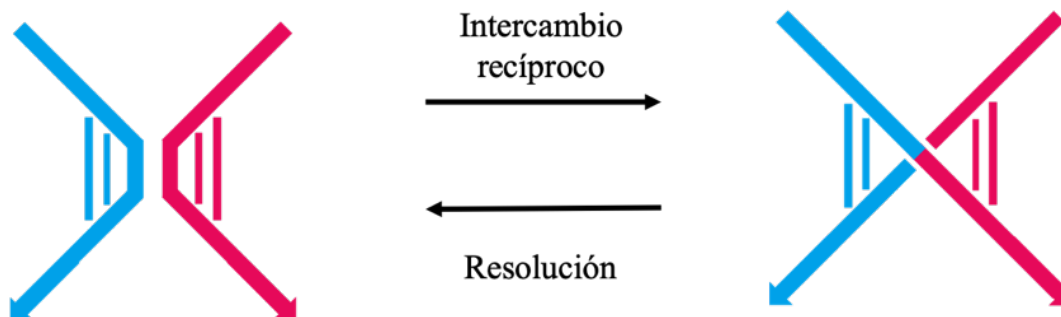


**Figura 3.1.** Estructuras formadas a partir de ADN. a) Se muestra una unión Holliday con extremos pegajosos, A y A' así como B y B' son complementarios entre sí. b) Entramado hecho a partir de múltiples uniones Holliday con extremos pegajosos complementarios.

e interconectar unidades rígidas de ADN mediante procesos que implican el corte y empalme de cadenas de ADN. Estos procesos consisten en el intercambio recíproco entre dobles hélices y su resolución.

El intercambio recíproco es un proceso que ocurre durante la recombinación genética de los organismos vivos y consiste en el intercambio de secuencias homólogas entre dos cadenas de ADN. En dicho proceso, un par de cadenas homólogas se escinden en determinados puntos de la cadena, y los extremos se vuelven a unir de tal forma que las secuencias homólogas terminan en la cadena opuesta. El proceso inverso al intercambio recíproco se denomina resolución y consiste en escindir y unir las cadenas de ADN de tal forma que los segmentos que pertenecen a la otra cadena se vuelven a juntar, restaurando así las cadenas originales [17]. Una representación de ambos procesos se ilustra en la figura 3.2.

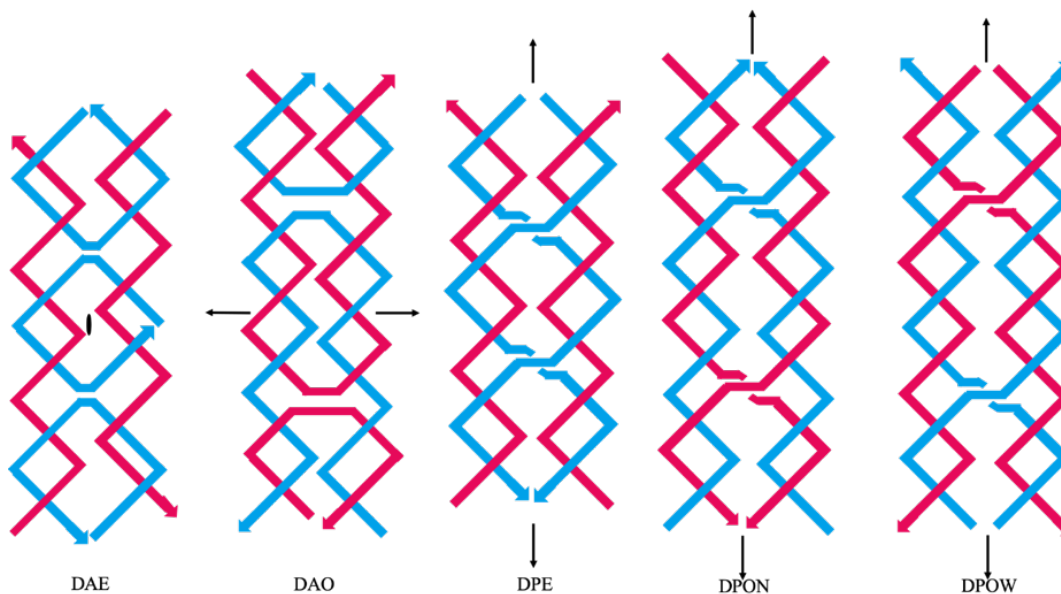
Mediante el intercambio recíproco fue posible formar entrecruzamientos de dobles hélices de forma periódica, formando así estructuras con la suficiente rigidez para generar entramados en 2 dimensiones. En este caso, la unidad rígida empleada es el motivo DX o *double crossover* [1]. El motivo DX consiste en un par de dobles hélices con un par de entrecruzamientos separados en múltiplos de media vuelta de hélice. Se ha visto que la rigidez proporcionada por el motivo DX es la apropiada para ser empleado en



**Figura 3.2.** Se esquematiza el intercambio recíproco y la resolución de un par de cadenas. Las barras verticales representan bases apareadas, que se conservan y generan un entrecruzamiento.

arreglos periódicos y en dispositivos nanomecánicos [17].

Las moléculas DX se clasifican de acuerdo al espaciamiento entre entrecruzamientos y a la direccionalidad de sus cadenas. Así, para denotar los tipos de moléculas DX se añade una E si los múltiplos son pares y una O si son impares, y si las cadenas con entrecruzamientos paralelas se añade una P o una A si son antiparalelas. De esta forma, es posible conformar un total de 5 isómeros de las moléculas DX denominadas DAE, DAO, DPE, DPON y DPOW, en estos dos últimos casos, la N y la W hacen referencia a la distancia entre los entrecruzamientos cuando es equivalente a un surco mayor (W) o un surco menor (N). No obstante, de estos isómeros se ha encontrado que el motivo DAE es el más estable y apto para la construcción de redes de ADN [18].



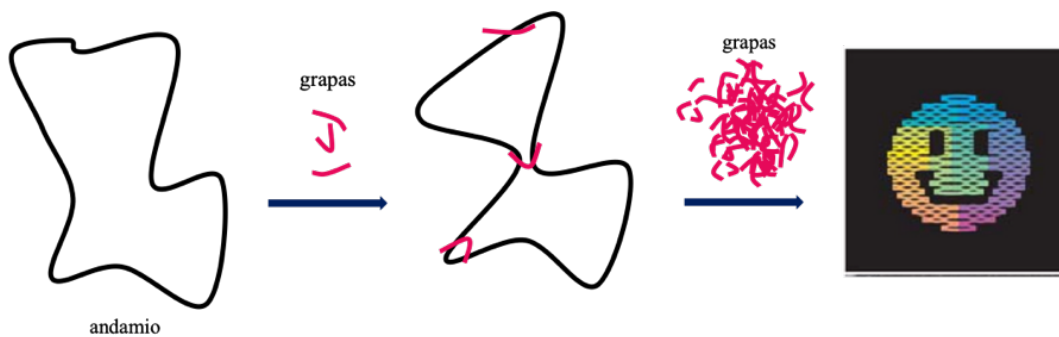
**Figura 3.3.** Isómeros del motivo DX.



Ahora bien, al definir las secuencias de las cadenas y al combinar diferentes secuencias de procesos de intercambio recíproco, es posible generar una gran variedad de estructuras a partir de ADN de forma consistente, programable y precisa [17]. No obstante, se comenzó a explorar nuevos enfoques de síntesis que pudiesen explotar al máximo las propiedades de complementariedad, autoensamble y programabilidad de las cadenas de ADN. Por ejemplo, para hacer que las propias cadenas de ADN dirijan el plegamiento de la nanoestructura.

Uno de los primeros trabajos enfocados en al autoplegamiento de las cadenas fue el realizado por Shih y colaboradores en 2004, en el cual se sintetizó un octaedro a partir de motivos DAE [24]. En este trabajo se logró que una cadena pesada se autoplegara mediante la adición de 5 oligonucleótidos, seguido por reacciones de desnaturalización y de enfriamiento. El trabajo de Shih y colaboradores demostró que era posible el autoplegamiento de las nanoestructuras de ADN de una manera programable [24].

Posteriormente Paul Rothemund en 2006, introdujo la técnica de origami de ADN, y con ello una metodología basada en el diseño de un arreglo geométrico en 2D elaborado a partir de la secuencia del fago M13p18 que es plegada con la adición de cadenas complementarias más pequeñas y procesos de recocido, como se ilustra en la figura 3.4.

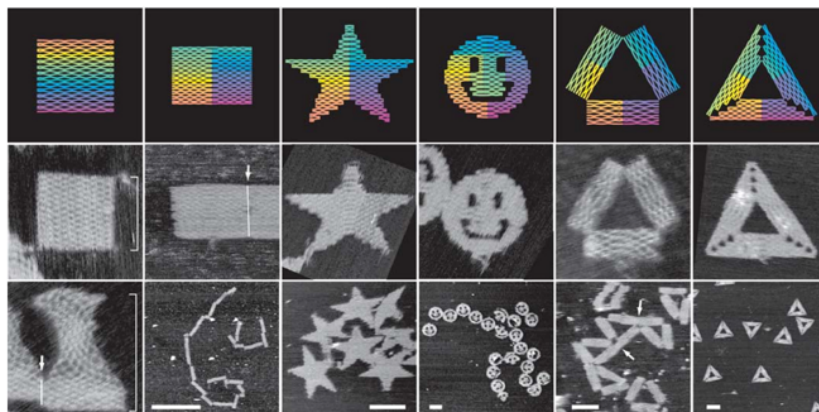


**Figura 3.4.** Diagrama del autoensamble durante el recocido en el origami de ADN [adaptado de 1].

De manera general, la metodología empleada por Rothemund crea arreglos periódicos del motivo DX y consta de los siguientes pasos. Primero, se define la geometría de la nanoestructura y se adapta el largo y la distribución de las hélices de acuerdo a la forma del diseño. Posteriormente se pliega el andamio de tal modo que pase por las hélices y se forme una especie de costura de entrecruzamientos en el centro. Una vez

obtenida la forma base de la estructura se generan las grapas que son complementarias a las distintas regiones del andamio, de tal forma que se produzcan los entrecruzamientos requeridos entre hélices. Por último, se hace la optimización de las grapas y se minimiza la torsión en el andamio [1].

El origami de ADN trajo consigo ventajas respecto a los métodos convencionales para sintetizar nanoestructuras de ADN. Por ejemplo, no es necesaria una estequiometría precisa de las grapas componentes sino que se emplea un exceso de las mismas. De esta forma se simplifica en gran medida la síntesis al añadir todos los componentes de una sola vez, además se eliminan los pasos intermedios de purificación durante la síntesis [17]. El origami de ADN ha facilitado en gran medida la formación de nanoestructuras de ADN con aplicaciones en ensamble supramolecular, ingeniería biomédica y nanofabricación [18]. El siguiente paso sería aplicar la misma estrategia para crear nanoestructuras en 3D.

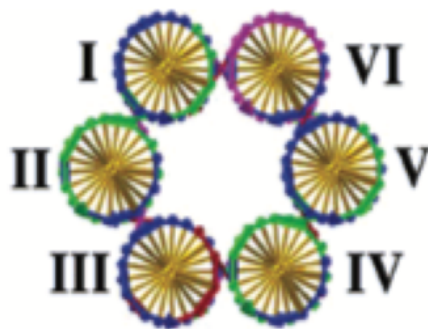


**Figura 3.5.** Nanoestructuras elaboradas a partir de origami de ADN [1].

Paul Rothemund logró sintetizar nanoestructuras en dos dimensiones con geometrías sencillas como estrellas o caritas sonrientes como se observa en la figura 3.5. El motivo DX empleado para la creación de estructuras en 2D, ubican el arreglo de las hélices en un solo plano. Por lo tanto, para crear nanoestructuras en 3D se requirió de un motivo cuyos componentes se ubicaran en planos oblicuos, como es el caso del motivo 6HB. El motivo 6HB fue sintetizado por Mathieu y colaboradores en 2005 [25], consiste en 6 hélices, cada una rotada  $120^\circ$  con respecto al par aledaño que se encuentran ordenadas de manera hexagonal en un paquete hueco, un esquema de esta estructura puede apreciarse

en la figura 3.6.

En 2009, Douglas y colaboradores emplearon el motivo 6HB y exploraron su estabilidad mecánica al agregar deleciones e inserciones en secuencias para modificar el nivel de torsión y el ángulo de giro de los paquetes [26] y utilizaron un programa CAD denominado caDNAno para sintetizar las nanoestructuras utilizando origami de ADN.



**Figura 3.6.** Vista frontal del motivo 6HB. En números romanos se señalan las hélices que lo conforman. Las hélices poseen entrecruzamientos que mantienen la cohesión del motivo [adaptado de 23].

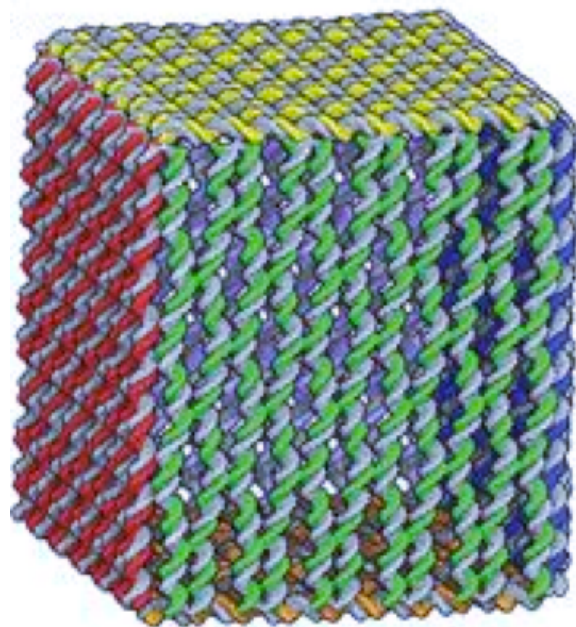
Un programa de licencia libre dedicado al diseño de estructuras de origami de ADN en 2 y 3 dimensiones es caDNAno. En este programa, el andamio se utiliza como base para diseñar la nanoestructura y se organiza a modo de ráster con entrecruzamientos en hélices aledañas.

El programa caDNAno, cuenta con 2 modos: el patrón *square lattice* y el patrón *honeycomb* para diseñar nanoestructuras de ADN en 2 y 3 dimensiones respectivamente. La diferencia entre ambos modos, es el patrón de los entrecruzamientos. En *square lattice*, los entrecruzamientos se ubican en patrones de 8 bases y los entrecruzamientos entre el mismo par de hélices se repiten cada 32 pb, este patrón representa 3/4 de vuelta de hélice [2].

En *honeycomb*, el patrón de entrecruzamientos utiliza el mismo patrón de entrecruzamientos que el motivo 6HB. Los 7 pb representan 2/3 de vuelta de la hélice o 240° de giro. Por lo tanto, este patrón considera 10.5 pb por vuelta de la hélice. Dicho valor es cercano a los 10.44 pb de la forma B del ADN, de modo que la torsión de las moléculas de ADN es mínima. Además, los entrecruzamientos se repiten cada 21 pb en el mismo par de cadenas [2]. Una vez finalizado el trabajo en caDNAno, este genera un archi-

vo con las grapas correspondientes según el diseño de la nanoestructura, el andamio empleado y el patrón de entrecruzamientos deseado. Ahora bien, es posible verificar la estabilidad de la nanoestructura, previo a la obtención del material, con apoyo de otro software denominado CanDo. Este programa desarrollado por Kim y colaboradores, simula la estructura de los origamis de ADN mediante el método de elemento finito geométrico no lineal [27]. CanDo considera a la doble hélice de ADN como una varilla elástica homogénea, en la cual el movimiento está restringido por los entrecruzamientos con hélices aledañas y cuyos parámetros se toman de fuentes experimentales [27].

Con el auge de la técnica de origami de ADN, no solo se realizaron nanoestructuras rígidas en 2 y 3 dimensiones, sino que también se comenzó a diseñar nanodispositivos que pudieran cambiar de conformación en respuesta a una señal específica. Por ejemplo, en 2009 Andersen y colaboradores realizaron por primera vez la síntesis de una caja de ADN con una tapa que funciona como una compuerta lógica tipo AND, un modelo de la caja se puede apreciar en la figura 3.7.



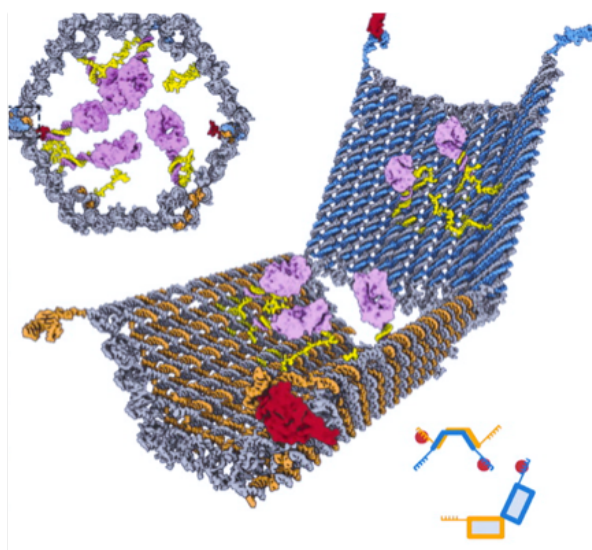
**Figura 3.7.** “Caja” elaborada mediante origami de ADN [27].

La caja se sintetizó a partir de seis subunidades planas cuadráticas, que se unieron a manera de un cubo con entrecruzamientos en las aristas. Una de las caras podía abrirse

a manera de una tapa, y uno de sus lados poseía secuencias de ADN complementarias a otras secuencias del lado adyacente; al hibridar las secuencias la cara se mantenía cerrada homológamente a como una pestaña mantiene cerrada la tapa [28].

La tapa solo podía abrirse al añadir las secuencias “llave” en solución, que son secuencias complementarias a las secuencias de la tapa. Así, se generaba una competición entre secuencias y al hibridar las secuencias llave con sus complementarias, la tapa era liberada [28]. De esta forma, se diseñó un sistema con el potencial de acarrear compuestos activos con un mecanismo de liberación controlada. Aunque los autores no tenían una aplicación en específico para la caja, brindaron ideas de algunas de las posibilidades de uso de este tipo de estructuras tales como encapsular fármacos y liberarlos bajo condiciones específicas [28]. Posteriormente, se implementaría el uso de aptámeros para aprovechar su propiedad de alta especificidad.

En 2012, Douglas y colaboradores sintetizaron una nanoestructura de ADN con forma de barril que poseía una bisagra en la parte posterior. Dichas nanoestructuras, denominadas nanorobots, fueron funcionalizadas en su interior con AuNPs de 5 nm de diámetro. Para ello, se formaron conjugados AuNPs-ADN que se unieron a la nanoestructura con secuencias extendidas sobresalientes del cuerpo del nanorobot y complementarias a los conjugados [29]. El modelo de dicha nanoestructura se aprecia en la figura 3.8.



**Figura 3.8.** Modelo del nanorobot [29].

Para mantener la bisagra cerrada, se acopló un sistema de llave-cerradura al nanorobot. Este sistema consistió en un par de aptámeros ubicados en la parte posterior de la nanoestructura, los cuales se hibridaron parcialmente con una cadena complementaria adherida en la nanoestructura. Los aptámeros empleados son complementarios a antígenos sobreexpresados en líneas celulares de cáncer, esta característica posibilita la creación de sistemas de entrega dirigida dependiendo del tipo de aptámero acoplado [29].

## 3.1 Planteamiento del problema

Los biomateriales son una excelente alternativa para crear sistemas de entrega dirigida. Asimismo, el biomaterial debe permitir la funcionalización con AuNPs mediante la adición de una modificación química. Además, se requiere diseñar una compuerta lógica que permita exponer las AuNPs solo en el sitio de acción.

La técnica de origami de ADN permite realizar nanoestructuras 3D de ADN de una manera controlada y precisa. Estas nanoestructuras pueden ser funcionalizadas en su interior con AuNPs mediante modificaciones con un grupo tiol en el extremo de un oligo. Asimismo, se puede acoplar un sistema de reconocimiento molecular a base de aptámeros que solo se activa cuando las AuNPs interactúan con los ligandos presentes en la célula diana.

## 3.2 Hipótesis

Es posible crear una nanoestructura hexagonal de ADN que posea un sistema de reconocimiento molecular basado en aptámeros.

## 3.3 Objetivos

### 3.3.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nanoestructuras de ADN con forma hexagonal.

### 3.3.2 Objetivos específicos

- Diseñar por medio de caDNAno una nanoestructura hexagonal hueca de ADN usando el andamio p7308.
- Simular el plegamiento de la nanoestructura a través de CanDo para determinar las fluctuaciones térmicas y evaluar la estabilidad de la nanoestructura.
- Sintetizar y purificar la nanoestructura mediante el autoensamble de las grapas y el andamio.
- Caracterizar la nanoestructura mediante electroforesis en fase gel de agarosa y AFM.

# Capítulo 4

## Metodología

De manera general, la metodología de este trabajo se divide en tres etapas: diseño, síntesis, y caracterización. Primero, se procedió con el diseño de la nanoestructura con ayuda de los programas caDNAno y CanDo, para obtener las secuencias de las grapas. Después, se procedió a realizar el recocido de la nanoestructura en un termociclador mediante una rampa de temperatura, así como su purificación mediante filtros DNA Fast Flow Ultracel Regenerated Cellulose del proveedor Microcon. Posteriormente, se verificó la formación de la nanoestructura mediante una caracterización con electroforesis en gel de agarosa y AFM.

### 4.1 Diseño

En primer lugar, se realizó el diseño de la nanoestructura utilizando CAD (*Computer Aided Design* por sus siglas en inglés) con el programa caDNAno. Aquí se definieron los entrecruzamientos necesarios para adquirir la estructura hexagonal de barril deseada. Más tarde, se evaluó su estabilidad térmica dentro del programa CanDo. Al final, se obtuvieron las secuencias de las grapas necesarias para la síntesis.

#### 4.1.1 Bosquejo en caDNAno

El diseño de la nanoestructura estuvo basado en el trabajo de Church [29]. La nanoestructura cuenta con unas dimensiones de  $35 \text{ nm} \times 35 \text{ nm} \times 45 \text{ nm}$ . Se utilizó la



secuencia del andamio p7308 de 7308 bases, el cual fue reportado por Douglas y colaboradores en 2009 [30] y se eligió el patrón de entrecruzamientos *honeycomb* para realizar la nanoestructura tridimensional. Asimismo, dentro de la nanoestructura se consideraron seis ubicaciones con posibilidad de colocar AuNPs. El diseño consiste en un barril con dos dominios que están covalentemente unidos en la parte posterior por bisagras de ADN monocatenario. Los dominios pueden ser sujetos en la parte anterior mediante grapas modificadas que contienen la secuencia de aptámeros.

El programa caDNAno, genera un archivo .JSON con la secuencia del andamio y de las grapas necesarias para formar la nanoestructura. El número de grapas generadas para esta nanoestructura fue de 196. Al terminar el diseño en caDNAno, se introdujo la secuencia del andamio p7308 y el programa determinó las secuencias de las grapas necesarias para tal estructura, estas se exportaron a un archivo .CSV.

### 4.1.2 Estabilidad en CanDo

En CanDo se verificaron los esfuerzos cortantes y de torsión, así como la flexibilidad de la nanoestructura. En el sitio de CanDo, se subió el archivo con extensión .JSON. Dentro de las opciones, se seleccionaron los parámetros de red cuadrada y modelo de fluctuaciones térmicas. El nivel de estabilidad térmica se evaluó con el valor de la amplitud de las fluctuaciones térmicas. Si este valor era mayor a 5 nm, se realizaban los ajustes de la nanoestructura en los entrecruzamientos y la longitud de las grapas para minimizar tales fluctuaciones. De este modo, se llevó a cabo un proceso de retroalimentación entre caDNAno y CanDo para diseñar una nanoestructura estable. Si las fluctuaciones eran menores a 5 nm, el diseño era óptimo para ser sintetizado.

## 4.2 Síntesis

La etapa de síntesis consistió en la hibridación de las grapas y el andamio, esto se logró mediante un tratamiento térmico de recocido en un termociclador. Después de ello, se procuró retirar el exceso de grapas realizando un proceso de purificación con filtros.

### 4.2.1 Tratamiento de recocido

Se ordenaron las secuencias de las grapas y el andamio a la compañía Integrated DNA Technologies (IDT) y a BioGuild respectivamente. Las grapas fueron obtenidas a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  y el andamio se obtuvo a 100 nM. En el laboratorio se procedió a armar 4 conjuntos de grapas, para diluir la concentración de las grapas. Los conjuntos 1 y 2 contienen 42 grapas cada uno, que corresponden al dominio superior de la nanoestructura. Mientras tanto, los conjuntos 3 y 4 con 45 grapas cada uno, contienen las grapas del dominio inferior. El conjunto 5 corresponde a las 12 grapas no extendidas de los posibles sitios de funcionalización y el conjunto 6 tiene las mismas grapas extendidas. Del mismo modo, se realizaron conjuntos de los aptámeros y de las grapas guía.

Después, para preparar 100  $\mu\text{L}$  de la solución del recocido, se añadieron en un tubo Eppendorf para termociclador la solución amortiguadora 1XTAE con 10 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ , así como una concentración de andamio y grapas de tal manera que se mantuviera una relación 1:1, 1:2 y 1:4 entre ambos. Asimismo, se añadió  $\text{DDH}_2\text{O}$  hasta completar el volumen deseado. Las cantidades de los reactivos añadidos se especifican en la tabla I.

**Tabla I.** Volúmenes utilizados para el recocido de la nanoestructura de ADN

Solución	Concentración [nM]		Volumen requerido [ $\mu\text{L}$ ]
	Inicial	Final	
Andamio	100	5	10.5
Conjunto 1	4762	500	10.5
Conjunto 2	4762	500	11.3
Conjunto 3	4444	500	11.3
Conjunto 4	4444	500	11.3
Conjunto 5	16667	500	3.0
Aptámeros	25000	500	2.0
Guías	50000	500	1.0
TAE- $\text{Mg}^{2+}$	10 $\times$	1 $\times$	10.0
DDH <sub>2</sub> O			30.1
Volumen total			100

Una vez añadidos los reactivos requeridos, la solución se sometió a un recocido para

hibridizar las cadenas, tal tratamiento tuvo una duración de aproximadamente 16 h. Este consistió en una rampa de temperatura que comenzó con un rápido calentamiento seguido de un enfriamiento lento desde los 80 °C hasta los 25 °C. Dicho proceso se realizó en un termociclador Prime Thermal Cycler de Techne. Posteriormente, la muestra se conservó a 4 °C una vez finalizado el recocido. La rampa de temperatura llevada a cabo, se especifica en la tabla II.

**Tabla II.** Rampa de temperatura para el recocido de la nanoestructura de ADN

Temperatura [°C]		Tiempo por °C
Inicial	Final	
	80	5 min
79	56	15 min y 12 s
55	45	25 min
44	25	15 min y 12 s
Tiempo total		15 h y 50 min

### 4.2.2 Purificación

Para la purificación de la solución, se emplearon una centrífuga XC-2000 Premiere y micro tubos con filtros DNA Fast Flow Ultracel Regenerated Cellulose del proveedor Microcon. Primero se colocaron 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{DDH}_2\text{O}$  en la parte superior del filtro y se centrifugó a 4000 rpm durante 2 minutos. Se descartó el agua que pasó por el filtro, manteniendo los 100  $\mu\text{L}$  restante en la parte superior. Luego, se añadió 300  $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora 1XTAE- $\text{Mg}^{2+}$  en la parte superior del filtro y se repitió el mismo procedimiento desechando la solución amortiguadora que pasó por el filtro.

Enseguida, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de muestra del recocido y 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{DDH}_2\text{O}$  para un total de 400  $\mu\text{L}$ . El procedimiento de centrifugado se repitió una vez más conservando la muestra en el filtro. Finalmente, el filtro se invirtió y se centrifugó para recuperar la muestra ya purificada con 2 ciclos de 2 y 5 min. La muestra se almacenó en refrigeración para su posterior análisis.

## 4.3 Caracterización

En la caracterización de la nanoestructura, se emplearon dos técnicas para comprobar la hibridación de las cadenas durante el recocido. A continuación, se describe a detalle cada una de ellas.

### 4.3.1 Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1 % añadiendo 0.5 g de agarosa ultrapura en 50 mL de la solución amortiguadora 1XTAE. Esta solución se introdujo en un horno de microondas, se calentó por un periodo de 5 s, se mezcló moviendo el matraz para diluir la agarosa y se repitió el procedimiento un número definido de veces hasta obtener una mezcla transparente y homogénea. Durante el proceso, se tuvo la especial precaución de no generar burbujas. Enseguida, se añadió a la mezcla 2  $\mu\text{L}$  de GelRed y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se vertió la mezcla en el molde para geles de electroforesis, se colocó el peine en el molde y se dejó enfriar hasta que el gel solidificara. Más tarde, se removió el peine y se separó el gel del molde. El gel fue colocado en una cámara de electroforesis, la cual fue puesta en una cama de hielo. Se vertió la solución amortiguadora 1XTAE en la cámara hasta el nivel indicado. Previamente, se prepararon 10  $\mu\text{L}$  de las muestras sometidas a recocido. Para ello se agregaron 8  $\mu\text{L}$  de cada muestra junto con 2  $\mu\text{L}$  de glicerol al 50 %. Además, para comparar con un marcador de peso molecular, se utilizó la escalera Quick-Load 1kb DNA Ladder de New England BioLabs Inc. Una vez preparadas las muestras, se pipetearon los 10  $\mu\text{L}$  de cada una en los pozos del gel, se cerró la cámara de electroforesis y el gel se corrió durante 2 hrs a 70 V. Finalmente, se reveló en un transiluminador bajo UV.

### 4.3.2 Microscopía de Fuerza Atómica

Se utilizó el AFM Nano Scope IIIa de Digital Instruments con un portavoladizo convencional en modo intermitente. Para preparar la muestra se utilizó una lámina de óxido de silicio sobre un portamuestras de acero. Posteriormente, se colocaron 2  $\mu\text{L}$  de muestra

en una concentración de 2 nM y se dejó reposar durante 15 min.

Después de este tiempo, se enjuagó la superficie de la lámina de óxido de silicio utilizando 1  $\mu\text{L}$  de agua destilada y esta fue removida con un flujo de nitrógeno. Cuando se secó la muestra, esta fue colocada en el AFM y se equipó el portavoladizo. Ya con la punta puesta, se configuraron los parámetros del AFM para la toma de imágenes. Para ello, se utilizaron las puntas Silicon SPM sensor NC4R-20 del proveedor Nanoworld.

# Capítulo 5

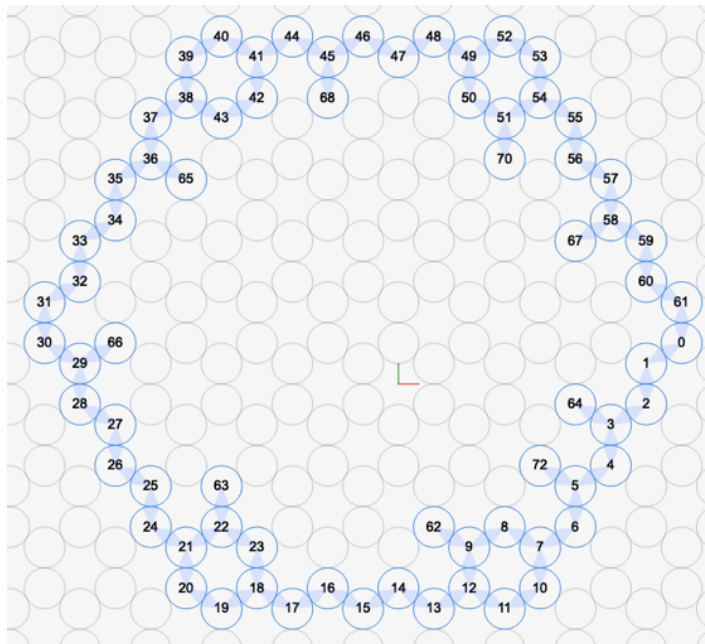
## Resultados y discusión

A continuación, se muestran y detallan los resultados obtenidos en las etapas de diseño síntesis y caracterización por electroforesis en gel de agarosa y AFM de la nanoestructura.

### 5.1 Diseño

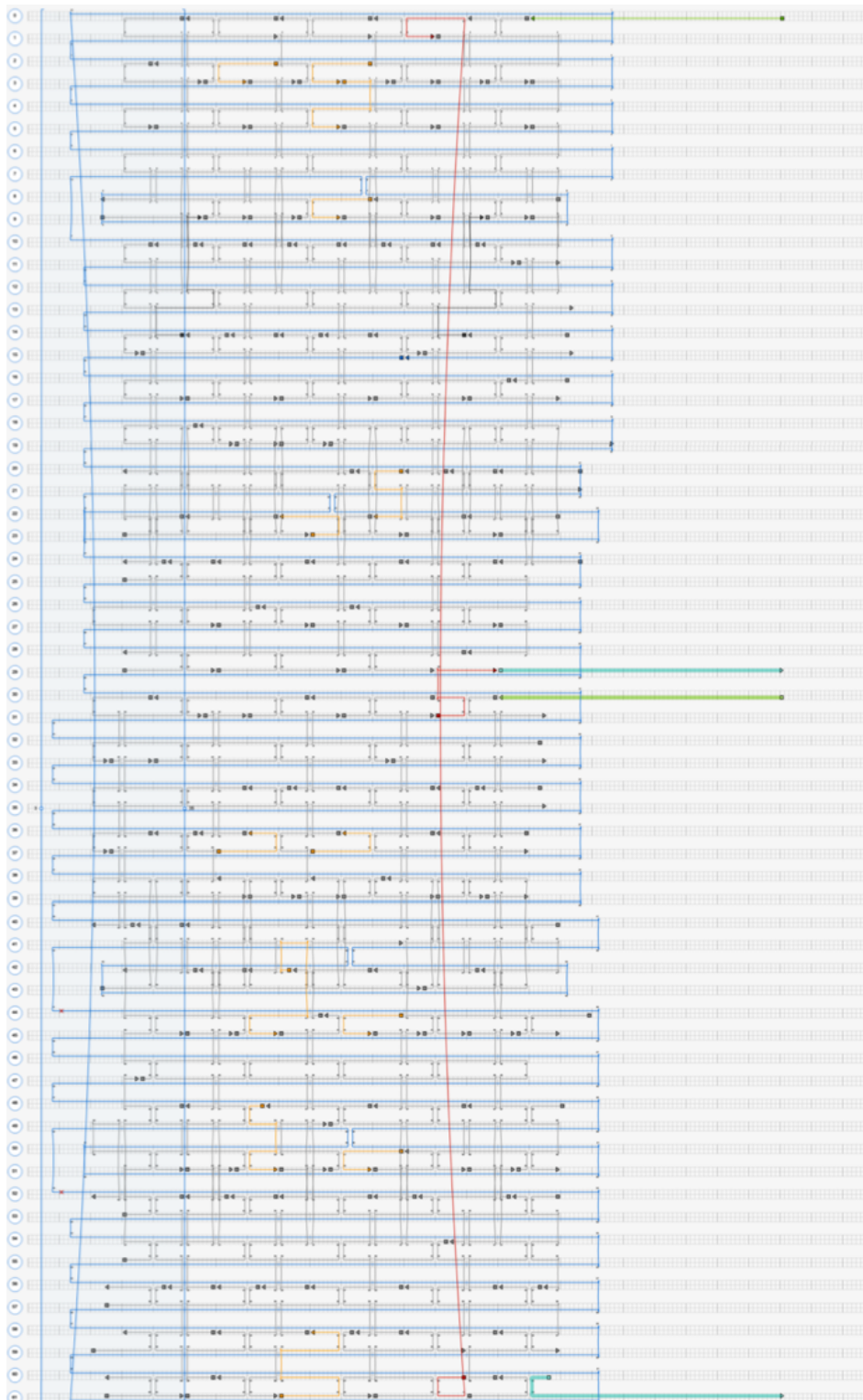
En la figura 5.1 se muestra una vista frontal del diseño en caDNA de la nanoestructura, el cual está basado en el trabajo publicado por Douglas y colaboradores [29], tomando la secuencia del plásmido p7308 como andamio. La nanoestructura contiene un total de 62 dobles hélices acomodadas en el patrón hexagonal, con numeración de 0 a 61. Las hélices numeradas como 62-68, 70 y 72 representan los sitios de amarre designados para AuNPs.

El diseño, cuenta con dos subdominios simétricos que forman la mitad de una sección transversal hexagonal cada uno. Los dominos se unen en la parte posterior por un par de grapas que sirven como bisagra, esta bisagra permite que la nanoestructura pueda abrirse por la mitad simulando un par de valvas. El entrecruzamiento de los subdominios se puede observar en la figura 5.2.



**Figura 5.1.** Vista frontal del diseño de la nanoestructura en caDNAno. Se aprecia la distribución de las hélices acorde con los entrecruzamientos establecidos. La numeración corresponde a las dobles hélices correspondientes de la figura 5.2.

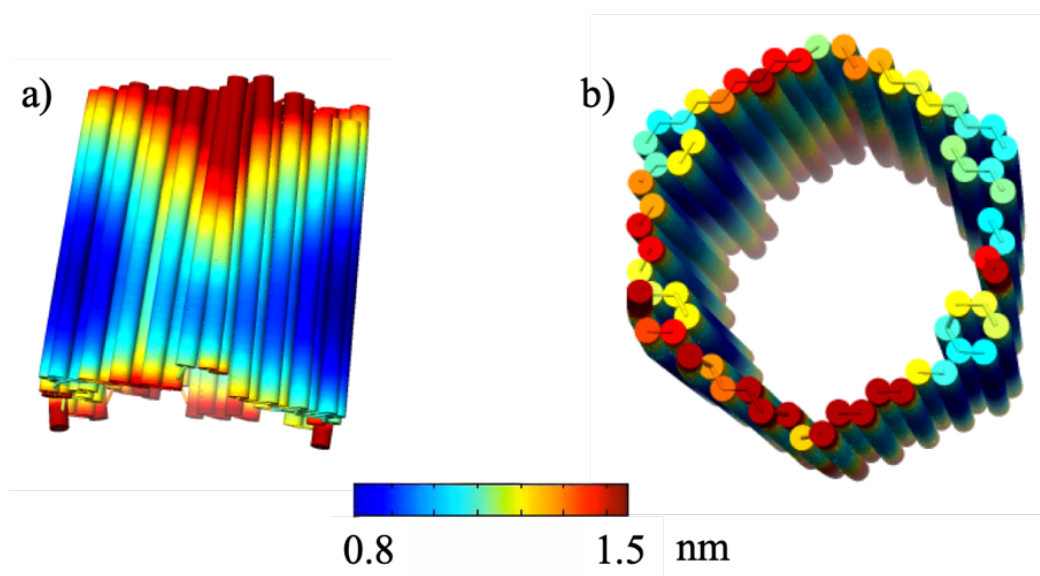
De acuerdo con el diseño de entrecruzamientos, se espera que las secuencias se plieguen formando una nanoestructura hexagonal, que posteriormente fue corroborada mediante los análisis de gel de agarosa y AFM.



**Figura 5.2.** Bosquejo de la nanoestructura en caDNano basado en el trabajo de Douglas y colaboradores [29]. Se muestra el entramado de entrecruzamientos en la nanoestructura hexagonal. En azul se muestra la secuencia del andamio, en gris se muestran las grapas y en amarillo las grapas que corresponden a los sitios de funcionalización de AuNPs. Las secuencias de los aptámeros se muestran en rojo se muestran las grapas guía que mantienen los dominios cerrados.



El análisis de estabilidad térmica-plástica generado por CanDo se muestra como una desviación cuadrática media térmica en la nanoestructura, en la figura 5.3 se puede observar que las regiones que sufren una mayor amplitud de fluctuaciones son aquellas que se ubican en los extremos de la nanoestructura. Por otra parte, la región central mostró tener la menor amplitud de las fluctuaciones, que es indicativo de una mayor rigidez en dicha zona. Este valor aseguró que el diseño es suficientemente estable para proceder con el paso de síntesis.

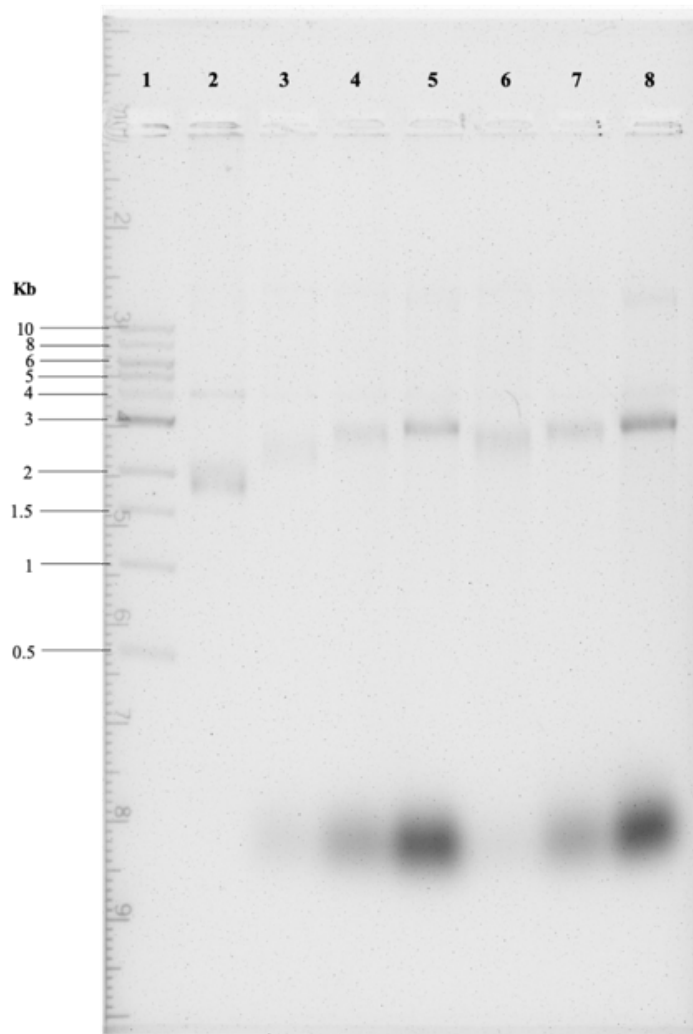


**Figura 5.3.** Simulación de la estabilidad de la nanoestructura en CanDo. En el inciso a) se observa la vista superior, mientras que en b) se muestra la vista frontal.

## 5.2 Caracterización por gel de agarosa

Después de generar el archivo con las secuencias y realizar el tratamiento de recocido, se comprobó la formación de las nanoestructuras por medio de electroforesis en gel de agarosa. El gel que se muestra en la figura 5.4 contiene las siguientes muestras en los respectivos pozos: el pozo 1 contiene Quick-Load 1kb DNA Ladder de New England BioLabs Inc., cuyo marcador de peso molecular se mide en Kb (kilobases); el pozo 2 contiene el andamio p7308 a 5 nM. Los pozos 3, 4 y 5 contienen andamio p7308 a 10 nM junto con 10, 20 y 40 nM de grapas respectivamente, estas cantidades representan una relación 1:1, 1:2 y 1:4 de andamio y grapas respectivamente. Por último, los pozos

6, 7 y 8 contienen un duplicado de cada muestra de los pozos 3, 4 y 5.



**Figura 5.4.** Gel de agarosa del recido de la nanoestructura. Los pozos se encuentran numerados como sigue: 1) Quick-Load 1kb DNA Ladder de New England BioLabs® Inc., 2) andamio p7308 a 5 nM, 3), 4) y 5) nanoestructura con 10, 20 y 40 nM de grapas respectivamente. 6), 7) y 8) duplicados de las muestras de los pozos 3, 4 y 5. La banda de las nanoestructuras se ubica a la altura de las 3 Kb.

En el gel de agarosa se puede apreciar que las bandas de la nanoestructura presentan una movilidad cercana a la banda de los 3 Kb, este valor se encuentra influenciado por el peso molecular y por la geometría de la nanoestructura, ya que una razón entre largo y ancho más aproximado a 1 provoca que la nanoestructura aumente su movilidad en el gel.

En cada uno de los carriles con muestra sometida a recido se observó que la nanoestructura tuvo un nivel de corrimiento menor al andamio. Idealmente, si se añade

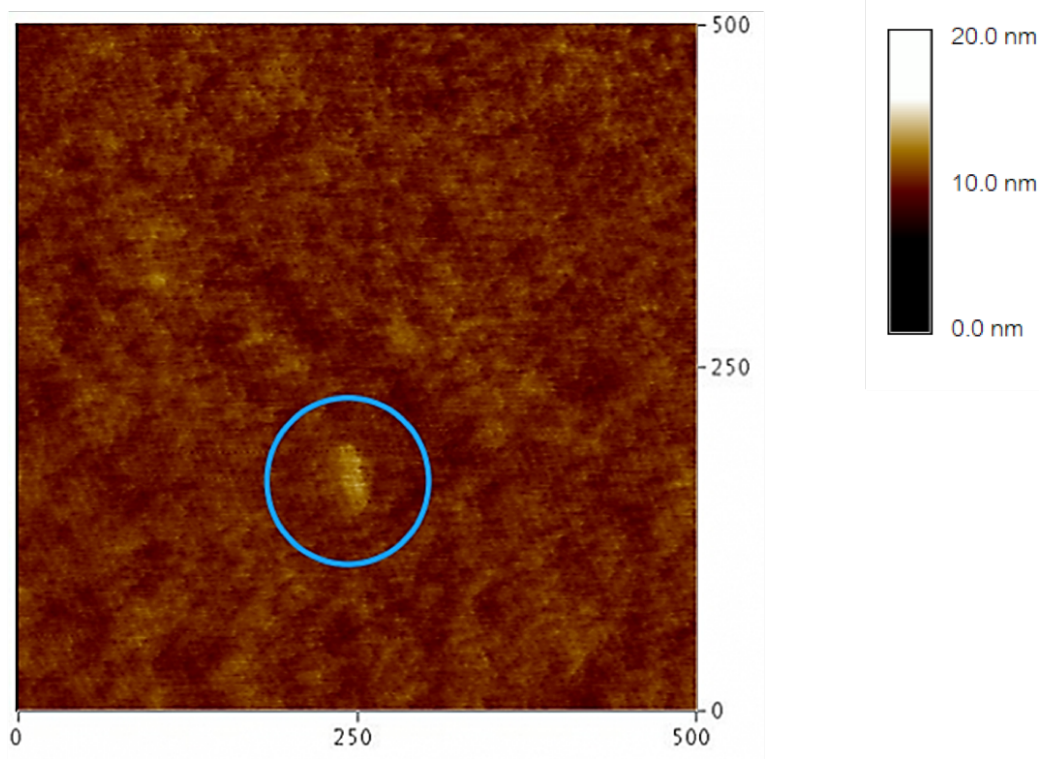
una saturación 1:1, todas las grapas hibridarían con el andamio y no se observaría una banda de grapas en el carril. No obstante, en la cinética de la reacción existe un punto de equilibrio donde la cantidad de grapas hibridadas en el andamio es menor al total y depende de la concentración de saturación.

El tratamiento de recocido empleado de aproximadamente 16 h permitió la formación de la nanoestructura en un tiempo menor al reportado de 90 h empleado por Douglas [29], lo que sugiere que el tiempo de recocido puede adaptarse. Por otra parte, las bandas que corresponden a las grapas corrieron a mayor distancia que la banda de 0.5 kb de la escalera, esto es consistente con el tamaño de las grapas que tienen un tamaño máximo de 49 nucleótidos.

En los carriles con una muestra de mayor saturación se puede observar que la banda de la nanoestructura tiene mayor intensidad y un menor corrimiento, que indica una mayor cantidad de grapas hibridadas y que el peso molecular de la estructura aumenta. Esto sugiere que a bajas concentraciones de saturación se forman estructuras parciales con una menor cantidad de grapas. corrimiento es un indicador del incremento en el peso molecular que revela el apareamiento de secuencias complementarias, esto puede relacionarse con la formación de la nanoestructura. Con esta información puede comprobarse el autoplegamiento del andamio mediante la complementariedad de secuencias.

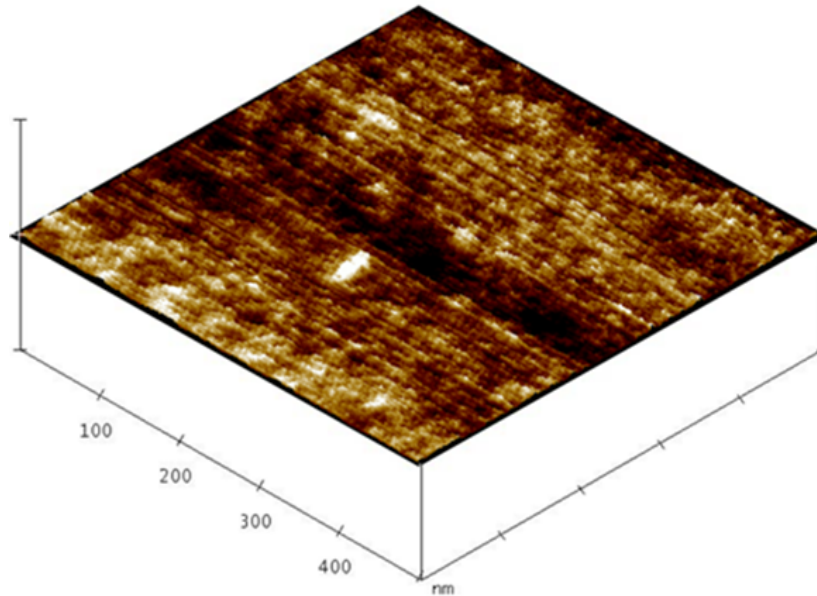
### 5.3 Caracterización por AFM

Una vez hecha la caracterización por gel de agarosa, se purificó la muestra y se procedió a tomar imágenes en el AFM. En la figura 5.5 se puede observar una micrografía de AFM obtenida en un área de muestreo de 500 nm por 500 nm, de una solución con los origmais a 2 nM sobre una lámina de óxido de silicio. En la micrografía se pudo apreciar una figura en forma de bastón, ubicada cerca del centro del área de muestreo, que poseía dimensiones y morfología parecidas a las nanoestructuras esperadas.



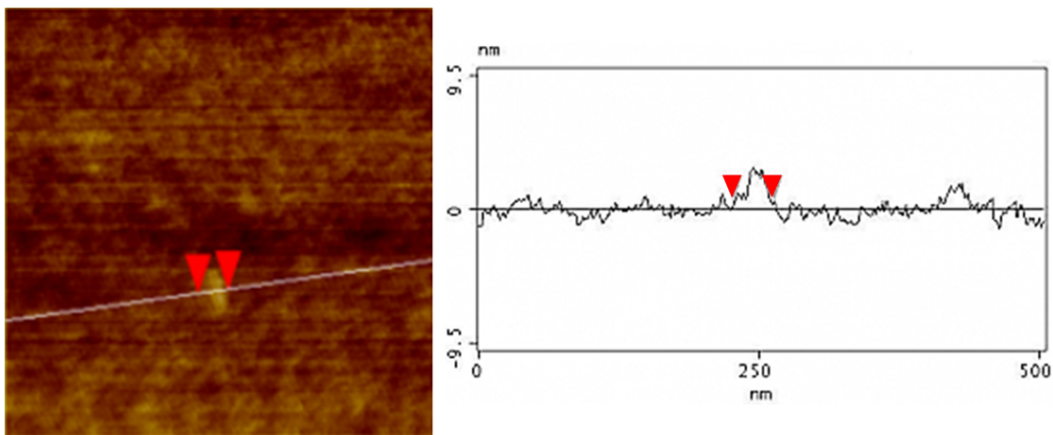
**Figura 5.5.** Micrografía de la nanoestructura por AFM, en la imagen se exhibe una morfología parecida a las nanoestructuras esperadas.

En la figura 5.6 se observa la misma micrografía de la muestra sintetizada de la nanoestructura, pero bajo otra perspectiva. En ella se rotó la imagen con respecto al eje  $z$  en un ángulo de  $45^\circ$  y con respecto a un eje en el plano  $xy$  que atraviesa la imagen en diagonal en un ángulo de  $35^\circ$ . En la imagen sin rotar y no rotada, se puede apreciar que la escala de la profundidad es de 20 nm, valor que difiere de los 35 nm esperados para la nanoestructura. No obstante, esto puede atribuirse a la poca rigidez de la nanoestructura sobre el eje  $z$ , debido a su naturaleza hueca. Cabe mencionar que la técnica de AFM posee una limitante en la detección AuNPs en el interior de nanoestructuras en 3D. Esto se debe a que el AFM solo puede palpar la topología externa de la nanoestructura.



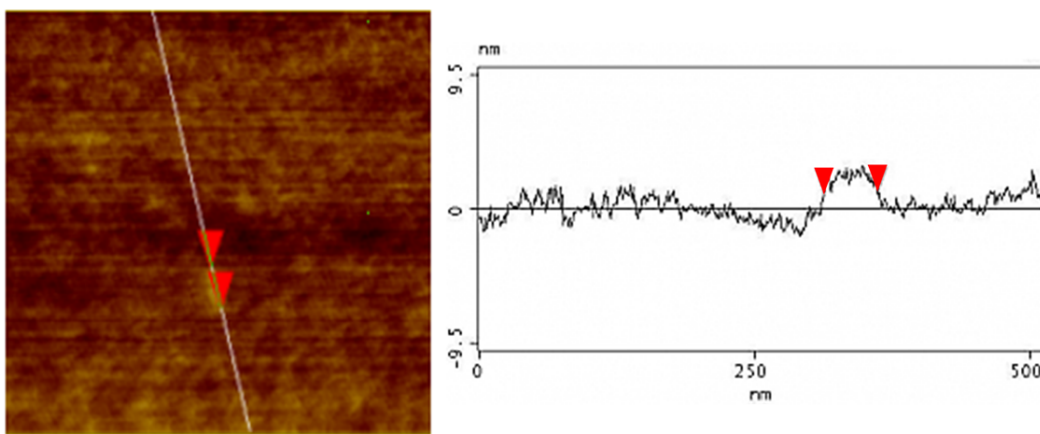
**Figura 5.6.** Micrografía rotada de la nanoestructura por AFM.

Una vez obtenidas las micrografías de la nanoestructura se procedió a verificar sus dimensiones, para ello se realizaron 6 mediciones tanto en el largo como en el ancho y se obtuvo un promedio y la desviación estándar para cada una. Así, el promedio de las dimensiones de la nanoestructura resultó ser: en el largo de  $53.88 \pm 1.92$  nm y en el ancho de  $35.97 \pm 2.17$  nm. Estos valores son muy cercanos a los reportados por Douglas de 45 por 35 nm, y fueron obtenidos mediante el análisis seccional transversal y longitudinal de la nanoestructura, que se muestran en la figura 5.7 y 5.8 respectivamente.



**Figura 5.7.** Análisis seccional transversal de la nanoestructura. Se observa la micrografía en AFM y el registro de la señal de la punta del voladizo.

Al realizar el análisis seccional transversal de la nanoestructura, se pudo apreciar que la señal registrada por el AFM presentaba una meseta justo antes de llegar al máximo absoluto. Este patrón es indicativo de una estructura que tiene una altura más baja en los laterales respecto al punto central, lo cual es consistente con una estructura hexagonal. Por otra parte, el análisis seccional longitudinal realizado de la nanoestructura mostró un cambio repentino en el nivel de la señal, esto quiere decir que la altura de la nanoestructura en su largo es constante.



**Figura 5.8.** Análisis seccional longitudinal de la nanoestructura. Se observa la micrografía en AFM y el registro de la señal de la punta del voladizo.

De acuerdo con los datos anteriores, se pudo definir de manera más precisa la morfología de la nanoestructura, gracias a los análisis seccionales se demostró que posee características que la perfilan como una nanoestructura hexagonal. De este modo, junto con los resultados del gel de agarosa se pudo comprobar la formación de la nanoestructura con las características esperadas en el paso de diseño.

# Capítulo 6

## Conclusiones

Se comprobó la efectividad de la técnica de origami de ADN para sintetizar nanoestructuras a partir del autoplegamiento de cadenas dirigido por la complementariedad de bases. Esto permite obtener una síntesis precisa del diseño y la optimización de recursos para, posteriormente, llegar a aplicaciones tangibles.

Se realizó el diseño de una nanoestructura de ADN utilizando el andamio p7308 mediante el uso del programa caDNAno. Se llevó a cabo la simulación de la nanoestructura plegada utilizando CanDo y se determinaron sus fluctuaciones térmicas en un rango de 0.8 a 1.5 nm, con esta información se evaluó la estabilidad de la nanoestructura y se verificó su plausibilidad para su síntesis.

Una vez realizada la síntesis, en el análisis del gel de agarosa se determinó que logró llevarse a cabo el autoplegamiento de la nanoestructura por medio de la hibridación entre las grapas y el andamio, lo anterior con base en el corrimiento de sus bandas respectivas en el gel, donde un decremento en la movilidad electroforética implicó un aumento en el peso molecular, y por ende, la hibridación de cadenas.

Posteriormente, a través de la visualización de la nanoestructura en AFM se comprobó la morfología hexagonal y las dimensiones de la nanoestructura. Al realizar los análisis seccionales longitudinal y trnasversal de la muestra se obtuvieron unas dimensiones de  $53.88 \pm 1.92$  nm para el largo y de  $35.97 \pm 2.17$  nm en el caso del ancho, que son aproximadas a las dimensiones reportadas en el diseño original de Douglas y colaboradores [29], De esta manera, tanto la caracterización mediante gel de agarosa como

por AFM verificaron la formación de nanoestructuras congruentes a las características anticipadas por los modelos y simulaciones en caDNAno y CanDo respectivamente.

Con el objetivo de implementar la nanoestructura como un sistema acarreador. Se plantea la evaluación del sistema de llave cerradura con la adición de los antígenos correspondientes a la línea celular de cáncer de colón, de este modo, se podrá tener certeza de la sensibilidad del sistema para reconocer su diana. Además, se sugiere llevar a cabo la funcionalización de las AuNPs y su visualización en Microscopía Electrónica de Transmisión, con el propósito de corroborar la encapsulación de las AuNPs en la nanoestructura. Del mismo modo, se recomienda llevar a cabo los protocolos para evaluar la citotoxicidad de las nanoestructuras, y determinar así sus potenciales aplicaciones biomédicas.



# Capítulo 7

## Referencias

1. Rothmund, P. W. K. (2006). Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, *440*(7082), 297-302. doi:10.1038/nature04586
2. Marchisio, M. A. (2015). *Computational methods in synthetic biology* (1.a ed.). Humana Press.
3. Singh, P., Pandit, S., Mokkaapati, V. R. S. S., Garg, A., Ravikumar, V. Mijakovic, I. (2018). Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *International journal of molecular sciences*, *19*(7). doi:10. 3390/ijms19071979
4. Chaturvedi, V. K., Singh, A., Singh, V. K. Singh, M. P. (2019). Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. *Current Drug Metabolism*, *20*(6), 416-429. doi:10.2174/1389200219666180918111528.
5. Elahi, N., Kamali, M. Baghersad, M. H. (2018). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, *184*, 537-556. doi:10.1016/j.talanta.2018.02.088
6. Huang, R.-F. S., Wei, Y.-J., Inbaraj, B. S. Chen, B.-H. (2015). Inhibition of colon cancer cell growth by nanoemulsion carrying gold nanoparticles and lycopene. *International journal of nanomedicine*, *10*, 2823-46. doi:10.2147/IJN.S79107
7. Kang, B., Mackey, M. A. El-Sayed, M. A. (2010). Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles in Cancer Cells Induces DNA Damage, Causing Cytokinesis Arrest

- and Apoptosis. *Journal of the American Chemical Society*, 132(5), 1517-1519. doi:10.1021/ja9102698
8. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
  9. Senapati, S., Kumar Mahanta, A., Kumar, S. Maiti, P. (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Sig Transduct Target Ther*, 3(7). doi:10.1038/s41392-017-0004-3
  10. Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R. Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2(12), 751. doi:10.1038/nnano.2007.387
  11. Bhushan, B., Luo, D., Schricker, S. R., Sigmund, W. Zauscher, S. (Eds.). (2014). *Handbook of Nanomaterials Properties*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-31107-9
  12. Li, J., Fan, C., Pei, H., Shi, J. Huang, Q. (2013). Smart Drug Delivery Nanocarriers with Self-Assembled DNA Nanostructures. *Advanced Materials*, 25(32), 4386-4396. doi:10.1002/adma.201300875
  13. Veedu, R. N. (2016). *Aptamers : tools for nanotherapy and molecular imaging* (1.a ed.). Jenny Stanford Publishing.
  14. Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C. M., Lehninger, A. L., Cox, M. M. (2005). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (4a. ed.). Barcelona: Omega.
  15. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell* (5.a ed.). New York London: Garland Publishing.
  16. Calladine, C. R. (2004). *Understanding DNA : the molecule and how it works* (3.a ed.). Elsevier Academic Press.

17. Seeman, N. C. (2015). *Structural DNA Nanotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9781139015516
18. Pedersen, R., Marchi, A. N., Majikes, J., Nash, J. A., Estrich, N. A., Courson, D. S., Hall, C. K., Craig, S. L. Labean, T. H. (2014). *Handbook of Nanomaterials Properties*, 1125-1157. doi:10.1007/978-3-642-31107-9
19. Luo, R., Gilson, H. S., Potter, M. J. Gilson, M. K. (2001). The physical basis of nucleic acid base stacking in water. *Biophysical Journal*, 80(1), 140-148. doi:10.1016/S0006-3495(01)76001-8
20. Yakovchuk, P., Protozanova, E. Frank-Kamenetskii, M. D. (2006). Base- stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Research*, 34(2), 564-574. doi:10.1093/nar/gkj454.
21. Reed, R. H. (2013). *Practical skills in biomolecular sciences*. Pearson Education.
22. Giessibl, F. J. (2003). Advances in atomic force microscopy. *Rev. Mod. Phys.*, 75(3), 949. doi.org/10.1103/RevModPhys.75.949
23. Kontomaris, S. V. Stylianou, A. (2017). Atomic force microscopy for university students: Applications in biomaterials. *European Journal of Physics*, 38(3), doi:10.1088/1361-6404/aa5cd6
24. Shih, W. M., Quispe, J. D. Joyce, G. F. (2004). A 1.7-kilobase singlestranded DNA that folds into a nanoscale octahedron. *Nature*, 427(6975), 618-621. doi:10.1038/nature02307
25. Mathieu, F., Liao, S., Kopatsch, J., Wang, T., Mao, C. Seeman, N. C. (2005). Six-helix bundles designed from DNA. *Nano Letters*, 5(4), 661-665. doi:10.1021/nl050084f
26. Dietz, H., Douglas, S. M. Shih, W. M. (2009). Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes. *Science*, 325(5941), 725-730. doi:10.1126/ science.1174251

27. Kim, D. N., Kilchherr, F., Dietz, H. Bathe, M. (2012). Quantitative prediction of 3D solution shape and flexibility of nucleic acid nanostructures. *Nucleic Acids Research*, *40*(7), 2862-2868. doi:10.1093/nar/gkr1173
28. Andersen, E. S., Dong, M., Nielsen, M. M., Jahn, K., Subramani, R., Mamdough, W., Golas, M. M., Sander, B., Stark, H., Oliveira, C. L. P., Pedersen, J. S., Birkedal, V., Besenbacher, F., Gothelf, K. V. Kjems, J. (2009). Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, *459*(7243), 73-76. doi:10.1038/nature07971
29. Douglas, S. M., Bachelet, I. Church, G. M. (2012). A Logic- Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads. *Science*, *335*(6070), 831-834. doi:10.1126/science.1214081
30. Douglas, S. M., Dietz, H., Liedl, T., Högberg, B., Graf, F. Shih, W. M. (2009). Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature*, *459*(7245), 414-418. doi:10.1038/nature08016