

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ESPECTROSCÓPICA DE LA INTERACCIÓN DEL
APTÁMERO CON COMPONENTES DE LA ESPORA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* Y LA
SUPERFICIE DE ÓXIDO DE GRAFENO

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en Química
para optar al grado y título de Maestría Académica en Química

JUAN SEBASTIÁN HERNÁNDEZ CIFUENTES

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

DEDICATORIA

A mis padres por su apoyo e infinito amor

AGRADECIMIENTO

Al personal del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), por su apoyo en el desarrollo experimental de este proyecto.

Al personal del Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ), por su apoyo en la logística de este proyecto.

Al personal del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CICIMA), por permitirme usar los equipos claves para el desarrollo experimental de este proyecto.

Al personal del Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), por siempre su ayuda en la medición de espectros de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

A mi lector, Dr. Renato Murillo, por su motivación y apoyo a lo largo del desarrollo experimental de este proyecto.

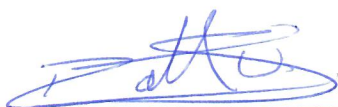
A mi lector, Dr. César Rodríguez, por su guía y apoyo a lo largo del desarrollo experimental y logístico de este proyecto.

A mi tutor y mentor, Dr. Roberto Urcuyo, por su dedicación, apoyo, motivación y guía a lo largo de los años y durante este proyecto.

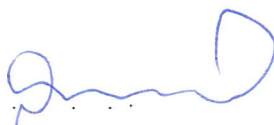
Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Posgrado en Química de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Química



Dr. William Zamora Ramírez
Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado



Dr. Roberto Urcuyo Solorzano
Director de Tesis



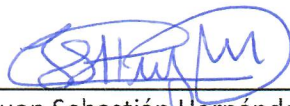
Dr. César Rodríguez Sánchez
Asesor



Dr. rer. nat. Renato Murillo Masis
Asesor



Dr. Max Chavarría Vargas
Director
Programa de Posgrado en Química



Juan Sebastián Hernández Cifuentes
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
HOJA DE APROBACIÓN	iv
TABLA DE CONTENIDO	v
RESUMEN EN ESPAÑOL	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	14
Capítulo I: Introducción	15
1.1 Esporas de Clostridioides difficile	17
1.2 Proteómica de las esporas de Clostridioides difficile	22
1.3 Biosensores	28
1.4 Grafeno como transductor de señales en sistemas de detección	34
1.4.a Métodos de obtención de grafeno.....	35
1.4.b Ventajas del grafeno para su uso en el desarrollo de sistemas de detección	36
1.4.c Métodos de caracterización de superficies de grafeno	38
1.4.d Perspectivas de las aplicaciones de grafeno en sistemas de detección	42
1.5 Aptámeros como partículas de reconocimiento para el desarrollo de biosensores	45
1.6 Ácidos nucleicos: Una estructura definida por el balance de fuerzas opuestas – perspectiva orientada al modelaje de aptámeros	54

1.6.a Estrategias Experimentales para la elucidación de estructuras tridimensionales de ácidos nucleicos	57
1.6.b Estrategias Computacionales	60
Capítulo 2: Materiales y métodos	64
2.1. Extracción de proteínas y corrida de geles SDS-PAGE.....	64
2.2 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	65
2.3 Espectrometría de Masas	67
2.4 Inmunoprecipitación (Pull Down) a través de partículas magnéticas.....	69
2.5 Microscopía TEM	69
2.6 Western Blot 1D.....	69
2.7 SDS-PAGE 2D.....	70
2.8 Anclaje del aptámero a la superficie de óxido de grafeno	71
2.9 Espectroscopía Raman, XPS y AFM.....	71
2.10 Microscopía de epifluorescencia.....	72
2.11 H-RMN	73
2.12 Estructura 2D ssADN.....	73
2.13 Estructura 3D ssADN.....	73
2.14 Estructura 3D de la interacción ADN-proteína.....	73
Capítulo 3: Resultados y discusión	74
3.1 Caracterización de la interacción biológica entre el aptámero y el blanco molecular	74
3.2 Caracterización del anclaje del aptámero a la superficie de grafeno	93
3.3 Modelo Computacional de la interacción biológica entre el aptámero y el blanco molecular	100
Capítulo 4: Conclusiones y recomendaciones	111

Bibliografía	113
Anexos	142

RESUMEN EN ESPAÑOL

Clostridioides difficile es un patógeno bacteriano formador de endosporas que causa infecciones asociadas al uso de antibióticos, primordialmente en entornos clínicos. Las esporas de *C. difficile* son altamente resistentes a las condiciones ambientales y de desinfección, lo que hace que su detección en superficies sea un aspecto crítico del manejo epidemiológico. Sin embargo, hay una falta de sistemas de detección que puedan determinar de manera rápida y sencilla su presencia en muestras ambientales. El grafeno es un material bidimensional que tiene propiedades únicas, incluyendo una alta área superficial y conductividad eléctrica, lo que lo convierte en un material ideal para el desarrollo de biosensores. Los aptámeros, por su parte, son oligonucleótidos capaces de unirse selectivamente a una molécula blanco con alta afinidad y especificidad, lo que los convierte en valiosos elementos de reconocimiento. Este trabajo propone los pasos iniciales para el desarrollo de un biosensor que combina grafeno y un aptámero de ADN para detectar esporas de *C. difficile* del ribotipo 027, con los aptámeros como el elemento de reconocimiento y el grafeno como el transductor para convertir una interacción biológica en una señal medible. Este biosensor tiene el potencial de priorizar los esfuerzos de desinfección a través de la detección de esporas de *C. difficile* en entornos hospitalarios, lo que llevaría a una mejora en el manejo epidemiológico de la infección.

ABSTRACT

Clostridioides difficile is a spore-former pathogen that causes nosocomial infections associated with antibiotic use in clinical settings. The spores of *C. difficile* are highly resistant to environmental stresses and disinfection, making their detection in surfaces a critical aspect of epidemiological management. However, there is a lack of sensing systems that can reliably detect their presence in environmental samples. Graphene is a two-dimensional material that has unique properties, including high surface area, and electrical conductivity, rendering it an ideal material for biosensor development. Additionally, aptamers are short oligonucleotide lengths capable of selectively binding to a specific target with high affinity and specificity, making them valuable recognition elements in detection systems. This work proposed the initial steps for the development of a biosensor that combines graphene and aptamers to detect *C. difficile* spores, with the aptamers serving as the recognition element and graphene as the transducer to convert a biological interaction into a measurable signal. This biosensor has the potential to prioritize disinfection efforts through the detection of *C. difficile* spores in hospital settings, leading to improved epidemiological management and patient outcomes.

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. 1. Métodos usados como tratamiento para la extracción de proteínas de la espora de *C. difficile*, y su posterior análisis a través del ensayo de Lowry. 67

Tabla 3.1. 1. Masas obtenidas gel SDS-PAGE después del ensayo de inmunoprecipitación a través de las partículas magnéticas funcionalizadas con el complejo estreptavidina y aptámero biotinilado..... 83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. 1. <i>Esquema de las capas constituyentes de la espora de C. difficile (Imagen original realizada en Biorender e Illustrator)</i>	21
Figura 1.2. 1. Estructura general de un espectrómetro de masas Orbitrap (Imagen original realizada en Biorender e Illustrator).....	22
Figura 1.2. 2. Diagrama general del SDS-PAGE (Imagen original realizada en Biorender e Illustrator).....	25
Figura 1.3. 1. Esquema de los componentes generales de un biosensor. <i>(Imagen original realizada en Biorender e Illustrator)</i>	29
Figura 1.4. 1. Estrategias de producción de grafeno a gran escala <i>(Imagen original realizada en Biorender e Illustrator)</i>	35
Figura 1.4. 2. Regiones representativas de señales RAMAN en grafeno (Imagen original realizada en Illustrator)	39
Figura 1.4. 3. Esquema general de un sistema basado en GFET (Imagen original realizada en Illustrator).....	43
Figura 1.5. 1. Reacción de luminol catalizada por la peroxidasa de rábano picante.....	48
Figura 1.5. 2. Diagrama del método de inmunoprecipitación utilizando el enlace biotina/estreptavidina <i>(Imagen original realizada en Biorender e Illustrator)</i>	49
Figura 1.5. 3. Esquema general del proceso de Western Blot para el análisis de interacciones <i>(Imagen original realizada en Biorender e Illustrator)</i>	50
Figura 1.5. 4. Isoelectroenfoco de péptidos según su punto isoeléctrico debido a los anfóteros en el gel especializado <i>(Imagen original realizada en Biorender e Illustrator)</i>	51

Figura 1.6. 1. Numeración de los átomos de los nucleótidos presentes en las cadenas de ADN (Figura original generada en ChemDraw 16.0 e Illustrator)	60
Figura 3.1. 1. Comparación de los diferentes métodos empleados en la extracción de proteínas de la espora de <i>C. difficile</i> mediante la elucidación de bandas obtenidas en gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 12%.....	74
Figura 3.1. 2. Análisis de varianza considerando los lotes esporas de <i>C. difficile</i> a las cuales se les aplicaron los tratamientos 1, 2, y 3 como parte del diseño experimental por bloques.	76
Figura 3.1. 3. Análisis de la concentración obtenida por tratamiento en cada lote de esporas de <i>C. difficile</i>	77
Figura 3.1. 4. Categorización funcional de las proteínas identificadas en la espora de <i>C. difficile</i> CQ33 y su comparación con las bases de datos en la literatura.	79
Figura 3.1. 5. Categorización funcional de las 99 proteínas identificadas en la espora de <i>C. difficile</i> CQ33 que no habían sido reportadas antes en la literatura.	80
Figura 3.1. 6. Gel de SDS de la proteína captada por las partículas magnéticas funcionalizadas con el complejo estreptavidina y aptámero biotinilado.	82
Figura 3.1. 7. Microscopia electrónica TEM de A) la espora <i>C. difficile</i> CQ33 (control), B) Espora + Aptámero y C) Espora + anticuerpo anti- SlpA.....	84
Figura 3.1. 8. Electroforesis 2D de la muestra de proteínas de la espora de <i>C. difficile</i>	86
Figura 3.1. 9. Diagrama del diseño de experimento para validar la interacción del aptámero con proteínas de la espora de <i>C. difficile</i> y sus controles correspondientes.	87
Figura 3.1. 10. Membranas PDVF reveladas a través de quimioluminiscencia.	88
Figura 3.1. 11. Hipótesis de los modos de interacción del aptámero con los componentes de la espora de <i>C. difficile</i> CQ33.	91
Figura 3.2. 1. Esquema general de la reacción del grafeno ante la exposición a oxígeno-plasma para generar óxido de grafeno (Figura original generada en ChemDraw 16.0).....	93

Figura 3.2. 2. Optimización de la oxidación de la superficie de grafeno CVD a través de oxígeno-plasma para la generación de óxido de grafeno.....	94
Figura 3.2. 3. Reacción de la funcionalización del oxido de grafeno con el aptámero a través de la reacción con EDC y sulfo-NHS (Figura original generada en ChemDraw 16.0).	95
Figura 3.2. 4. Análisis de la modificación de la rugosidad de la superficie de óxido de grafeno después de la reacción de anclaje con el aptámero.	96
Figura 3.2. 5. Análisis XPS de la superficie antes y después de la reacción de funcionalización con el aptámero. A) Señal XPS detectada en la región de los orbitales 2p del fosforo; B) Señal XPS detectada en la región de los orbitales s del nitrógeno.	97
Figura 3.2. 6. Validación a través de microscopia confocal de la interacción de la espora con el sistema de detección de óxido de grafeno funcionalizado con el aptámero.	98
Figura 3.2. 7. Validación a través de microscopia AFM de la interacción de la espora con el sistema de detección de óxido de grafeno funcionalizado con el aptámero.	99
Figura 3.2. 8. Diseño del biosensor planificado dentro de la colaboración que usara los datos presentados en esta tesis.	99
Figura 3.3. 1. Variaciones en las señales de RMN en la región de 7.10 ppm a 8.50 ppm ante cambios provocados por la presencia de Buffer de fosfatos (PBS 10 mM, 150 mM NaCl, 95% D ₂ O/5% H ₂ O, 256 pulsos, 600 MHz).	101
Figura 3.3. 2. Variaciones en las señales de RMN en la región de 7,00 ppm a 8,70 ppm ante cambios provocados por temperaturas entre los 5 °C y los 25 °C (10 mM PBS, 150 mM NaCl, 95% D ₂ O/5% H ₂ O, 256 pulsos, 600 MHz).	102
Figura 3.3. 3. Diagrama generado por mFold como modelo de la organización estructural 2D del aptámero.	104
Figura 3.3. 4. Modelos de la estructura del aptámero optimizados por algoritmos grano grueso.	106
Figura 3.3. 5. Modelo de la interacción del aptámero con la proteína SlpA como posible componente de la capa S-layer (no antes descrito) de las esporas de <i>C. difficile</i>	109

LISTA DE ABREVIATURAS

C. difficile – *Clostridioides difficile*

CDI – Infecciones derivadas de *Clostridioides difficile*
(siglas en ingles)

CDC – Centro de control de control y prevención de enfermedades de Estados Unidos (siglas en ingles)

EPA – Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (siglas en ingles)

CaDPA – Calcio ácido dipicolínico (siglas en ingles)

CLEs – Enzimas líticas de la corteza (siglas en ingles)

LC-MS – Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (siglas en ingles)

SDS – Dodecil Sulfato de Sodio

TEMED – N, N, N', N' – tetrametiletildiamina

DTT – Ditiotreitól

GFET – Transistor de efecto de campo de grafeno

SPR – Resonancia por plasmón de superficie

Grafeno CVD – grafeno por deposición de vapor

SEM – Microscopía de barrido electrónico

AFM – Microscopía de fuerza atómica

XPS – Microscopía de fotoelectrones de rayos X

TEM – Microscopía de transmisión electrónica

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

SELEX – Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (siglas en ingles)

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

FRET – Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia

HRP – Peroxidasa de rábano picante

ELONA – Ensayo de oligonucleótidos enlazados a enzima

PVDF – Fluoruro de poli vinilideno

EIS – Espectroscopía de impedancia electroquímica

QCM – Microbalanza de cristal de cuarzo

NMR – Resonancia magnética nuclear

BSA – Proteína de suero bovino

PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida

IPG – Gradiente de isoelectroenfoque

IAA – Iodoacetamida

EDC – 1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

Sulfo NHS – N-Hidroxisulfosuccinimida

PMMA – polimetilmetacrilato

PBS – Amortiguador de fosfatos salinos

SlpA – Proteína componente de capa S

TCA – Acido tricarbóxico

Capítulo I: Introducción

Los biosensores son dispositivos analíticos que combinan un elemento de reconocimiento biológico con un transductor para detectar y cuantificar un analito específico. Los biosensores tienen varias ventajas sobre las técnicas analíticas tradicionales, como alta sensibilidad, respuesta rápida y monitoreo en tiempo real (Wu *et al*, 2022; Oliveira *et al*, 2022; Lu *et al*, 2021). En los últimos años, los biosensores basados en grafeno y aptámeros han surgido como un enfoque prometedor para la detección de varios analitos, incluyendo bacterias y sus esporas (Wang *et al*, 2009; Moayeri *et al*, 2015; Kim *et al*, 2013; Swiecki *et al*, 2006).

El grafeno es un material bidimensional compuesto por una sola capa de átomos de carbono dispuestos en una estructura hexagonal (Novoselov *et al*, 2014). Este tiene propiedades fisicoquímicas únicas, como una alta área superficial (Talat *et al*, 2019; Moulick *et al*, 2022), y conductividad eléctrica, lo que lo convierte en un material ideal como superficie transductora de señales para el desarrollo de biosensores (Balandin *et al*, 2008; Boyda *et al*, 2016, Samuels *et al*, 2015; Lu *et al*, 2018).

Por otro lado, los aptámeros son secuencias sintéticas de ADN o ARN de cadena sencilla que pueden unirse selectivamente a un objetivo específico (Lyu *et al*, 2021; Byun, 2021). En los últimos años han jugado un papel importante como partículas de reconocimiento en sistemas de detección, pues tienen varias ventajas sobre los anticuerpos, tales como su bajo costo, facilidad de síntesis, estabilidad, y reproducibilidad (Lyu *et al*, 2021; Byun, 2021).

Dichas propiedades han permitido que los biosensores basados en grafeno y aptámeros puedan ser empleados en la detección temprana y precisa de patógenos en gran variedad de muestras (Wang *et al*, 2009; Moayeri *et al*, 2015; Kim *et al*, 2013; Swiecki *et al*, 2006).

En particular, las infecciones por *Clostridioides difficile* (CDI) son un problema importante en los entornos de atención médica, esto debido a la capacidad de las esporas de dicha bacteria de persistir en superficies durante períodos prolongados y

resistir la desinfección (Diab *et al*, 2013; Hensgens *et al*, 2012; Connor *et al*, 2017; Edwards *et al*, 2016; Kenters *et al*, 2017; Dyer *et al*, 2019; Kochanowsky *et al*, 2022). Por lo que se necesitan sistemas de detección efectivos para priorizar los esfuerzos de control de infecciones y prevenir su transmisión.

Los métodos de detección tradicionales son insuficientes en términos de sensibilidad, y tiempo de respuesta, lo que resalta la necesidad de soluciones innovadoras que puedan abarcar dichos retos (Buggy *et al*, 1983; Arroyo *et al*, 2005; Kiersnowska *et al*, 2022). Por lo que el desarrollo de un sistema de detección para las esporas de *C. difficile* podría desempeñar un papel crucial en el mejoramiento de la gestión epidemiológica de infecciones nosocomiales en espacios hospitalarios (Landelle *et al*, 2014; Kenters *et al*, 2017; Barker *et al*, 2017).

En este trabajo, se proponen los pasos iniciales para el desarrollo de un biosensor que combine grafeno y aptámeros con dicho fin. Por lo que se caracterizó en detalle la posible interacción entre los componentes de la espora y un aptámero, así como la modificación de la superficie de grafeno con este. Finalmente, se realizó la validación de la interacción entre la espora y el sistema de detección. Siendo este el primer acercamiento a un sistema basado en esta tecnología, que esta direccionado a facilitar la detección en superficies la presencia de esporas de este patógeno.

1.1 Esporas de *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile es una bacteria Gram-positiva, anaerobia, y formadora de esporas que se encuentra en gran variedad de ecosistemas (Warriner *et al*, 2017), incluyendo el intestino de los mamíferos (Diab *et al*, 2013; Hensgens *et al*, 2012). Las esporas son el estadio dormante que le brinda la posibilidad de sobrevivir a dicha bacteria ante condiciones extremas como altas temperaturas (Connor *et al*, 2017), desecación (Edwards *et al*, 2016), desinfectantes (Kenters *et al*, 2017; Dyer *et al*, 2019) y agentes oxidantes (Kochanowsky *et al*, 2022).

Las esporas de *C. difficile* son ovaladas y miden típicamente entre 1-1.5 μm de diámetro y 1.5-2 μm de longitud. Debido a su prevalencia en superficies durante largos períodos de tiempo, las medidas efectivas de prevención y control, incluyendo protocolos rigurosos de limpieza y desinfección, son esenciales para reducir la propagación de esporas de *C. difficile* (Barker *et al*, 2017; Landelle *et al*, 2014; Kenters *et al*, 2017).

La vía principal de ingreso a su hospedero es a través de la ingesta, una vez ahí, las esporas germinan en el colon ante condiciones específicas para dar paso a la formación de células vegetativas generadoras de toxinas. Las personas inmunocomprometidas (Kassam *et al*, 2016), pacientes a los cuales se les administro antibióticos (Brown *et al*, 2020) y adultos mayores (Asempa & Nicolau, 2017; Nissle *et al*, 2016) son en especial susceptibles a la infección por *C. difficile*. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado el número de personas sin factores de riesgo que presentan alguno de los síntomas asociados a la infección, tales como diarrea, colitis y/o colitis pseudomembranosa (Hirshon *et al*, 2011; Guh *et al*, 2015).

La desinfección es un tema clave para el control epidemiológico de la dispersión de dicho patógeno a través de sus esporas. La actual recomendación de la CDC para la desinfección de superficies en contacto o posible contacto con esporas de *C. difficile* se denomina "Clean-to-disinfect". Este proceso implica primero limpiar la superficie para eliminar cualquier suciedad o residuo visible, seguido de la desinfección con un desinfectante aprobado por la EPA que sea efectivo para combatir las esporas de *C. difficile* (Carling *et al*, 2022).

A pesar de la inversión en la mejora de los procesos de desinfección, el aumento en la distribución de cepas hipervirulentas como R20291 ha generado a su vez el incremento de esporas más resistentes y resilientes a los desinfectantes comunes.

En la investigación realizada por Mashylev *et al*, 2019; se encontró que la estructura de la spora generaba una barrera más fuerte ante la presencia del hipoclorito de sodio. A su vez, González-Carballo & Rodríguez, 2021; encontraron una relación similar a la anterior, pero con el desinfectante Dicloroisocianurato de sodio. Durante este ensayo se encontró que la cepa NAPCR1/RT012/ST54 era más resistente que la cepa 630 ante la exposición de dicho desinfectante, y propusieron la hipótesis que dicha resiliencia puede deberse a un aumento en la hidrofobicidad del exosporium al evitar el ingreso de agua a su estructura, y por lo tanto la penetración de dicho compuesto.

Debido a lo anterior, existe la necesidad de focalizar los esfuerzos de desinfección para su aprovechamiento eficiente y efectivo. Sin embargo, actualmente existen pocos métodos de detección directos aplicables a las esporas de *C. difficile*. Los ensayos disponibles se basan en la captación de esporas presentes en superficies o muestras de heces a través de hisopos. Posteriormente estos se exponen ante un medio diferencial para esporas, el cual consiste en agar cefoxitina, cicloserina, fructosa enriquecida con sales biliares como colato o taurocolato (Buggy *et al*, 1983; Arroyo *et al*, 2005; Kiersnowska *et al*, 2022). Después de su inoculación en dicho medio, se incuban por 18 h en un ambiente no pre-reducido (es decir externo a la cámara de anaerobiosis), para

su posterior inserción en condiciones anaeróbicas por al menos 5-7 días para promover la germinación de las esporas presentes.

Por lo que la detección de esporas toma más tiempo que el cultivo de la célula vegetativa de manera directa. Es decir, el desarrollo de métodos de detección de esporas podría facilitar la planificación de estrategias de desinfección más focalizadas en superficies hospitalarias.

Por otro lado, entender que la alta resistencia y persistencia de las esporas es una propiedad emergente de su composición y organización estructural, es esencial para el desarrollo de nuevos sistemas de detección. Generalmente estas se componen por tres capas proteínicas y dos membranosas. Cada capa presenta una composición definida y funciones especializadas (Shen, 2020). A continuación, una descripción general de cada una (**ver Figura 1.1.1**):

Núcleo:

Dentro de esta estructura se almacena densamente la información genética junto con proteínas SASP, la cuales se encargan de proteger el ADN contra daños UV o estrés químico. El núcleo se caracteriza por su bajo contenido de agua que hace poco probable cualquier actividad enzimática durante el período de latencia. Esta característica es proporcionada por altas cantidades de calcio-ácido dipicolínico sintetizadas desde el inicio mismo de la formación de la espora. Esta estructura alberga el cromosoma bacteriano, ribosomas y otros componentes esenciales necesarios para la supervivencia y la germinación de las esporas (Lawler *et al*, 2020; Paredes-Sabja *et al*, 2014).

Membrana interna:

Esta membrana juega un papel vital como barrera. Su importancia recae en que se unen al CaDPA y funcionan como canales mecano-sensibles durante la germinación (Nerandzic & Donskey, 2013; Baloh & Sorg, 2021).

Corteza:

Esta es una capa gruesa de peptidoglicano modificado en la que se eliminan las cadenas laterales de péptidos. Durante la germinación, este péptidoglicano modificado

es el blanco para su hidrólisis específica por enzimas líticas de la corteza (CLEs), lo que asegura que las CLEs degraden la corteza y no la pared celular germinal (Kochan *et al*, 2018).

Membrana externa:

Esta membrana contiene algunas de las enzimas involucradas en la hidrólisis de la corteza (Baloh & Sorg, 2021).

Capa proteica:

Esta capa está constituida por una serie de proteínas que aseguran la supervivencia de la espora, por lo que es la más influenciada por las condiciones externas. Actúa además como una barrera para excluir moléculas tóxicas debido a la presencia de enzimas que contrarrestaran el estrés químico y oxidativo.

Sin embargo, la característica más notable de esta capa es que modula la germinación de la espora, por lo que los receptores de germinación y las enzimas hidrolíticas del córtex se encuentran mayoritariamente en esta estructura. Algunas de las hipótesis sobre su función sugieren que la gran variabilidad de esta capa es una estrategia para optimizar la respuesta de la espora a los germinantes. Las propiedades químicas y físicas del exosporium serán determinadas por el arreglo específico de esta capa (Zeng *et al*, 2022; Daniel Paredes-Sabja *et al*, 2022).

Exosporium:

El exosporium es una estructura externa que rodea la capa proteica de algunas de las esporas de *Bacillus* y *Clostridiales*. Es una estructura compleja y de múltiples capas que desempeña un papel en la adhesión, protección y germinación de las esporas. El exosporium está compuesto por varias proteínas, incluyendo en algunos casos la presencia de proyecciones similares a cabellos llamada capa de pelo (*nap – por su significado en inglés*), una capa basal y una capa media (Zeng *et al*, 2022; Daniel Paredes-Sabja *et al*, 2022).

El exosporium está compuesto por proteínas y glicoproteínas que juegan un papel en la adhesión de las esporas a las superficies y en la interacción entre la spora y el huésped durante la infección. Se ha sugerido que el exosporium actúa además como una barrera para evitar que la spora sea reconocida por el sistema inmunológico del huésped. También, se ha demostrado que algunas de las proteínas presentes en el exosporium de *C. difficile*, tales como CdeC y CdeM, están involucradas en la cadena de señales bioquímicas de inflamación requerida en la patogénesis de esta bacteria. Por lo tanto, se puede considerar al exosporium como un factor de virulencia significativo de *C. difficile* (Zeng *et al*, 2022; Daniel Paredes-Sabja *et al*, 2022).

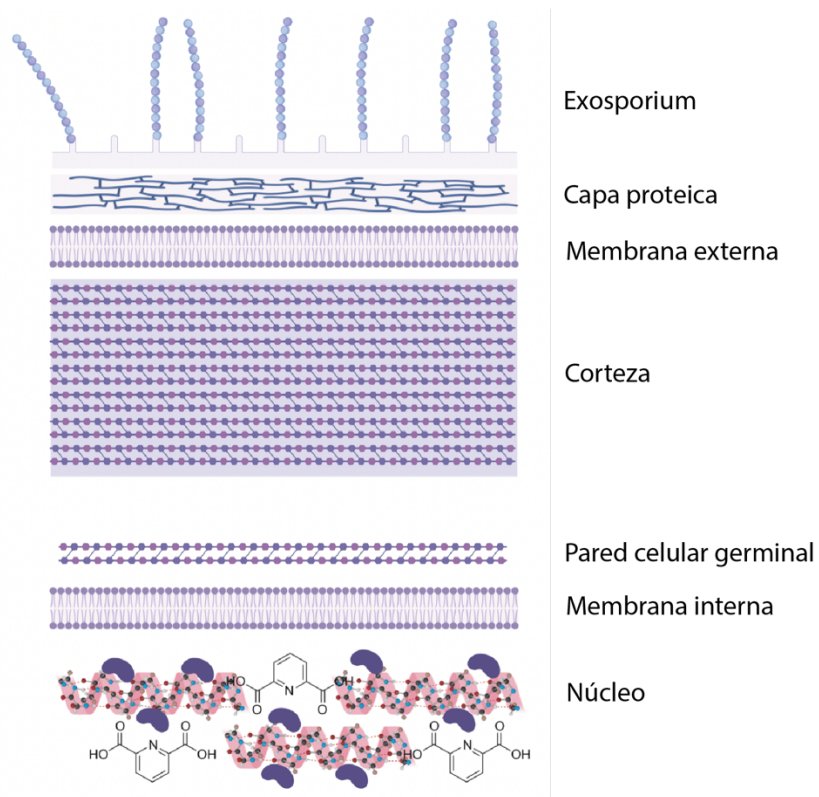


Figura 1.1. 1. Esquema de las capas constituyentes de la spora de *C. difficile*
(Imagen original realizada en Biorender e Illustrator)

1.2 Proteómica de las esporas de *Clostridioides difficile*

Los métodos de análisis del proteoma de cualquier ser vivo se pueden basar en dos enfoques diferentes: técnicas dependientes de gel o libres de gel. Cada una tiene sus propias ventajas y retos, por lo que la elección de dichas estrategias se determina según la pregunta de investigación y los recursos disponibles (Ercan et al, 2023).

Técnicas libres de gel: Estos métodos consisten en la digestión de proteínas para la generación de péptidos que posteriormente pueden ser separados a través de columnas y equipos especializados de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). La sensibilidad y la alta capacidad de procesamiento de las técnicas sin gel las hacen ideales para detectar proteínas de baja abundancia. Sin embargo, estas técnicas son más propensas a artefactos que pueden afectar la interpretación de datos y, por lo tanto, tener una tasa más alta de falsos positivos y negativos (Baggerman et al, 2005; Abdallah et al, 2012; Ercan et al, 2023).

La espectrometría de masas es el método por excelencia para el estudio y determinación de proteínas de una muestra. En específico, el Orbitrap es uno de los equipos más ampliamente usados ya que permite la detección exacta de las masas con una exactitud inferior a 1 ppm (Corrales & Calvete, 2014; Zubarev & Makarov, 2013).

A continuación, se explican las partes estructurales que componen dicho equipo y su importancia en el funcionamiento de este (**Figura 1.2.1**).

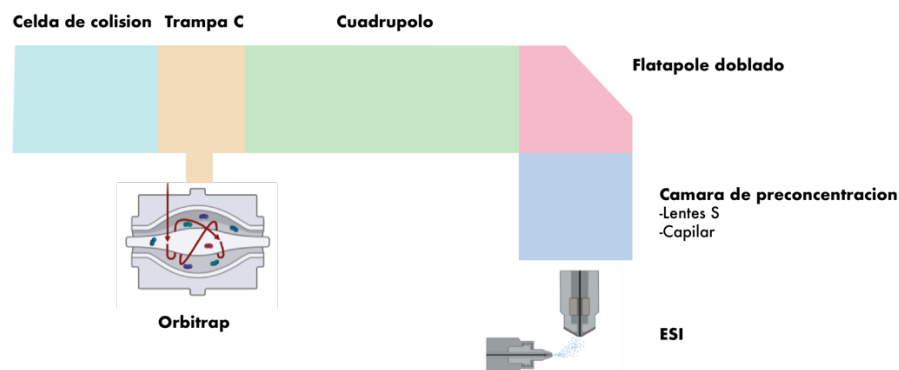


Figura 1.2. 1. Estructura general de un espectrómetro de masas Orbitrap (Imagen original realizada en Biorender e Illustrator).

Electrospray ESI: También es conocido como ESI por sus siglas en inglés, corresponde al método de ionización por el cual el analito de interés es cargado para su posterior análisis. La forma en la que ocurre dicha ionización facilita que los péptidos capturen más de una carga y pueden alcanzar distribuciones de más de 16 cargas dependiendo del peso molecular del péptido en estudio.

Cámara de preconcentración: En esta cámara se encuentra el capilar y los lentes S que corresponden a los componentes que generan la preconcentración de los iones con el fin de aumentar la sensibilidad al disminuir el tiempo de inyección. Al final de esta cámara existe una serie de electrodos que imponen un impulso inicial para que los iones logren obtener una energía cinética mínima para continuar su trayecto a lo largo del equipo.

Flatapole doblado: En esta zona inicia el sector magnético de la espectrometría de masas. Una vez que los iones entran acelerados de la cámara de preconcentración, la fuerza magnética ejercida por el imán genera la formación de una fuerza centrípeta que modifica la trayectoria de estos para entrar a la cámara del cuadrupolo. Este es el primero de los filtros del equipo pues aquellas partículas no cargadas no tendrán la misma trayectoria angular y por lo tanto no podrán continuar su paso a través del equipo.

Cuadrupolo: Esta estructura está formada por cuatro cilindros que funcionan como filtro de tamizado para iones con una relación m/z determinada para entrar a la trampa C.

Trampa C: La trampa C funciona como el filtro que concentra los iones que serán analizados por el detector Orbitrap o que seguirán su camino a través de la celda de colisión para continuar su partición en masas más pequeñas para su análisis MS/MS.

Celda de colisión: En esta celda ocurre la segunda fragmentación de los iones concentrados en la trampa C. Dicho proceso consiste en la colisión inelástica entre el ion y un gas inerte que generalmente es helio o argón.

Analizador Orbitrap: Este analizador funciona a través de la resonancia de iones y su análisis a través de Transformada de Fourier. Este consiste en un electrodo central

en forma de huso que está rodeado por otro electrodo en forma de barril para darle estabilidad a su potencial.

La mayor aceleración se alcanza en el ecuador del huso, por lo que al llegar a dicho punto, los iones tienen suficiente energía cinética para continuar hasta el extremo opuesto donde su aceleración decae y vuelven ser atraídos al ecuador de una manera periódica. Dicho comportamiento resonante sigue la ecuación (1.1.1), donde k es la constante proporcional al diferencial de potencial entre el electrodo central y el externo que lo envuelve, permitiendo el cálculo de m/z de los iones presentes en el detector.

$$\omega = \sqrt{\frac{eK}{m/z}} \quad [1.1.1]$$

Técnicas basadas en gel: La electroforesis como el SDS-PAGE o electroforesis en 2D son técnicas que separan péptidos y proteínas según su peso molecular (SDS-PAGE) o carga (Isoelectroenfoque). A través del uso de tintes o anticuerpos, las técnicas basadas en gel permiten la elucidación de interacciones de una manera menos propensa a falsos positivos o negativos como los métodos libres de gel. Sin embargo, son laboriosas, consumen tiempo, y su capacidad para detectar proteínas de baja abundancia es reducida (Baggerman *et al*, 2005; Abdallah *et al*, 2012; Ercan *et al*, 2023).

De manera general los geles de electroforesis están constituidos por poli(acrilamida) de cierta concentración según el tamaño de poro deseado. La polimerización del gel requiere de persulfato de amonio y TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina) como estabilizador radicalario. Estos geles permiten estimar el tamaño del polipéptido a través de su relación de movilidad electroforética ante el campo eléctrico aplicado (**Figura 1.1.1**). SDS-PAGE es un tipo de aplicación de esta estrategia en el que la muestra es desnaturizada generalmente por agentes reductores como el DTT (Ditiotreitol) o el 2-mercaptoetanol y el surfactante dodecil sulfato de sodio (SDS). Este último tiene como función principal no solo la estabilización de las cadenas

peptídicas sino también la de eliminar la carga intrínseca de los péptidos en cuestión (Matsumo et al, 2018; Wiesner et al, 2021).

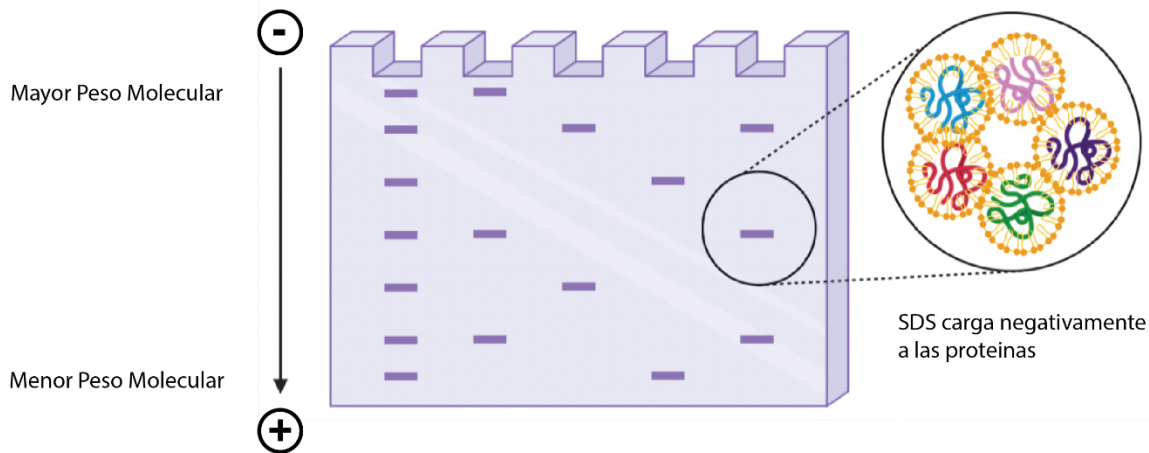


Figura 1.2. 2. Diagrama general del SDS-PAGE (Imagen original realizada en Biorender e Illustrator).

C. difficile es una especie altamente heterogénea, lo que se refleja en los escasos datos proteómicos presentes en la literatura. Dentro de los estudios de proteómica de sus esporas sobresalen:

1- **Lawley et al, 2009.** Este artículo se encuentra dentro de las primeras caracterizaciones proteómicas de las esporas de *C. difficile* 630. Durante esta investigación se compararon diferentes métodos de extracción, tales como el uso de detergente, sonicación, proteinasa K y centrifugación. Dichas extracciones fueron comparadas a través de geles SDS-PAGE, en donde **336** proteínas fueron identificadas.

Posteriormente, dichas proteínas fueron clasificadas según su clase funcional. Ellos encontraron doce nuevas proteínas que podrían estar envueltas en procesos de transporte y adhesión, que a su vez proponen como candidatos a receptores secundarios de la germinación. También, encontraron muy baja presencia de proteínas asociadas a la división celular, replicación de ADN y regulación transcripcional, lo cual implicaría que justo después de la germinación, la bacteria no tiene la capacidad de dividirse de manera eficiente, probablemente por el hecho de que invierte su energía en crecimiento y síntesis para la maduración de la forma vegetativa.

A su vez, el tipo de proteínas encontradas en mayor número fueron las abundantes en cisteínas, posiblemente involucradas en procesos de adaptación al estrés químico-REDOX y como proteínas para el mantenimiento estructural de la superficie y el ensamblaje de la espora.

2. **Díaz-González et al, 2015.** En este artículo se retoma el trabajo realizado por Lawley *et al*, 2009; pero además se optimizaron otros métodos de extracción del proteoma de las esporas de *C. difficile* 630 para obviar el uso de geles. Para realizar dicho protocolo, ellos usaron la extracción por tratamiento de tripsina, extracción por sonicación y biotinización para su posterior recuperación. Al final de dicho análisis, se encontraron **183** superfamilias de dominios proteicos que se prevén son pertenecientes al exosporium de la bacteria. Al realizar el análisis por categorías funcionales de dichos péptidos, se obtuvo que la gran mayoría pertenecían a protección ante estrés ambiental, y otras funciones no identificadas. Como era de esperar, se encontró la presencia de BclA1 y CdeM que se creen juegan un papel esencial durante la adherencia a superficies y la activación de procesos inflamatorios.

3. **Abhyankar et al, 2019.** En esta investigación también se llevó a cabo el análisis del proteoma de *C. difficile* 630. Se desarrollaron los análisis comparativos entre el proteoma de las esporas y células germinativas. Se encontraron un total de 1095 proteínas diferentes entre ambas formas de la bacteria, de las cuales **87** proteínas se encontraban mayoritariamente en las esporas.

Además, se encontró que existen marcadores moleculares que permiten la identificación específica de esporas y células vegetativas. Dentro de los marcadores exclusivos presentes en esporas, se reportó que la proteína SspA fue el marcador más abundante, así como proteínas del exosporium y de la membrana proteica. También se mencionaron otras proteínas de membrana enriquecidas en las esporas, tales como SpoVD, SpoVAC, SpoVB FtsH y DacF.

4. **Permpoonpattana et al, 2011.** En este trabajo se examinó las proteínas provenientes de las capas externas de la espora de *C. difficile*. Por lo que el método de

extracción empleado fue optimizado para extraer la capa proteica y el exosporium. El análisis se enfocó en la caracterización de cinco proteínas aparentemente pertenecientes a la capa proteica de las esporas, por lo que fueron llamadas proteínas Cot (*Discutidas en la sección anterior*). Lo importante de este ensayo es que se encontró que dichas cinco proteínas representaban solo una pequeña fracción del contenido total proteómico de las capas externas, por lo que concluyeron con la necesidad de generar nuevos protocolos para la identificación de los otros péptidos no caracterizados durante dicha investigación.

5. **Escobar-Cortés, 2013.** A lo largo de este análisis se concluyó que la capa de exosporium de las esporas de *C. difficile* puede ser eliminada mediante la digestión con agentes caotrópicos como la urea y surfactantes fuertes, tales como el SDS. Este aspecto fue importante pues al aplicar dichos tratamientos sobre la espora, se comprobó la reducción casi completa en la hidrofobicidad de esta. Como consecuencia, este artículo es uno de los primeros en los que se demuestra que las proteínas involucradas en darle la propiedad hidrofóbica a la espora se ubican principalmente en el exosporium, apoyando el papel crucial de dicha capa en la interacción con superficies bióticas y abióticas.

6. **Barra-Barrasco et al, 2013.** En esta investigación se demostró que la ausencia de la proteína CdeC produjo la ausencia o debilidad del exosporium. Por lo que la discusión se centró en la caracterización de CdeC y su papel como estructuras clave capaz de afectar la resistencia de la espora al calor y la permeabilidad de la membrana interna ante solventes como el etanol. Adicionalmente, se caracterizó desde un punto de vista morfológico el exosporium de *C. difficile* R20291, donde se describió la presencia de estructuras en forma de “fibras”, tal y como se mencionó en la sección anterior.

1.3 Biosensores

Un biosensor es un dispositivo que traduce el reconocimiento de una interacción biológica en una señal específica y medible (Naresh *et al*, 2021). Existen en general tres tipos de metodología empleada en sistemas de detección derivados de biosensores: 1) materiales nanométricos funcionalizados con moléculas biológicas (Naresh *et al*, 2021; Mondal *et al*, 2022), 2) indicadores químicos (Li *et al*, 2020) y 3) sistemas codificados genéticamente (Chapnick *et al*, 2019; Gautier *et al*, 2021).

Los componentes típicos de un biosensor son (**ver Figura 1.3.1**) (Naresh *et al*, 2021):

Partícula de reconocimiento: El elemento de detección biológico es el componente del biosensor que interactúa con el analito de interés. Puede ser una enzima, un anticuerpo, un ácido nucleico o una célula entera que reconoce y se une al analito.

Transductor: Este es el componente del biosensor que convierte la señal biológica generada por el elemento sensor a una señal medible. El transductor puede ser electroquímico, óptico, piezoeléctrico o térmico.

Sistema de procesamiento de señales: Este componente amplifica y procesa la señal medible generada por el transductor haciéndola adecuada para la detección y el análisis. Existen diferentes métodos para la amplificación, filtrado, corrección y calibración de señales que son explicados por Chapelle & Pucci, 2013.

Interfaz de usuario: Este componente presenta los resultados del análisis del biosensor al usuario en un formato fácil de entender. Puede ser una pantalla visual, una señal de audio o una salida de datos que se pueda almacenar y/o transmitir para un análisis adicional. Existen diversas formas en como los usuarios puede interactuar con los biosensores (Ye *et al*, 2022; Lindmark, 2018; Pereira, 2011). Sin embargo, estas estrategias quedan fuera del marco teórico de importancia para este documento.

En general, los componentes de un biosensor trabajan juntos para proporcionar un método de detección rápido, sensible y preciso para una amplia gama de analitos.

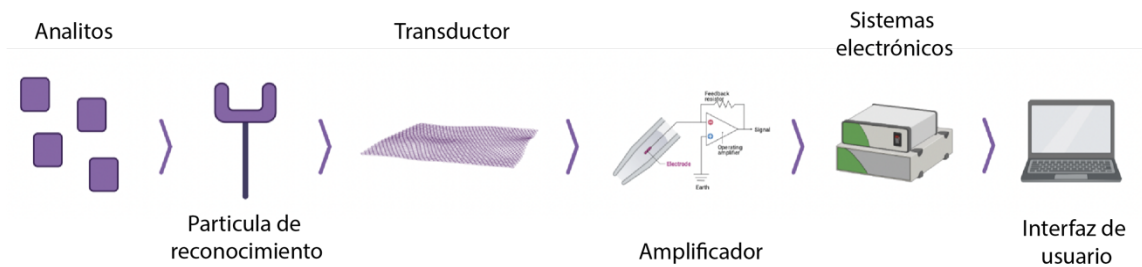


Figura 1.3. 1. Esquema de los componentes generales de un biosensor. *(Imagen original realizada en Biorender e Illustrator)*

Parte de las ventajas de los biosensores es que son sistemas modulares que una vez optimizados pueden expandirse a otras aplicaciones al cambiar la partícula de reconocimiento. Sin embargo, existen obstáculos que deben abordarse para mejorar su rendimiento y aplicabilidad. Dentro de los principales desafíos para los biosensores se encuentran:

1. Especificidad y selectividad: Este es uno de los mayores retos que presentan estos sistemas. Usualmente las interacciones biológicas tienen cierto rango de flexibilidad para el reconocimiento de familias estructurales encontradas en la naturaleza, por lo que pueden generarse falsos positivos.

Bizzotto *et al*, 2018; explica cómo la presencia de defectos en la superficie y la misma agregación de la muestra al biosensor generan problemas en la sensibilidad de la detección. A lo largo de dicha revisión bibliográfica se resalta la importancia de la caracterización de las superficies a través de AFM y la microscopía para el control de calidad del anclaje de las partículas de reconocimiento durante el desarrollo de sensores confiables.

2. Sensibilidad: Los biosensores deben ser lo suficientemente sensibles para detectar el analito de interés en bajas concentraciones. Mejorar la sensibilidad de los biosensores es un desafío especialmente para analitos que se encuentran en muy bajas concentraciones.

Por ejemplo, en la investigación presentada por Ávila *et al*, 2013; demostraron que la afinidad presentada por los biosensores basados en ADN anclados a una superficie de oro es modulada por la concentración efectiva de la partícula de reconocimiento, en lugar de la afinidad asociada a la interacción como tal. La densidad con la que el ADN está empaquetado en la superficie del sensor, que generalmente es dependiente del área superficial e incluso el volumen de esta, afectan la afinidad observada (y, por lo tanto, al límite de detección y especificidad del sensor). De hecho, la especificidad óptima solo se puede lograr en el régimen limitado por la concentración, por lo que las condiciones experimentales deben ajustarse para llevar el sensor a este estado. Es decir que las condiciones bajo las cuales se generan las curvas de calibración de los biosensores de superficie tienen que ser cuidadosamente desarrolladas tomando en cuenta la capacidad de la superficie para albergar dichos puntos de reconocimiento.

3. Estabilidad y reproducibilidad: Para proporcionar resultados consistentes y confiables, los biosensores deben ser estables y reproducibles en el tiempo. Este es un problema para los sistemas que utilizan elementos de detección biológicos que se degradan con el tiempo.

Lu *et al*, 2020; presentaron una investigación en la que emplean nano cápsulas para proteger a las enzimas que fungían como partículas de reconocimiento en su sistema de detección. Dicho grupo descubrió que al aplicar una capa delgada de polímero permeable a la glucosa sobre la enzima glucosa oxidasa permitía no solo mantener un buen rendimiento en la detección, sino que también permitía que el sistema fuera usado varios ciclos aun en condiciones con altas temperaturas y en presencia de solventes orgánicos polares. Después de 1 hora de incubación a 65°C, el biosensor retuvo el 92% de su actividad catalítica original de oxidación de glucosa. A su vez, después de la incubación en una mezcla de EtOH/agua (50:50), el sistema mantuvo el 94% de su bioactividad original. Esta

investigación es importante pues cambia el paradigma de los biosensores tradicionales, los cuales solo pueden ser utilizados en fase acuosa debido a su inestabilidad en solventes orgánicos, variaciones de temperatura y ciclos fijos de uso.

4. Interferencia: La temperatura, el pH y otros productos químicos pueden afectar el rendimiento de los biosensores al irrumpir la naturaleza biológica de la interacción requerida para la detección.

Park *et al*, 2019; demostraron que la adición de una bicapa de lípidos como barrera entre la muestra biológica y la superficie de detección puede evitar la degradación o afectación del sistema debido al efecto de la matriz, así como la posibilidad de generar señales más estables a lo largo del tiempo.

5. Integración con matrices complejas: Los analitos en matrices complejas como sangre, alimentos o muestras ambientales pueden plantear dificultades ya que la matriz puede interferir con el proceso de detección.

Sin embargo, Zhu *et al*, 2022; describieron un sistema en el que usaron un aptámero con la capacidad de inhibir a la enzima oxidasa presente en *Staphylococcus aureus*, reduciendo la posibilidad de la bacteria de oxidar Mn_3O_4 . Este grupo encontró que la funcionalización de nanopartículas de hierro paramagnéticas con el aptámero permitía el procesamiento requerido para disminuir el efecto matriz en muestras de agua de lago, agua de río, leche y muestras de pollo. Dicho biosensor permitía la detección de la bacteria a través de colorimetría, pues ante la inhibición de la oxidación no ocurría un cambio significativo en la absorbancia del medio posterior a su procesamiento.

La detección de esporas y otras estructuras pertenecientes a las bacterias del filo *Bacillota* que envuelven bacterias de la familia de los *Clostridiales* y los *Bacillales* han ganado interés en los últimos años debido a su papel activo en procesos infecciones o contaminación de alimentos. A continuación, se analizan algunos ejemplos de dichos sistemas usados para su identificación en diferentes tipos de muestras:

***Clostridium sporogenes*:**

Esta bacteria puede ser encontrada en muestras de alimentos como el queso y es altamente resistentes a las condiciones de pasteurización por su capacidad de formación de esporas. Los sistemas de detección comunes a través de medios de cultivos pueden tomar de entre 5 a 7 días, lo cual los hace ineficientes para su aplicación en procesos industriales. Shiner et al (2022), mostraron un método basado en PCR triplex para la detección e identificación de *Clostridium sporogenes*, *Clostridium butyricum* y *Clostridium tyrobutyricum*. En el que se obtuvieron límites de detección de 10^1 copias de genes específicos. Por lo que proponen el uso de este tipo de técnicas para el control de calidad de quesos y otros alimentos susceptibles a contaminaciones.

A su vez, Wang et al (2009), propusieron un método basado en la fluorescencia generada cuando se pone en contacto terbio y el ácido dipicolínico. Por lo que el método consistió en el cultivo de esporas de estas bacterias en presencia de $TbCl_3$ como germinante sustituto del calcio. Una vez que las esporas germinan, estas liberan el ácido dipicolínico produciendo una señal fluorescente medible. Sin embargo, este mecanismo de germinación es compartido entre todos los formadores de esporas, por lo que su selectividad es considerada como muy baja.

***Bacillus anthracis*:**

Posiblemente es una de las bacterias en la que se ha invertido mayor cantidad de recursos para su detección, esto debido a su alto potencial como arma biológica. Dentro de las estrategias actuales se puede mencionar la de detección de marcadores genéticos para su detección a través de PCR o secuenciación, tales como los plásmidos pOX1 y pOx2 los cuales incluyen genes para la producción de toxinas (Moayeri et al, 2015).

Sin embargo, también se han desarrollado sistemas de biosensores. Por ejemplo, el sistema presentado por Kim et al (2013), en el que se demostró que a través de sistemas GFET (**capítulo 1.4**) con aptámeros inmovilizados se pueden alcanzar límites de detección de 12 aM para las toxinas de *B. anthracis*. Además del uso de aptámeros secundarios después del primer anclaje, también mejoraron la sensibilidad al alcanzar mayores saltos de potencial derivados de la presencia de dichas proteínas en la superficie de detección.

Otro ejemplo del tipo de sistemas desarrollados es el discutido por Swiecki et al (2006). En esta investigación se generó un sistema para la detección de esporas de *B. anthracis* sin disrumpir su estructura. Para dicho objetivo se evaluó la afinidad de diferentes anticuerpos contra esporas de *B. subtilis* y *B. anthracis*. Se encontró que dentro de las proteínas más inmunogénicas fue el péptido BclA (constituyente del exosporium), posiblemente debido a su estructura constituida por secuencias repetitivas y glicosilaciones. Lo interesante de esta investigación es propone como prueba de concepto que las proteínas del exosporium tienen alto potencial de ser blancos moleculares para su uso en sistemas de detección.

A lo largo de los diferentes sistemas discutidos, se puede apreciar el incremento del uso de aptámeros para la detección de bacterias, así como su combinación con técnicas como GFET y SPR para la cuantificación. Sin embargo, un tema recurrente es la baja caracterización de la especificidad. Esto impone un reto en matrices tan complejas como las endosporas bacterianas (Vidic et al, 2020; Fischer et al, 2015).

1.4 Grafeno como transductor de señales en sistemas de detección

El grafeno es un material bidimensional compuesto exclusivamente por átomos de carbono sp^2 . Fue reportado por primera vez por Novoselov en el 2004 (Novoselov et al, 2004); en dicha publicación se demostró la existencia de una capa proveniente del grafito que presentaba alta conductividad eléctrica ante un potencial de voltaje aplicado a temperatura ambiente.

Dichas propiedades descritas se deben a su estructura de banda prohibida de 0 eV, lo que le permite conducir portadores de carga sin masa tales como electrones (negativos) o huecos (positivos) a una alta velocidad (Novoselov et al, 2004).

Las propiedades físicas de este material lo hacen de gran interés para el desarrollo de sistemas de detección. Una de sus características más importantes es su alta área de superficie (Talat et al, 2019; Moulick et al, 2022), la cual permite el anclaje de un gran número de biomoléculas en su superficie.

Debido a esta versatilidad, se pueden desarrollar de manera modular sensores ante diferentes blancos, cambiando solo la particular de reconocimiento (Bonanni et al, 2012; Salavagione et al, 2020; Li et al, 2016). A su vez, una alta área de superficie proporciona una la disminución de interferencias, lo que resulta en biosensores altamente sensibles.

El grafeno también es un excelente conductor de electricidad, lo que lo hace ideal para crear biosensores electroquímicos (Balandin et al, 2008; Boyda et al, 2016, Samuels et al, 2015; Lu et al, 2018). Los biosensores electroquímicos utilizan la transferencia de electrones entre la superficie del sensor y las biomoléculas para detectar analitos específicos (Wu et al, 2022; Oliveira et al, 2022; Lu et al, 2021). La transparencia óptica del grafeno es otra propiedad que lo hace adecuado para aplicaciones de biosensores. Los biosensores ópticos utilizan la luz para detectar cambios en el entorno circundante, como cambios en el índice de refracción debido a la presencia de biomoléculas específicas. La transparencia óptica del grafeno permite el desarrollo de biosensores ópticos en donde se envuelven efectos como la fluorescencia (Gao et al, 2021; Zhang et

al, 2015; Ji *et al*, 2022). Esto a su vez, permite la medición simultánea de electricidad y óptica que en muchos sistemas es requerida para encontrar una correlación entre ambas respuestas. Por ejemplo, Jeong *et al*, (2022); demostraron que a pesar de que en la superficie de grafeno ocurrieran reacciones redox, el índice de refracción del material se mantenía estable y por lo tanto lograron realizar mediciones electroquímicas y colorimétricas simultáneamente entre disoluciones de hierro azul Prusia ($\text{KFe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6$) y blanco Prusia ($\text{NaKFe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6$).

1.4.a Métodos de obtención de grafeno

Uno de los retos para la aplicabilidad del grafeno a gran escala son sus limitaciones para ser producido en alta calidad en masa. En la Figura 1.4.1, se pueden observar tres de las estrategias más usadas en la actualidad para la producción de grafeno (Sumdani *et al*, 2021; Urade *et al*, 2023).

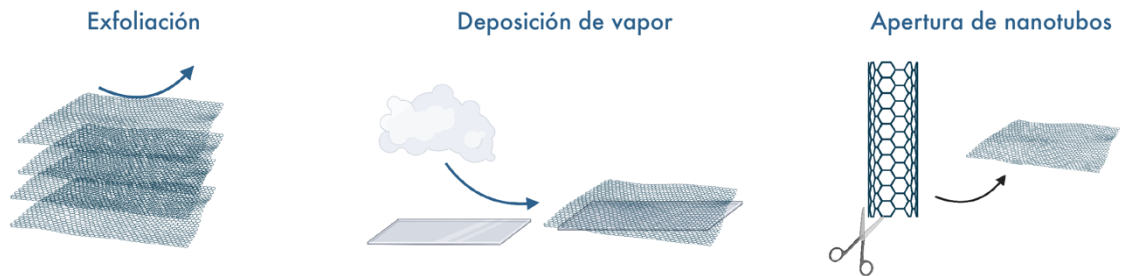


Figura 1.4. 1. Estrategias de producción de grafeno a gran escala (*Imagen original realizada en Biorender e Illustrator*).

Dentro de las estrategias que más sobresalen por la calidad del grafeno generado son:

Exfoliación a partir del grafito:

Esta técnica consiste en separar capas finas de grafeno que se encuentran en las superficies lisas del grafito (Large *et al*, 2020). Se puede llevar a cabo de manera mecánica a través de una cinta adhesiva para despegar las capas de grafito (Yi *et al*, 2015) de manera química usando agentes oxidantes como el permanganato de potasio (Betancur *et al*, 2018; Xia *et al*, 2020), o la expansión térmica que requiere de cambios

de temperatura bruscos para provocar el desprendimiento de capas (Wang *et al*, 2018; Zhou *et al*, 2019).

Deposición química en fase vapor:

La deposición química de vapor (CVD *por sus siglas en inglés*) es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para producir grafeno de alta calidad (Pezzini *et al*, 2020). Consiste en la descomposición de un gas de hidrocarburos (como el metano) a altas temperaturas (Wang *et al*, 2018; Wang *et al*, 2023), para posteriormente promover su deposición sobre una capa delgada de metal (generalmente cobre o níquel). Dicho sustrato actúa como catalizador a altas temperaturas para promover la formación del arreglo en forma de hexágono del grafeno (Wang *et al*, 2018; Wang *et al*, 2023).

1.4.b Ventajas del grafeno para su uso en el desarrollo de sistemas de detección

El grafeno presenta varias ventajas para el desarrollo sistemas de detección. En primera estancia, su alta relación área superficial-volumen y su alta conductividad eléctrica lo convierten en un material ideal para la detección. Seguidamente, el grafeno es extremadamente sensible a los cambios en su entorno, lo que lo convierte en un material ideal para detectar diversos tipos de sustancias analíticas (Chen *et al*, 2022; Verma *et al*, 2022). En tercer lugar, las propiedades electrónicas únicas del grafeno permiten una detección rápida y precisa de analitos, lo que lo hace adecuado para el monitoreo en tiempo real.

Posteriormente, la excepcional resistencia mecánica y flexibilidad del grafeno permiten la creación de sensores extremadamente duraderos y robustos lo cual le confiere alta versatilidad en sus aplicaciones (Akinwande *et al*, 2016; Papageorgiou *et al*, 2017). Por último, el grafeno es compatible con una variedad de funcionalizaciones, lo que permite tener una alta variedad de objetivos de detección específicos (Bonanni *et al*, 2012; Salavagione *et al*, 2020; Li *et al*, 2016).

Sin embargo, también existen retos en el empleo de este material. La falta de un método estandarizado y escalable para producir grafeno de alta calidad es uno de los mayores obstáculos. Esto puede provocar una variabilidad y falta de consistencia en el rendimiento del sensor (Shahriari *et al*, 2021).

Otro problema es la propensión del grafeno a interactuar fuertemente con otros materiales, lo que resulta en señales de fondo no deseadas y una reducción de la sensibilidad. Además, el grafeno es sensible a factores ambientales como la humedad, lo que puede afectar sus propiedades eléctricas e impedir la detección (Zou *et al*, 2017; Stulik *et al*, 2022).

Wu *et al*, (2022); demostró que también el óxido de grafeno puede generar interacciones inespecíficas con superficies biológicas (como por ejemplo con la bacteria *Pseudomona aeruginosa*) y los oxígenos del ácido carboxilo de la superficie. Es por esto por lo que la optimización de fuerza iónica y presencia de sales debe ser modulada de manera estricta.

A su vez la funcionalización de la superficie debe ocurrir de manera completa, pues si existe la presencia de espacios no ocupados por la partícula de reconocimiento se corre el riesgo de interacciones inespecíficas debido a estos efectos. Para superar estas limitaciones, deben desarrollarse nuevas técnicas de fabricación y diseños de dispositivos.

Finalmente, la comercialización de sistemas de detección basados en grafeno se ve afectada por obstáculos significativos como los altos costos de producción, la aprobación regulatoria y la competencia con tecnologías establecidas.

A pesar de estas dificultades, la investigación y el desarrollo en curso tienen como objetivo abordar estos problemas y desbloquear el potencial de los sistemas de detección basados en grafeno en una variedad de aplicaciones (Amiri *et al*, 2018; Shafiee *et al*, 2022).

1.4.c Métodos de caracterización de superficies de grafeno

Para comprender su estructura, propiedades y posibles usos se deben realizar caracterizaciones espectroscópicas exhaustivas de las superficies de grafeno y sus derivados. Dentro de dichas técnicas de caracterización se encuentran:

Espectroscopía Raman: Esta es una técnica no destructiva que puede revelar las características estructurales del grafeno, como el número de capas y defectos. Las bandas más características incluyen (Ni *et al*, 2008; Liu *et al*, 2013; Giegold *et al*, 2020) (ver **Figura 1.4.1**):

Banda G: Esta es la señal Raman más prominente en el grafeno, el cual corresponde al modo vibracional en el plano de los átomos de carbono sp^2 . La banda G es una medida de la calidad de este y su intensidad es proporcional al número de capas en la muestra. Esta banda también tiene características especiales en el caso del óxido de grafeno, usualmente es una señal más ancha y presente en frecuencias más bajas debido a la presencia de oxígenos en grupos funcionales como hidroxilos (-OH) o ácidos carboxílicos (-COOH).

Banda 2D: La banda 2D es la segunda señal Raman más intensa en el grafeno. Es una medida del número de capas, grado de cristalinidad y ordenamiento del apilamiento en un proceso de doble resonancia de dos fonones. Al igual que la banda G, esta también suele encontrarse en frecuencias más bajas en el caso del óxido de grafeno por la presencia de grupo funcionales con oxígeno.

Banda D: Esta señal es generada por defectos en el grafeno que corresponden a los modos vibracionales de los átomos de carbono híbridos sp^3 , vacantes o bordes. La intensidad de esta es frecuentemente utilizada como un parámetro de control de calidad. En el caso del óxido de grafeno, esta señal incrementa por la presencia de los grupos hidroxilos y ácidos carboxílicos, por lo tanto, a mayor grado de oxidación mayor grado de desorden en la superficie. En el artículo presentado por Liu *et al*, 2013; demostraron que la intensidad de esta banda depende en gran medida de la capacidad

de acarrear densidad de carga en la superficie, por lo tanto, la señal decrece por la presencia de dopaje en la superficie.

Banda G': Esta es una señal Raman que ocurre a una frecuencia ligeramente más alta que la banda G. Corresponde al modo fonónico óptico transversal del proceso de dos fonones y se utiliza para medir la tensión en el grafito.

Otras señales: La espectroscopía Raman también puede detectar otros picos relacionados con la simetría y la funcionalización del material, además de los mencionados anteriormente. Como ejemplo, señales **D+D'** que corresponde a la señal inducido por el desorden o presencia de defectos en la superficie y la señal **2D'+G** que aumenta en intensidad por la funcionalización de dicha superficie. En la investigación realizada por Giegold et al, 2020; se demuestra que esta última banda mencionada representa efectos electrónicos dependientes de la temperatura. Esto tiene que ver con el hecho que a altas temperaturas las poblaciones de fonones en la superficie varían debido a la eficiente interacción electrón-electrón, que a su vez puede generar alteraciones en las mediciones deseadas.

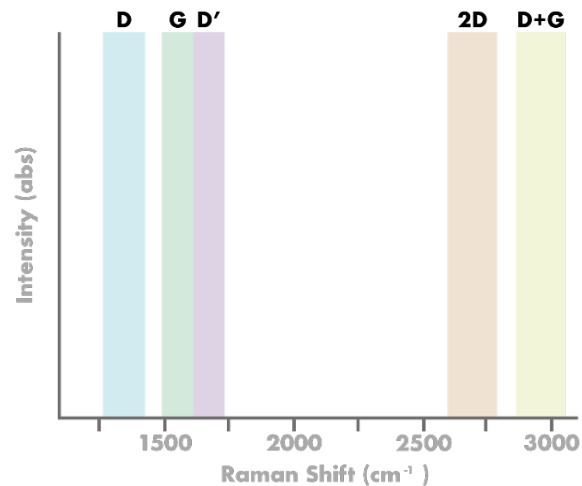


Figura 1.4. 2. Regiones representativas de señales RAMAN en grafeno (Imagen original realizada Illustrator)

Microscopía electrónica de barrido (SEM): La morfología y topografía de las superficies de grafeno pueden estudiarse utilizando SEM. SEM utiliza un haz de electrones para crear imágenes de alta resolución de la superficie, y también puede usarse para el análisis elemental. Durante ese procedimiento se busca el análisis morfológico y topográfico de la superficie a través de la captura de imágenes de alta resolución (Park *et al*, 2012; Grodecki *et al*, 2016; Huang *et al*, 2018).

También, se puede llevar a cabo el análisis elemental en la superficie. El uso de la espectroscopia asociada a rayos X dispersivos de energía (EDS), se pueden obtener espectrogramas de metales que podrían estar presentes en la lámina de grafeno o en su sustrato (Brintlinger *et al*, 2020). El uso de esta técnica y su aplicabilidad depende de diversos factores que deben ser optimizados cuidadosamente, tales como la energía del haz de electrones, la preparación de la muestra que terminan siendo destructivas de la superficie.

Microscopía de fuerza atómica (AFM): AFM puede proporcionar imágenes de alta resolución de la superficie de grafeno, así como mediciones de topografía y rugosidad de la superficie (Pérez *et al*, 2019; Zhu *et al*, 2020). Para escanear la superficie, AFM utiliza una punta afilada en un cantiléver y puede proporcionar información sobre el grosor y la estructura del grafeno. Este método permite determinar la rugosidad de las superficies de grafeno (Zhu *et al*, 2020). La rugosidad de la superficie tiene un impacto en las propiedades electrónicas del grafeno, lo que la convierte en un parámetro crítico para medir.

El AFM puede medir la rugosidad en una variedad de escalas de longitud, desde nanómetros hasta micrómetros (Panigrahi *et al*, 2012). Otra variable que puede ser caracterizada es el potencial de superficie. Dicho parámetro influye en la interacción del grafeno con otros materiales, así como en sus propiedades electrónicas (Lang *et al*, 2020). La medición se enfoca en calcular la fuerza de atracción entre la sonda y la superficie, usualmente la punta del AFM es funcionalizada con un grupo funcional que permita medir dicha interacción.

Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS): La composición elemental y el estado químico de las superficies de grafeno se pueden determinar utilizando la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS). XPS mide la energía de los electrones liberados de la superficie, lo que se puede utilizar para identificar enlaces químicos y grupos funcionales en la superficie. El análisis de XPS puede revelar la presencia de señales significativas cuando el grafeno contiene elementos tales como N, P, C o S (Jia *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2013; Susi *et al*, 2015; Chiticaru *et al*, 2019)

Nitrógeno (N): La energía de enlace del pico N 1s en el análisis de XPS puede revelar información sobre el tipo de grupo funcional de nitrógeno presente en el material basado en grafeno. Por ejemplo, si la energía de enlace está alrededor de 398-400 eV, indica nitrógeno piridínico, mientras que una energía de enlace de 401-403 eV sugiere nitrógeno pirrólico (Kim *et al*, 2021).

Fósforo (P): Cuando se analiza mediante XPS, la energía de enlace del pico P 2p se puede utilizar para determinar el estado químico del fósforo en el material basado en grafeno. Por ejemplo, una energía de enlace alrededor de 131-133 eV se asocia con la presencia de grupos fosfato, mientras que una energía de enlace de alrededor de 129-130 eV se asocia con la presencia de grupos fosfina (Kim *et al*, 2018).

Carbono (C): El pico de carbono en el análisis de XPS puede revelar información sobre la estructura del grafeno y cualquier impureza o grupo funcional presente. La energía de enlace del pico C 1s puede indicar la presencia de grupos funcionales que contienen carbono-oxígeno, como grupos carbonilo, o carboxilo (Al-Gaashani *et al*, 2019; Kwan *et al*, 2015). La forma del pico de carbono también puede revelar cuánto desorden hay en la estructura del grafeno.

Azufre (S): La energía de enlace del pico S 2p en el análisis de XPS puede proporcionar información sobre el estado químico del azufre en el material basado en grafeno. Por ejemplo, los grupos tiol tienen una energía de enlace de 162-164 eV, mientras que los grupos sulfóxido tienen una energía de enlace de 167-169 eV (Kim *et al*, 2018).

Microscopía de transmisión electrónica (TEM): Se puede utilizar para estudiar la estructura atómica y las imperfecciones del grafeno.

TEM utiliza un haz de electrones de alta energía para atravesar la muestra de grafeno, proporcionando información sobre el número de capas, estructura cristalina y defectos (Stobinski et al, 2014).

A través del patrón de difracción obtenido de una imagen de TEM se puede abstraer información sobre la orientación y disposición de las capas de grafeno en un material específico. A su vez, el número de capas en el material también puede ser determinado midiendo el contraste y el espaciado entre capas adyacentes (Meyer, 2014). Al igual que el SEM, se pueden determinar vacantes, y dislocaciones en la superficie. Debido a que estos defectos pueden tener un impacto significativo en las propiedades mecánicas y electrónicas del grafeno, su detección es crucial para comprender el comportamiento del material (Xu *et al*, 2011; Meyer, 2014).

1.4.d Perspectivas de las aplicaciones de grafeno en sistemas de detección

Las aplicaciones prácticas de los sistemas de detección basados en grafeno y sus derivados han aumentado exponencialmente. Sin embargo, existen tres metodologías de uso para el desarrollo de biosensores que son las más usadas.

Los biosensores de transistor de efecto de campo de grafeno (GFET), son sistemas basados en el desarrollo de un transistor de grafeno que se utiliza como elemento de detección (Moulick *et al*, 2022). El biosensor GFET se crea depositando una lámina de grafeno sobre un sustrato aislante como el SiO₂ (ver **Figura 1.4.2**).

Posteriormente, se realiza la funcionalización de la superficie con la partícula de reconocimiento específica. Cuando el analito objetivo se une a la biomolécula en la superficie de grafeno, el transistor mide la conductividad eléctrica de la superficie. Los biosensores GFET tienen alta sensibilidad y selectividad, además de la capacidad de detectar biomoléculas en pequeñas cantidades.

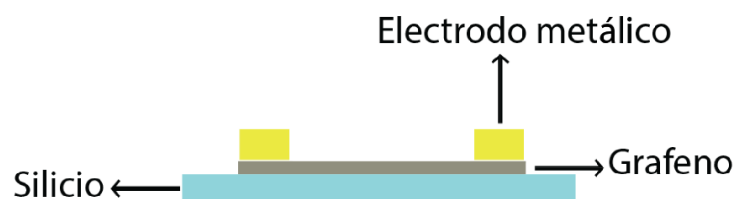


Figura 1.4. 3. Esquema general de un sistema basado en GFET (Imagen original realizada Illustrator).

Un ejemplo de biosensores basados en GFET es el descrito por Ban et al, 2022; donde usan dicho efecto para la detección y cuantificación del virus SARS-CoV-2 a través de su interacción con aptámeros anclados en la superficie de grafeno. Lo importante de este sistema es que alcanzó límites de detección en el rango de fM y nM, según la secuencia del aptámero usada. Dichos valores fueron comparables a los requeridos por la FDA, lo cual implica que el sistema tenía un rendimiento comparable con otros sistemas considerados más robustos para la detección del virus, como PCR.

También se han desarrollado los biosensores basados en propiedades electroquímicas. El principio de su funcionamiento se basa en la reacción REDOX en la superficie del grafeno que permita la transferencia de electrones en el sistema. Por lo tanto, usualmente en el desarrollo de este tipo de sensores se usan enzimas que ante una reacción pueda generar metabolitos que puedan generar la transferencia de electrones.

Un ejemplo representativo de dicho sistema es el arreglo de electrodos presentado por Chansaenpak *et al*, 2021; en el que un ánodo de óxido de grafeno fue funcionalizado con la enzima glucosa deshidrogenasa para generación de gluconolactona a través de la reducción de NAD^+ a NADH , que genera el movimiento de electrones. Por otro lado, el cátodo compuesto por ácido 1-pirenobutírico N-hidroxisuccinimida ester contiene la enzima glucosa oxidasa, que genera gluconolactona y H_2O_2 , posteriormente el peróxido de hidrogeno reacciona con la peroxidasa colocada en el medio para movilizar electrones a través del sistema.

También es posible realizar detección a través de fluorescencia. Li et al, 2022; usaron un sistema de aptámeros con “dots” de carbono funcionalizados con nanopartículas de oro y óxido de grafeno para la detección de glipican-3; un marcador molecular de carcinoma de hígado. A través de un sistema de detección FRET lograron cuantificar dicho analito en un rango de 5-100 ng/mL de suero humano.

Otra posibilidad es el desarrollo de sistemas de detección SPR (resonancia de plasmón de superficie), como el presentado por Daher et al, 2022; en el que se anclan moléculas al óxido de grafeno para posteriormente colocar la muestra y ver cambios en la luz reflejada después de atravesar un prisma. Lo importante de este tipo de sistemas es que no solo permite la cuantificación y detección del analito, sino que también se pueden determinar constantes de interacción entre la muestra y lo anclado en el óxido de grafeno. En este caso en particular, el grafeno corresponde como una estructura clave para promover dicho anclaje, pero a su vez manteniendo la transparencia en la estructura para no intervenir en procesos de reflectancia requerido para el análisis.

1.5 Aptámeros como partículas de reconocimiento para el desarrollo de biosensores

Los aptámeros son cadenas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) de cadena simple o doble cuya composición varía entre 20-100 nucleótidos. Su nombre proviene de aptus (latín) refiriéndose a encaje y mers (griego) refiriéndose a porción, es decir “porción que encaja”. Dicha definición es apropiada en el contexto que los aptámeros cambian el paradigma simplista de considerar que los ácidos nucleicos “solo” transfieren información genética en su código, sino que también como se ha demostrado en virus (Chapman et al, 1995; Ogunbunmi et al, 2021) y más adelante en organismos más complejos (Wu et al, 2016; Harami et al, 2020), pueden modular la actividad de proteínas actuando como ligandos.

Uno de los métodos para seleccionar/enriquecer aptámeros se denomina SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial como traducción al español*). Dicho método se basa en las metodologías de la química combinatoria, donde se parte de bases de secuencias aleatorias de entre 10^{14} - 10^{15} , y a través de la interacción de exposición al blanco de interés, elución, purificación y amplificación se obtiene una secuencia con alta probabilidad de interacción (Lyu et al, 2021; Byun, 2021).

Existen dos estrategias para el paso de exposición al blanco de interés, estas consisten en la exposición a la completa estructura biológica o al blanco específico de interés. La elección de dichas estrategias genera cambios metodológicos a lo largo del resto de pasos, tales como la consideración de la solubilidad del blanco en la disolución amortiguadora o la posibilidad de interactuar con epítomos complejos y poco direccionados que dificulten su posterior mecanismo de acción (Lyu et al, 2021; Moon et al, 2015).

Canoura et al, 2021; demostró que después del proceso de selección usualmente las secuencias resultantes presentan afinidad y especificidad subóptima que puede ser mejorada a través de un proceso post-SELEX. Dicho proceso incluye la modificación

química de ciertos pares de bases y la evaluación del incremento o decrecimiento de su afinidad a través de SPR. A su vez, las herramientas computacionales son parte fundamental del análisis de aptámeros a lo largo del proceso, pues a través de modelos pueden evaluar las formas de anclaje más probables y como optimizar dicha interacción.

El proceso de elución y purificación del aptámero generalmente consiste en la interrupción de la interacción con el blanco deseado, para su posterior procesamiento de amplificación y clonaje. Este último consiste en la copia exponencial a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para aumentar la concentración de dicha secuencia en específico (Lyu et al, 2021). Ese proceso de elución, purificación y amplificación se repite de entre 4-20 veces, donde además se suele incrementar las condiciones desnaturalizantes del buffer de interacción para forzar constantes de interacción óptimas (Kong et al, 2015).

Es importante recalcar que lo que se optimiza a lo largo del proceso SELEX es la estructura tridimensional que adopta dicha cadena de nucleótidos en las condiciones determinadas de dicho experimento. Esto por cuanto la interacción es mayoritariamente determinada por dominios estructurales como *loops*, *hairpins*, *bulges*, u otras conformaciones (Darfeuille et al, 2016; Sullivan, 2019) y modulada por fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrogeno, interacciones electrostáticas o salt-bridges (Cai et al, 2018).

Los métodos de validación de blanco son técnicas que infieren información del blanco molecular o modos de interacción entre la cadena de ácidos nucleicos y la proteína o blanco específico. Dentro de las más usadas se encuentran los marcajes moleculares o aquellos sin marcaje (Thevendran and Citartan, 2022).

Según Thevendran y Citartan (2022), dentro de las técnicas que envuelven la presencia de marcadores moleculares para el estudio de interacciones aptámero-proteína, se encuentran:

Detección de fluorescencia: Los aptámeros pueden ser fácilmente marcados con estructuras fluorescentes como Alexa o Fluoresceína. Una vez que se dispone la interacción se pueden llevar a cabo la detección de dicha señal por medio de experimentos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Dicho método implica la presencia de fluoróforos donantes y aceptores, que dependiendo de la distancia entre ellos varía la intensidad en el espectro de emisión de estos (Wlodarczyk et al, 2008). Un ejemplo esta aplicación fue desarrollada por Gerhard and Hennig, 2021; donde modificaron el aptámero comercial de RNA “*spinach*” para generar la interacción con una proteína marcada con el fluoróforo *mCherry*. Una vez que se generaba la interacción, la longitud de onda de emisión se desplazó hacia la longitud de onda esperada para *mCherry* debido al complejo formado.

Pruebas enlazadas a enzimas: Las pruebas enlazadas a enzimas emplean un aptámero o molécula de destino etiquetada con una enzima (Pawel et al, 2022). La quimioluminiscencia es una estrategia de revelado que consiste en la emisión de una señal como resultado a una reacción química. La peroxidasa de rábano picante (*HRP – Horseradish peroxidase* por sus siglas en inglés) cataliza una de las reacciones más usadas para la detección de interacciones, la cual consiste en la oxidación del luminol para generar una emisión a los 488 nm (Alegría-Schaffer, 2014) (**Figura 1.5.1**).

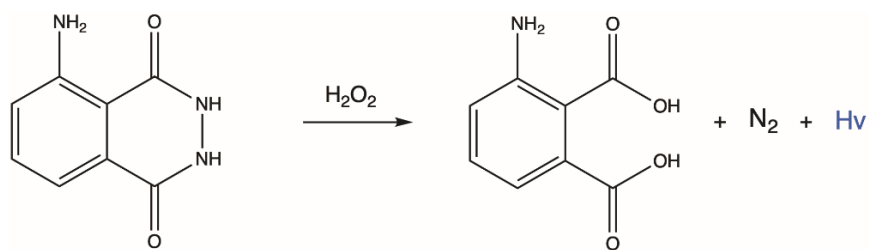


Figura 1.5. 1. Reacción de luminol catalizada por la peroxidasa de rábano picante.

El ensayo de oligonucleótido enlazado a enzima (ELONA) es un ejemplo, en el que la molécula de destino está inmovilizada en un soporte sólido y el aptámero está conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP en inglés). Por lo que la actividad de la enzima HRP se utiliza para determinar si el aptámero se ha unido a la molécula de destino.

Un ejemplo de este tipo de sistemas es el descrito por Shola and Kanayeva, 2022; donde ejecutaron dos tipos de ELONA, uno de detección directa y otro indirecto para la detección y cuantificación del virus SARS-CoV2. En el sistema de detección directa, proteínas recombinantes del “spike” del virus fueron inmovilizadas para su posterior interacción con un aptámero de ssDNA biotinilado. Posterior a dicha incubación, se agregó estreptavidina-HRP, en la que la sección de estreptavidina generó un complejo de alta especificidad y fuerza con la biotina del aptámero, y el HRP generó una reacción fluorométrica capaz de ser detectada. Este tipo de agentes de interacción y reacción para la generación de señales son los más usados, y se ha expuesto en diferentes tipos de sistemas (Cheng et al, 2021; Dortz et al, 2021; Fazrin et al, 2021)

Ensayos de inmunoprecipitación: El uso de partículas magnéticas conjugadas con aptámeros es un ejemplo de estrategias de inmunoprecipitación. La molécula de destino se agrega a la muestra, y las partículas magnéticas unidas al aptámero se capturan usando un imán o una interacción derivada de la unión entre la biotina y la estreptavidina en el caso de aptámeros biotinilados (**Figura 1.5.2**). El lavado elimina las moléculas no unidas, y el complejo aptámero-blanco molecular se eluye y se detecta utilizando diversas técnicas como PCR, geles de electroforesis o espectrometría de masas (Bahreyni et al, 2021; Xi et al, 2022).

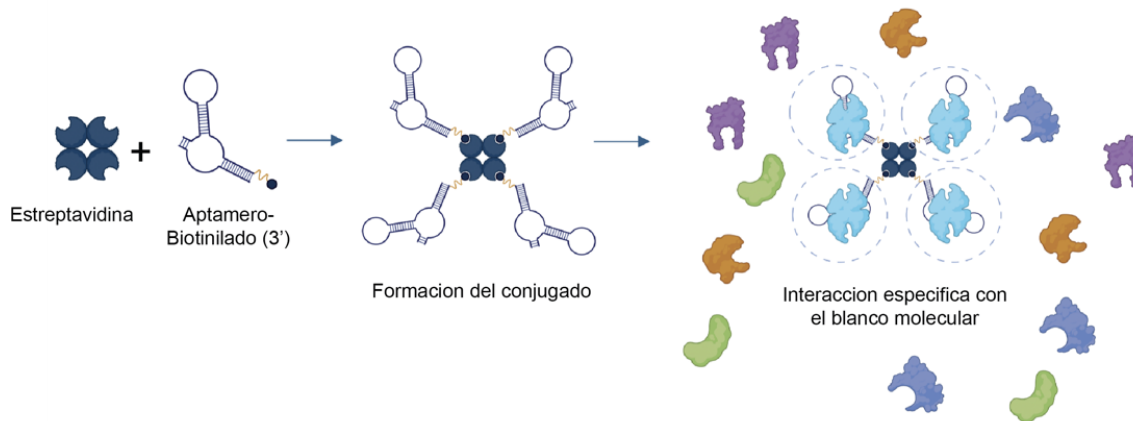


Figura 1.5. 2. Diagrama del método de inmunoprecipitación utilizando el enlace biotina/estreptavidina (*Imagen original realizada en Biorender e Illustrator*).

Esta estrategia de análisis permite la fácil modificación de la partícula de reconocimiento para la detección de diferentes blancos moleculares. Un ejemplo de esto fue la investigación de Fellows et al, 2020; donde llevaron a cabo la optimización y desarrollo de múltiples secuencias de aptámeros para la detección de células de mamíferos, con especial interés en el reconocimiento del marcador linfocítico CD4. Por medio del uso de partículas magnéticas modificadas con estreptavidina realizaron el SELEX de las secuencias de oligonucleótidos, con el fin de solo elegir aquellas partículas cuyos valores de difusión lateral se vieran alterados por la presencia del complejo CD4-aptamero.

Western blot: Se pueden emplear dos tipos de estrategias, los análisis en 1-Dimensión (1D) y los de 2-Dimensiones (2D) (Corrales & Calvete, 2014). Los análisis de Western Blot 1D corresponden al uso de los mismos tipos de geles SDS-PAGE (*Discutidos en el capítulo 1.2*) para su posterior transferencia a una membrana de PDVF. Dicha membrana funciona como un sustrato de estabilización para realizar los ensayos de interacción y revelado según el método elegido (**Figura 1.5.3**).

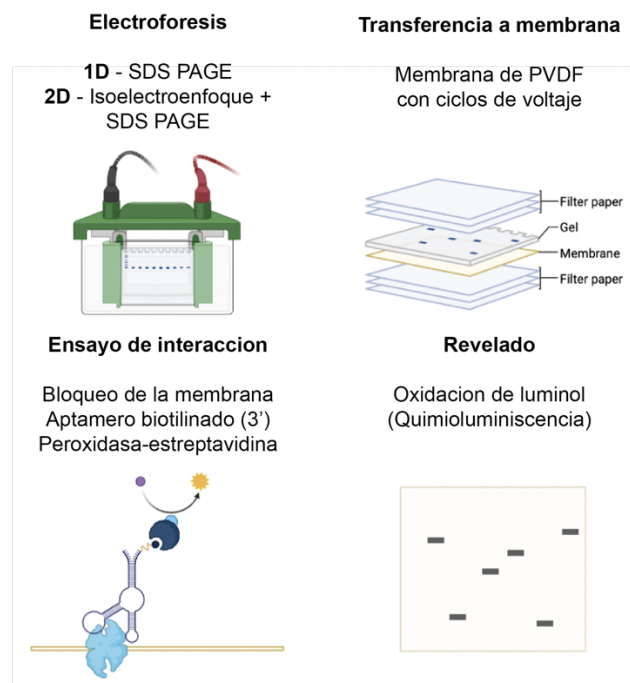


Figura 1.5. 3. Esquema general del proceso de Western Blot para el análisis de interacciones (*Imagen original realizada en Biorender e Illustrator*).

Por otra parte, cuando existen mezclas complejas de péptidos es recomendable la realización del análisis 2D (Corrales & Calvete, 2014). El Western Blot 2D corresponde a la separación de los péptidos a partir de su punto isoeléctrico y posteriormente a partir de su masa molecular. Por lo tanto, el primer paso requiere de la técnica del Isoelectroenfoque. Dicha técnica consiste en la adición de la muestra en una tira de gel especializada (IPG) que contiene anfolitos. Estos anfolitos son polímeros inmovilizados con una cantidad determinada de grupos amino y carboxílicos que permiten la separación de péptidos según su punto isoeléctrico debido a las cargas que poseen (Tran et al, 2008) (**Figura 1.5.4**).

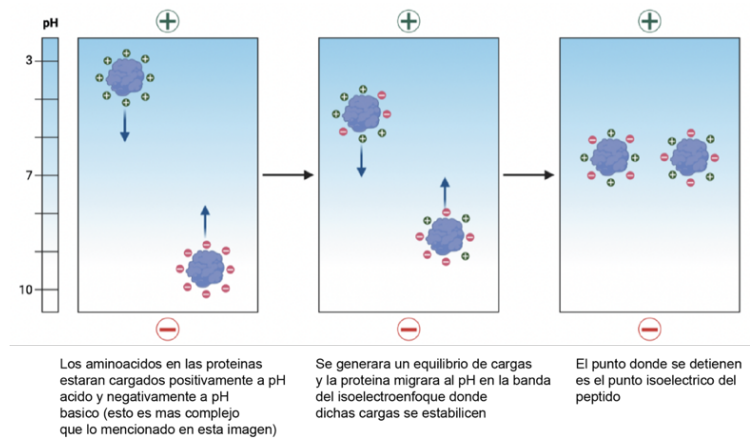


Figura 1.5. 4. Isoelectroenfoque de péptidos según su punto isoeléctrico debido a los anfóteros en el gel especializado (*Imagen original realizada en Biorender e Illustrator*).

Adicionalmente, también es posible detectar las interacciones del aptámero con su blanco sin necesidad de marcaje. Algunos ejemplos de este subgrupo de estrategias se detallan en Thevendran and Citartan (2022):

Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR): La SPR es una técnica de biosensores que no requiere el marcaje de las estructuras involucradas (Horackova *et al*, 2017). Dicho método detecta cambios en el índice de refracción cerca de una superficie de metal que normalmente es oro.

En un experimento usual de SPR, el aptámero se inmoviliza en una superficie, y se inyecta la muestra que contiene la molécula objetivo sobre la superficie. La unión del aptámero a la molécula objetivo provoca un cambio en el índice de refracción, que puede medirse en tiempo real. La cinética y la afinidad de la interacción del aptámero son valores que pueden ser calculados a través de este ensayo.

Wang and Li, 2022; llevaron a cabo la optimización de un sistema de detección de marcadores moleculares de la inflamación en células cardiacas, en la que usaron el anclaje de aptámeros en una placa de oro y sistemas de microfluídica para detectar proteína C reactiva y troponina I cardiaca, las cuales elevan su concentración durante episodios de enfermedades cardiovasculares. Lo interesante de este ensayo es que a través de SRP demostraron que la densidad de aptámero por cm^2 de lámina de superficie

tiene el potencial de incidir negativamente en los límites de detección tanto cuando la densidad es muy alta o baja.

Adicionalmente, se analizó el efecto de la densidad de modificación de superficie puede tener un impacto en la interacción a través de fenómenos de repulsión estérica o la interacción entre cadenas de aptámeros en vez del plegamiento como ssDNA. Por lo tanto, esta técnica no solo permite el estudio de fuerza de interacción, sino que a su vez permite el entendimiento del mecanismo de interacción entre la partícula de reconocimiento y el blanco molecular.

Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS): Este método detecta los cambios en las propiedades eléctricas de una superficie al unirse una sustancia objetivo (Bogomolova et al, 2009). Funciona bajo un mecanismo similar al SRP, donde el aptámero se inmoviliza en una superficie de electrodo de oro, y se agrega la muestra que contiene la molécula objetivo. La unión del aptámero a la molécula objetivo altera las propiedades dieléctricas de la superficie, lo que resulta en cambios en la impedancia que se pueden medir.

Ferreira et al, 2010; usaron ambas técnicas EIS y SPR para estudiar la adsorción de HRP a dsDNA en un electrodo de oro. Uniendo ambas técnicas lograron demostrar que la formación de los complejos HRP-dsDNA es favorable siempre y cuando las constantes cinéticas de la interacción (calculadas a través de SRP), fueran comparables a la energía de unión entre el aptámero y la proteína (calculadas a través de EIS).

Sin embargo, tal y como es discutido por Bogomolova et al, 2009, esta técnica tiene las limitaciones inherentes a la cuantificación electroquímica, tales como que no es posible distinguir entre una interacción específico o inespecífica, la alteración en la interacción aptámero-blanco molecular por la presencia de ferrocianuros de hierro como agentes REDOX del sistema o la fácil contaminación de los electrodos durante la medición.

Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM): Este método mide las fluctuaciones en la frecuencia de un cristal de cuarzo como resultado de la interacción entre dos moléculas.

En los experimentos de QCM, la molécula blanco se inyecta sobre la superficie de un aptámero inmovilizado en un cristal de cuarzo recubierto de oro. La frecuencia del cristal cambia cuando la molécula objetivo se une al aptámero, lo que se puede medir en términos de resonancia (Hz) (Hianik et al, 2005).

MacDonald et al, 2019; desarrollaron el análisis para demostrar la interacción entre un aptámero de DNA y la L-tirosinamida a través de la formación de un complejo de bajo peso molecular. Durante este ensayo y la combinación de ambas técnicas se describió la importancia del plegamiento del aptámero debido a las condiciones microlocales una vez que es anclado a una superficie. Dicho estudio es importante pues provee las bases técnicas para el entendimiento de las diferencias entre el comportamiento de aptámeros en disolución y aquellos anclados en la superficie, así como la complejidad de los procesos de plegamiento pueden modificar la formación de la interacción.

En conclusión, tanto los enfoques basados en marcadores moleculares como los no basados en etiquetas tienen sus ventajas e inconvenientes cuando se trata de detectar interacciones entre aptámeros y sus blancos moleculares. Los enfoques basados en marcajes moleculares tienen alta sensibilidad, especificidad y la capacidad de detectar pequeñas cantidades de compuestos objetivo. Sin embargo, pueden ser costosos, requiriendo especialistas capacitados y la presencia de dichos marcadores pueden interferir con la propia interacción.

Los enfoques sin etiqueta, por otro lado, permiten el monitoreo en tiempo real, la capacidad de estudiar la cinética y los aspectos termodinámicos de la interacción. Sin embargo, pueden ser menos sensibles y requerir equipos más sofisticados. La estrategia elegida dependerá de las necesidades específicas del experimento y los recursos disponibles.

1.6 Ácidos nucleicos: Una estructura definida por el balance de fuerzas opuestas – perspectiva orientada al modelaje de aptámeros

Los ácidos nucleicos son biomoléculas que desempeñan un papel crucial en el almacenamiento y transferencia de la información genética. Sin embargo, los ácidos nucleicos también ejercen funciones estructurales y de reconocimiento de otras biomoléculas, en particular proteínas.

La estructura de los ácidos nucleicos está definida por un equilibrio entre fuerzas opuestas: las repulsiones fosfato-fosfato y las interacciones atractivas entre las bases nitrogenadas. Debido a que ambas fuerzas interactúan con el ambiente químico, el entorno generado por el solvente también afecta la estructura de los ácidos nucleicos a través de la solvatación de cargas o debilitando la formación de interacciones atractivas entre nucleótidos (Hansel et al, 2018; Marin-Gonzalez et al, 2021).

En detalle, las repulsiones entre los grupos fosfatos se refieren a las interacciones de repulsión que sufren las cargas negativas de los grupos fosfatos. Dicho estrés estructural puede afectar el pliegue conformacional de la cadena de nucleótidos evitando su repulsión, e incrementando la importancia de contraiones en el medio, tales como sodio y magnesio para estabilizar dichos sistemas.

Las interacciones atractivas entre los nucleótidos se pueden dividir en dos tipos, las del tipo polar y no polar. Las del tipo polar corresponden al apareamiento de bases nitrogenadas entre purinas y pirimidinas (Hansel et al, 2018; Marin-Gonzalez et al, 2021). El modelo clásico de dicha interacción atractiva corresponde al indicado por Watson-Crick donde adenina interactúa a través de dos puentes de hidrogeno con la timina en el ADN y uracilo en el ARN. Además, la citosina interactúa con la guanina a través de tres puentes de hidrogeno, promoviendo que la cadena sea más rígida. Sin embargo, en la actualidad se reconocen otro tipo de asociaciones no canónicas como las del tipo G-cuádruplex, i-motifs o hairpins en los que se puede encontrar la presencia de puentes de hidrogeno entre bases nitrogenadas no esperadas, tales como Adenina con Citosina,

Timina con Guanina o la formación de complejos entre bases nitrogenadas del mismo tipo como Citosina con Citosina o Guanina con Guanina (Bansal et al, 2022).

Si bien la estructura básica de la doble hélice del ADN es consistente, existen diferentes conformaciones o variaciones en su forma. Tres de las conformaciones de ADN más conocidas son A-ADN, B-ADN y Z-ADN, las cuales difieren en la orientación de los ángulos de las bases nitrogenadas con respecto al eje central del azúcar-fosfato y el grado de enrollamiento de la doble hélice (Record et al, 1981).

El B-ADN es la forma más común de ADN en las células y es la estructura típicamente representada. Es una hélice que gira hacia la derecha con un diámetro de alrededor de 2 nm y 10 pares de bases por vuelta. Los pares de bases están orientados perpendicularmente al eje de la hélice, y la espina dorsal de azúcar-fosfato está en el exterior. La conformación del B-ADN es relativamente estable y se cree que es la forma biológicamente activa del ADN (Nieuwland et al, 2022; Dohnalova et al, 2021). El A-ADN es una hélice que gira hacia la derecha con un diámetro de alrededor de 2,6 nm y 11 pares de bases por vuelta (Wahl et al, 1997).

Los pares de bases están inclinados en relación con el eje de la hélice, lo que resulta en una estructura más compacta que la del B-ADN. Se cree que el A-ADN es un intermediario transitorio en la replicación y transcripción del ADN (Wahl et al, 1997). Por otra parte, el Z-ADN es una hélice que gira hacia la izquierda con un diámetro de alrededor de 1,8 nm y 12 pares de bases por vuelta. A diferencia del B-ADN y el A-ADN, que tienen una distribución relativamente uniforme de las bases A, T, G y C, el Z-ADN se caracteriza por una alta concentración de bases G y C. Se cree que el Z-ADN desempeña un papel en la expresión génica y puede estar involucrado en la regulación de la replicación y reparación del ADN (Rich & Zhang, 2003).

Las conformaciones de ADN A, B y Z se observan principalmente en el ADN de doble cadena, aunque se ha sugerido que tramos cortos de ADN de cadena sencilla como los encontrados en los aptámeros también pueden adoptar estas conformaciones en ciertas condiciones, en especial la conformación Z-ADN. Sin embargo, se cree que

cadenas cortas tienden a adoptar conformaciones más desordenadas y flexibles (Doluca et al, 2013).

Las interacciones del tipo no polar corresponden a interacciones hidrofóbicas que surgen de la interacción a lo largo del eje por el apilamiento de las bases nitrogenadas y los azúcares presentes en los nucleótidos. Dichas interacciones ejercen un efecto importante en la estructura de los ácidos nucleicos, pero además modulan la interacción que estos podrían tener entre ellos y con otras macromoléculas (Hansel et al, 2018)

Sumado a lo anterior, dentro de los principales desafíos en el estudio de la estructura de los ácidos nucleicos es su tamaño y flexibilidad. Sin embargo, desde el punto de vista evolutivo y de función, la combinación entre una alta masa molecular con flexibilidad tiene implicaciones en la versatilidad de la interacción con otros complejos moleculares. Esto se puede analizar en el contexto de algunas interacciones entre ácidos nucleicos y proteínas que son regulatorias en procesos de la transcripción y traducción de genes, tales como la polimerasa ARN T7, la interacción nucleosoma/ADN o la proteína de unión a la caja TATA (TBP) (Marko, 2015). En dichos ejemplos los cambios estructurales de la doble hélice afectan su interacción con ciertas familias proteicas que comparten mecanismos moleculares de reconocimiento (Taranova et al, 2014).

Dentro de las implicaciones más importantes de la flexibilidad de los ácidos nucleicos en el contexto de la interacción con proteínas es la degeneración del código genético (Rozov et al, 2016). Dicha degeneración consiste en que un mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes secuencias de codones. Dicha redundancia se puede entender como uno de los mecanismos más antiguos en la teoría de la información para la corrección de errores, y por lo tanto es fundamental en la robustez del proceso de traducción de proteínas. Sin embargo, desde el punto de vista estructural se genera el dilema de como la tercera base del anti-codón en el ARN de transferencia puede aun producir cierto efecto de especificidad flexible para la interacción con el codón presente en el ARN mensajero.

Como fue mostrado por Rozov et al, 2016; el reconocimiento del ARN de transferencia se basa mayoritariamente en complementariedad estérica y receptividad estructural mediada por el ambiente generado entre las modificaciones conformacionales encontradas en el mismo ARN de transferencia y el complejo ARN mensajero-ribosoma después de la interacción con las primeras dos bases del anticodón. Esto genera cambios estructurales que le dan una mayor amplitud de interacción no canónica entre la tercera base del anti-codón, la cual es usualmente llamada *wooble* y traducida al español como “*tambaleante*”, con el codón correspondiente.

Basado en lo anterior, es importante recalcar que a su vez la secuencia, la presencia de nucleótidos modificados y variaciones en conformaciones modulan la flexibilidad en el microambiente de la interacción (Marin-Gonzalez, 2021).

En los últimos años han avanzado las técnicas que permiten el estudio estructural de los ácidos nucleicos tanto desde el punto de vista experimental como de modelos computacionales. Cada una de dichas estrategias presenta una serie de ventajas y desventajas. Sin embargo, vale la pena recalcar la importancia de la razón por la que se realizan dichos experimentos, pues de antemano se debe tener en cuenta la inherente flexibilidad y amplio espacio conformacional del ADN y ARN tratados con anterioridad.

1.6.a Estrategias Experimentales para la elucidación de estructuras tridimensionales de ácidos nucleicos

Dentro de los métodos experimentales que permiten la elucidación de estructuras tridimensionales de ácidos nucleicos se encuentran:

Cristalografía de rayos X: esta es una técnica ampliamente utilizada para determinar la estructura 3D de biomoléculas, incluyendo ácidos nucleicos. El método consiste en el cultivo cristales y para luego exponerlos a rayos X que generan patrones de dispersión de las nubes electrónicas de los átomos específicos asociados a la estructura (Edwards et al, 2009). Sin embargo, la cantidad de estructuras elucidadas a través de esta técnica es limitada por la dificultad y variabilidad que tiene la generación

de celdas unidades con la calidad suficiente para obtener densidades electrónicas de buena resolución (Trachman et al, 2019).

Resonancia Magnética Nuclear (NMR en inglés): La espectroscopía de NMR consiste en la aplicación de un campo magnético fuerte a la estructura de interés en disolución. Luego de dicho proceso, ocurre la precesión del spin nuclear. Dicho fenómeno permite determinar el ambiente químico de los átomos en una molécula por lo que se puede utilizar para crear modelos 3D.

Existen múltiples protocolos para elucidación de estructuras, dentro de estos se encuentran el $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^{15}\text{N-NMR}$, F-NMR, TROSY, y NOESY como los más comunes aplicados a ácidos nucleicos (Al-Hashimi, 2013). Todos estos protocolos enfrentan retos, como la amplia flexibilidad conformacional de las estructuras y la baja concentración en la que usualmente pueden aislarse o sintetizarse. Esto último genera que el marcaje molecular sea un proceso caro y por lo tanto la realización del análisis a través de $^{13}\text{C-NMR}$ y $^{15}\text{N-NMR}$ tiende a ser un reto en laboratorios no especializados.

La cantidad de protones en comparación con la cantidad de heteronúcleos es baja, por lo tanto, el desarrollo de análisis $^1\text{H-NMR}$ implica la obtención de resultados que no permiten elucidar estructuras de alta masa molecular, esto debido a que las tasas de relajación transversal de los protones son altas y, por lo tanto, sus anchos de línea son grandes y se solapan entre sí (Schnieders et al 2020; Al-Hashimi, 2013).

Los nucleótidos no solo son pobres en protones, sino que sus protones imino y amino a menudo están involucrados en diferentes procesos de intercambio con solvente. El protón imino está en un intercambio rápido con el agua del solvente si no está protegido del intercambio, principalmente a través de enlaces de hidrógeno o, en casos raros, la protección estérica contra el intercambio (Schnieders et al 2020; Bottari et al, 2020).

Esta característica permite la determinación rápida de estructuras secundarias estables generada por la interacción con el ligando, ya que solo se pueden detectar los protones imino protegidos del intercambio (Latham et al, 2009). Pero también conduce

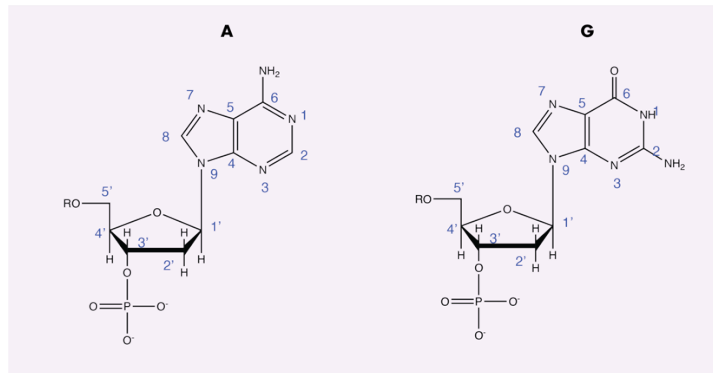
a la pérdida de información sobre las regiones dinámicas de los nucleótidos, ya que los nucleótidos en estas regiones no están involucrados en redes de enlaces de hidrógeno estables y las resonancias de protones imino se amplían más allá de la detección (Bottari et al, 2020). Sin embargo, a menudo las regiones dinámicas de los ácidos nucleicos están involucradas en procesos funcionales, como la unión a ligandos o proteínas.

En general, las señales obtenidas a través de H-NMR permiten conocer detalles generales sobre la conformación y la dinámica del aptámero (Sakamoto, 2017). Los desplazamientos químicos encontrados en estos espectros pueden ayudar a revelar ciertas interacciones o dinámicas de los azúcares de la cadena. Por ejemplo, señales entre 5,0-5,5 ppm sugieren un acodamiento del protón del azúcar C2'-endo, mientras que entre 3,0-3,5 ppm sugiere un acodamiento del protón azúcar C3'-endo (Boisbouvier et al, 2000).

Los desplazamientos químicos de los protones involucrados en interacciones de apareamiento de bases también pueden proporcionar información sobre la estabilidad y la forma de los pares de bases. Los pares de bases Watson-Crick, por ejemplo, tienen desplazamientos químicos de alrededor de 10-12 ppm que se deben a la formación del puente de hidrogeno (proton imino), mientras que las bases no canónicas pueden tener desplazamientos químicos diferentes (Bothe et al, 2011; Novakovic et al, 2020).

Los desplazamientos químicos de los protones aromáticos proporcionan información sobre las interacciones de apilamiento derivadas de interacciones no polares entre las bases. Los protones aromáticos en las bases de ADN tienen desplazamientos químicos de 7-9 ppm. El protón H8 (A) de adenina puede desplazarse químicamente alrededor de 7,9 ppm, mientras que el protón H8 (G) de guanina puede desplazarse químicamente alrededor de 8,2 ppm. El protón H6 (A) de adenina puede desplazarse químicamente alrededor de 8,1 ppm, mientras que el protón H1 (T) de timidina puede desplazarse químicamente alrededor de 9,0 ppm (Bothe et al, 2011; Conroy et al, 2022) (**Figura 1.6.1**)

Pirimidinas



Purinas

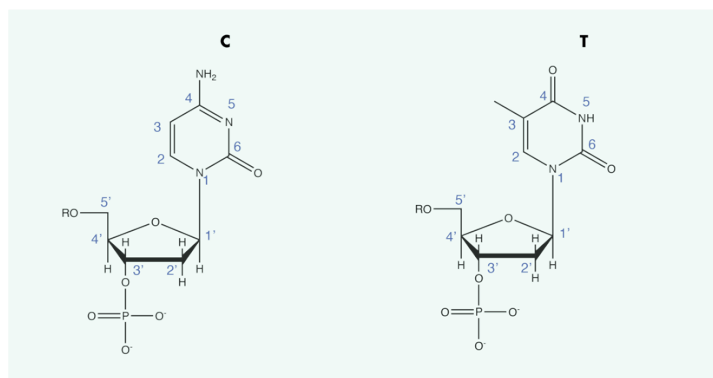


Figura 1.6. 1. Numeración de los átomos de los nucleótidos presentes en las cadenas de ADN (Figura original generada en ChemDraw 16.0 e Illustrator)

Microscopía crioelectrónica (cryo-EM): Esta técnica consiste en congelar la biomolécula de interés en una capa delgada de nitrógeno líquido y luego bombardearlo con electrones. Los electrones se dispersan en los átomos de la molécula, lo que resulta en una imagen de proyección 2D, para su posterior reconstrucción del 3D de dicha estructura (Kappel et al, 2020).

1.6.b Estrategias Computacionales

De manera general dichos enfoques son: análisis a través de mecánica cuántica (QM), modelos clásico-cuánticos híbridos, modelos clásicos de dinámica molecular, modelos de grano grueso (*coarse-grain* por su traducción al inglés), y modelos mesoscópicos (Dans et al, 2016).

Los enfoques que usan mecánica cuántica son también llamados “ab initio”. La aplicación de estos modelos provee resultados de alta confianza, sin embargo, para modelar dichos sistemas se requiere de una gran inversión computacional que hace imposible el análisis de sistemas a gran escala (Skupa et al, 2017; Motycka et al, 2014).. Actualmente, muchos algoritmos de esta índole son usados para la validación de campos de fuerza que se aplican en los modelos clásicos. La mayor desventaja de este marco de análisis es la poca utilidad práctica para la resolución de sistemas complejos de oligonucleótidos (Hansel et al, 2018)

Los métodos clásico-cuánticos híbridos (QM/MM, *por sus siglas en inglés*) son más eficientes que los métodos cuánticos desde el punto de vista de los recursos computacionales requeridos. Dentro de sus mayores usos son el análisis de la transferencia de carga y las propiedades espectroscópicas en los ácidos nucleicos. Estos análisis han permitido el estudio de la neutralización de especies reactivas de oxígeno que causan la mutagénesis del ADN. Sin embargo, siguen teniendo mayor aplicación a sistemas de alta energía y de bajo peso molecular (Hansel et al, 2018).

Los algoritmos de campos de fuerza atomística clásica son otro tipo de modelo utilizado para estudiar los ácidos nucleicos. Se basan en la suposición de que el campo de fuerza macromolecular se puede definir mediante la adición de los campos de fuerza individuales de los bloques de construcción (Hansel et al, 2018). Sin embargo, la gran magnitud de las interacciones nucleótido-nucleótido, especialmente la repulsión fosfato-fosfato, puede llevar a inestabilidades estructurales. Se han desarrollado campos de fuerza de tercera generación, como parmb3c0, para abordar algunas de las limitaciones de los campos de fuerza desarrollados inicialmente (Hansel *et al*, 2018).

Los modelos de grano grueso son modelos útiles cuando las escalas de tiempo o longitud accesibles por los métodos clásicos de dinámica molecular no logran abordar preguntas orientadas a la funcionalidad macro de la cadena de nucleótidos. Esto se debe a que este tipo de análisis reduce significativamente el costo computacional. Se pueden

considerar sistemas que simplifican la función de energía y reducen los grados de libertad agrupando átomos en "cuentas de collar" (Dans et al, 2010).

El uso de estos modelos ha permitido predecir el plegamiento de cadenas de nucleótidos, ya sea mediante un enfoque "top-down" donde se definen un conjunto de métricas objetivo para ajustar los parámetros de un conjunto predefinido, o mediante un enfoque de "bottom-up" que intenta predecir fuerzas de interacción basado en un potencial de fuerza media (PMF) derivado de simulaciones atómicas. Los cálculos de PMF por pares se usan típicamente de manera iterativa, con formas funcionales simples de energía como potenciales armónicos asociados a las representaciones tipo Lennard-Jones y Coulomb (Hansel et al, 2018).

Las representaciones de Lennard-Jones y Coulomb son modelos matemáticos que describen interacciones no enlazantes entre átomos (Wilian et al, 2014; Zha et al, 2014). En particular, Lennard-Jones es una expresión matemática que permite el análisis de fuerzas atractivas y repulsivas entre dos cuentas de collar de dicho sistema (**Fórmula 1.8.1**). El potencial (V_r) corresponde a la energía potencial entre ambos cuerpos en una distancia determinada. Es por esta razón que estos modelos tienen gran utilidad en el análisis del plegamiento conformacional de cadenas de nucleótidos, pues la optimización de dicho potencial con respecto a distancia permite encontrar el nivel de mayor estabilidad en dicho sistema.

De la misma manera, el potencial de Coulomb es usado para describir las interacciones electrostáticas entre átomos o iones (**Fórmula 1.8.2**). La energía potencial (V_e) también describe la energía entre dos cargas que están separadas una distancia determinada. Es importante recalcar que a pesar de tener implicaciones macro en el modelaje molecular, las estructuras obtenidas no cuentan con refinamiento de ángulos, efectos de polarización y transferencia de carga que otros enfoques otorgan y que en muchos casos describen los sistemas encontrados en la naturaleza (Zha et al, 2021). Finalmente, es importante mencionar que estos modelos también cuentan con

algoritmos adicionales, aunque menos refinados que los clásicos de modelado molecular, para la descripción del efecto del solvente en el sistema.

Los modelos usados están enfocados en aproximaciones de Debye-Huckel, o modelos híbridos donde se define el agua o solvente como cuentas de collar en una dimensión del espacio (Semiromi et al, 2012; Hansel et al, 2018).

$$V_r = 4\varepsilon \left(\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right) \quad [1.8.1]$$

$$V_e = 4\varepsilon \left(\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right) \quad [1.8.2]$$

Gracias a las metodologías anteriores, a la unión de distintos sistemas de análisis y modelos; se han desarrollado métodos de predicción de estructuras de ADN y ARN, que a su vez han sido validadas a través de estructuras resueltas por RMN, cristalografía de rayos X o microscopía crioelectrónica. A pesar de que los datos son escasos se han logrado modelar de manera exitosa estructuras que experimentalmente serian imposibles de caracterizar tales como algunas encontradas en secuencias de aptámeros debido a su alta flexibilidad y múltiples conformaciones.

Capítulo 2: Materiales y métodos

2.1. Extracción de proteínas y corrida de geles SDS-PAGE

Los experimentos presentados a continuación fueron llevados a cabo en el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET).

Debido a que se requería el análisis de las capas más externas de la spora de *C. difficile* y las técnicas requeridas tenían que ser basadas en geles, se siguieron los siguientes procedimientos descritos para los diferentes sistemas de extracción:

Permpoonpattana et al, 2011 (Tratamiento 1): Buffer de borato de sodio (0,1 M) a pH 10 en proporción 1:1 con las esporas, en presencia de 50 mM con incubación durante 75 minutos a 68 °C. Durante la ejecución de esta tesis se encontró que aun incubando dicho buffer de extracción por 15 minutos a 99 °C es posible obtener los mismos resultados descritos en el artículo original. A su vez, el uso de columnas de diálisis para posterior purificación con límites de masa molecular de 3-5 kDa pueden mejorar la resolución de las bandas alcanzadas por el gel.

Escobar-Cortés, 2013 (Tratamiento 2): Buffer de 50 mM Tris-HCl (pH=8,0), 8M de Urea, 1% SDS (masa/volumen), 50 mM DTT con incubación por 90 minutos a 37 °C.

Barra-Barrasco et al, 2013 (Tratamiento 3): Buffer 25 mM de Tris-HCl (pH=7,4), 1% de sarcosil, 0,3 mg/mL proteinasa K y 2 horas de incubación a 37 °C.

Posterior a la extracción de proteínas se corrieron geles siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial BioRad para el desarrollo de análisis SDS-PAGE con geles al 7.5% poliacrilamida. Los geles consistieron en dos partes: gel separador y gel espaciador. Para la preparación del gel separador se usó: 1,9 mL de Acrilamida/Bisacrilamida 40% (CAS No. 79-06-01); 2,5 mL Buffer Separador pH 8.8 (BioRad #1610798); 5,5 mL Agua destilada; 100 uL SDS 10% (CAS 151-21-3); 50 uL TEMED (CAS 110-18-9); y 50 uL persulfato de amonio 10% (CAS 7727-54-0). En cuanto a la preparación del gel espaciador se empleó: 0,5 mL de Acrilamida/Bisacrilamida 40% (CAS No. 79-06-01); 1,25 mL Buffer Espaciador pH 6.8 (BioRad #1610737); 3,2 mL Agua

destilada; 50 uL SDS 10% (CAS 151-21-3); 25 uL TEMED (CAS 110-18-9); y 25 uL persulfato de amonio 10% (CAS 7727-54-0).

Una vez colocada la muestra en el gel se usaron a lo largo de esta tesis dos patrones de peso molecular o “escaleras” (BioRad #26630 y 26619). El gel se cubrió hasta la marca de “dos” en la cámara de electroforesis con buffer de corrida. Dicho buffer fue preparado previamente a través de una disolución 10X de 30g de Tris-HCl, 144 g glicina, 10 g SDS. El voltaje aplicado fue de 130 V por alrededor de 80 minutos hasta que el frente de corrida alcanzara el extremo final del gel.

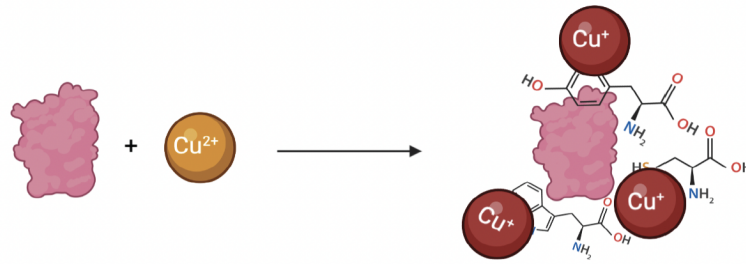
Posteriormente, los geles fueron transferidos a una disolución de azul de Coomassie por alrededor de 4 horas hasta que se obtuviera la coloración azul en todos los geles. Luego se añadió la disolución decolorante constituida en partes iguales de metanol, agua y ácido acético, la cual se dejó incubando a temperatura ambiente durante la noche en agitación constante de 65 rpm. Al día siguiente se tomaron las fotos en la cámara de luz.

2.2 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Se uso el ensayo semi-cuantitativo DC Protein Assay (BioRad #5000111), el cual se basa en el método de cuantificación de Lowry, usando un espectrofotómetro Synergy HTX (BioTek) para la lectura colorimétrica. Además, la curva de calibración se realizó a través de estándares de albumina de suero bovino (BSA).

En la **Figura 2.2.a**, se puede observar el mecanismo de dicho ensayo. En términos generales, los iones de cobre (Cu^{2+}) presentes en la mezcla agregada durante el primer paso son reducidos (Cu^+) por los aminoácidos Tirosina, Triptófano y Cisteína. Una vez que dicha interacción se ha generado, se agrega el reactivo Folin-Ciocalteu el cual consta de dos componentes principales: Ácido fosfotúngstico y el Ácido Molíbdico. Este segundo paso es crítico desde el punto de vista del equilibrio REDOX de la mezcla de reacción, debido a que se produce la oxidación del cobre y la reducción del molibdeno que genera el azul de molibdeno (Mo^{5+}) (Brown, 1992).

Paso I: NaOH/ CuSO₄ · 5H₂O)/ Tartrato de potasio



Paso II: Reactivo Folin-Ciocalteu (FC)

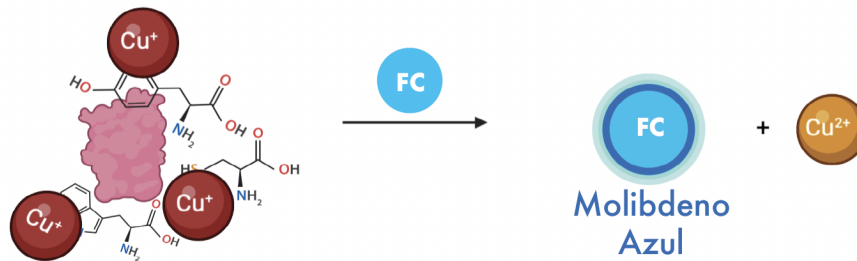


Figura 2.2. a. Mecanismo general de la detección colorimétrica de proteínas por el método de Lowry (Imagen original realizada en Biorender e Illustrator).

Con el fin de evitar múltiples curvas de calibración y ensayos que puedan incrementar la variabilidad del método de cuantificación. Se decidió almacenar 100 μ L de cada lote de esporas de *C. difficile* CQ33 (ribotipo 027) recibidos entre el periodo del 14 de febrero del 2019 al 24 de septiembre del 2019 para ser analizados el mismo día con una sola curva de calibración (*Anexo 2.1a*) el 24 de septiembre del 2019 (**Figura 2.2.b**). Dicho almacenamiento se llevó considerando la alta estabilidad que tienen las estructuras de las esporas a -20 °C en BSA al 1%, y de esta manera evitar múltiples ciclos de congelación/descongelación (Dufrenne et al, 1994; Freeman and Wilcox, 2003).

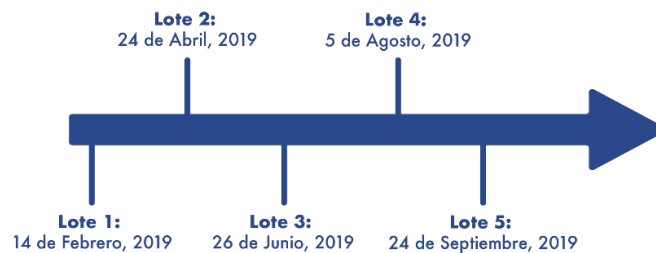


Figura 2.2. b. Diagrama de lotes de *C. difficile* recibidos para la posterior extracción de sus proteínas, análisis por gels y ensayo de cuantificación por Lowry.

Cada lote se dividió en tres partes iguales y se realizó la extracción mencionada en la sección anterior. En la **Tabla 2.1.1** se exponen organizados por tratamientos. Vale la pena recalcar que cada extracción se realizó por duplicado.

Tabla 2.1. 1. Métodos usados como tratamiento para la extracción de proteínas de la espora de *C. difficile*, y su posterior análisis a través del ensayo de Lowry.

Método	Bibliografía
Tratamiento 1	Permpoonpattana et al, 2011
Tratamiento 2	Escobar-Cortés, 2013
Tratamiento 3	Barra-Barrasco et al, 2013

2.3 Espectrometría de Masas

Las diferentes bandas escindidas se conservaron a 4 °C en refrigeración constante un promedio 2 semanas, para luego ser enviadas a su análisis en la sección de Proteómica del Instituto Clodomiro Picado. Los datos recibidos fueron analizados con el software MASCOT, con el número de identificación de péptidos reconocidos en el ensayo.

La manera en que se realizó este análisis consistió en escindir las bandas obtenidas en el gel SDS-PAGE para su posterior inyección en el LC acoplado a masas del Instituto Clodomiro Picado. En la **Figura 2.3.a** se puede apreciar un ejemplo de la escisión de una de las bandas a ~150 kDa del gel proveniente del método de extracción seleccionado.

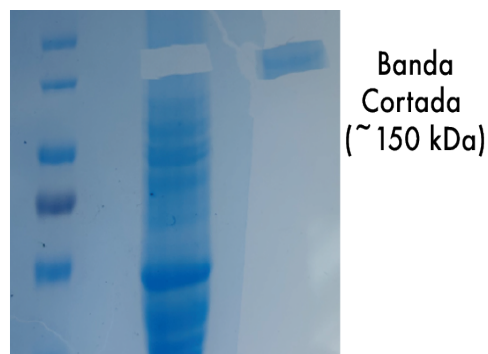


Figura 2.3. a. Ejemplo de la escisión de bandas para su posterior análisis a través de espectrometría de masas.

Una vez se terminan de escindir las bandas, estas se almacenaron a 4 °C para su posterior su análisis. En la **Figura 2.3.b** se muestra la cadena de pasos que se siguen para llevar a cabo la extracción de los péptidos presentes en estas (Corrales & Calvete, 2014). Vale la pena recalcar que entre el (70-80) % de péptidos logran una buena resolución a través de la digestión con tripsina, sin embargo, si se obtiene poco rendimiento de fragmentos, lo recomendable es tratar dicha muestra con otra familia de proteasas (Giansanti et al, 2016).



Figura 2.3. b. Esquema de pasos para la extracción y tripsinización de péptidos encontrados en las bandas escindidas del gel para su posterior análisis a través de LC-MS (*Imagen original realizada en Biorender e Illustrator*).

Para la categorización funcional de los péptidos, se siguió el procedimiento descrito por Diaz-González *et al* (2015), aplicando ciertas modificaciones en las categorías funcionales. Se decidió eliminar la categoría de patogénesis, pues desde el punto de vista de la espora aún no está validada la presencia de proteínas con dicha función de manera clara. A su vez, la categoría de adaptación fue unida con la de procesos celulares, debido al grado de ambigüedad que presenta el término “adaptación” en una estructura metabólicamente inactiva. Por último, se unieron las categorías de metabolismo central/intermedio con metabolismo energético debido a la presencia de proteínas con funciones simultaneas en ambas categorías a través de diferentes rutas metabólicas en *C. difficile*.

Vale la pena recalcar que el aptámero fue seleccionado por SELEX por el Dr. Cesar Rodríguez en el Laboratorio de Investigación en Bacterias Anaerobias (LIBA). Los

aptámeros tienen la ventaja de ser fácilmente modificados con indicadores tales como fluorocromos, biotina u otras etiquetas moleculares. La biotina es de gran importancia en biología molecular en conjunto con la estreptavidina pues ambas forman uno de los complejos biológicos de mayor estabilidad, y su constante de unión es casi tan fuerte como un enlace covalente ($K_d=10^{-14}$ M) (Chivers et al, 2011).

La modificación del aptámero (llamado en esta tesis CDBS-1) utilizado para este ensayo y posteriores fue:

Biotina- 3' CAC AGA CAC AAC GTC TAA ATG TCA CAT AAC 5'

2.4 Inmunoprecipitación (Pull Down) a través de partículas magnéticas

Los próximos experimentos fueron llevados a cabo en el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET).

Se usaron las condiciones recomendadas por el proveedor de “*LSKMAGT02 Millipore PureProteome™ Streptavidin Magnetic Bead System*”. Por lo que se expusieron 30 ng del aptámero biotinilado en 100 uL de dispersión de partículas magnéticas en buffer de PBS pH=7,0. Posterior a esto, se colocaron las esporas en suspensión y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente y agitación suave. Luego, se agregó un buffer de guanidina 8M (pH=2,3).

2.5 Microscopía TEM

Las esporas de *C. difficile* fueron fijadas en un buffer constituido por 2.5% glutaraldehído y 0,1 M cacodilato de sodio por una hora a temperatura ambiente y su posterior almacenamiento a 4 °C en refrigeración constante por al menos un día. Luego se colocaron en un tamiz “Formvar” optimizado para microscopía TEM. Posterior a esto, se expusieron a 80-kV de voltaje acelerado en un equipo TEM Hitachi HT-7700.

2.6 Western Blot 1D

Los geles de SDS-PAGE no tenidos por azul coomasie fueron tratados siguiendo el protocolo descrito por Bio Rad y luego optimizadas para el experimento en cuestión. Se

aplicaron 90 mA (30 V) por alrededor de 12 horas para la transferencia en membranas de PVDF (poro =0,2 μm). Luego, se lavaron las membranas PVDF con Buffer de transferencia por tres ciclos de 10 minutos cada uno. (25 mM Tris buffer, 192 mM glicina, 20% v/v metanol, pH 8,3). Posteriormente, fueron bloqueadas por 30 minutos para evitar sobreexposición de epítomos e interacciones inespecíficas con I-Block siguiendo las recomendaciones por el proveedor. Se realizaron tres ciclos de lavado con buffer de transferencia de 10 minutos cada uno.

Las membranas fueron expuestas a $30 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L} \cdot \text{cm}^2}$ de aptámero biotinilado siguiendo dos métodos diferentes que dieron lugar a resultados equivalentes, i) se incubó el aptámero con la membrana en PBS-Tween 20, a temperatura ambiente por 1 hora y media; ii) se incubó el aptámero con la membrana en PBS-Tween 20 (2%), durante la noche “overnight” a 4 °C en refrigeración constante. Después de dicho procedimiento se lavó la membrana en tres ciclos de 10 minutos cada uno en PBS-Tween 20 (2%). Posteriormente se agregaron $5 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L} \cdot \text{cm}^2}$ de conjugado HRP-estreptavidina, seguido de la incubación por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se realizaron tres ciclos de lavado con PBS-Tween 20 (2%) de 10 minutos cada uno.

Finalmente, se usó “SuperSignal West Pico PLUS” para el revelado de la membrana. Por lo que se aplicó 2,5 mL del reactivo A y 2,5 mL del reactivo B para la incubación de estos durante 1 minuto. La quimioluminiscencia se detectó en un equipo ChemiDock MP.

2.7 SDS-PAGE 2D

Se llevó a cabo la extracción de las esporas de *C. difficile* en un buffer compatible con los anfolitos del Isoelectroenfoque. Para dicha extracción se usó un buffer conformado por Urea 8 M; Tiourea 2M; CHAPS 4%; DTT 65mM; Anfolitos 0.2%; Trazas de Bromofenol durante dos horas de incubación a 37 °C. Posteriormente, se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm. Luego, se hidrató la tira con anfolitos, a través del buffer de equilibrio 1 (con DTT): Urea 6M; 1.5 M Tris pH 8.8 75 mM; Glicerol 29.3 %; SDS 2%;

DTT 1%; Trazas de bromofenol (que apenas quede azul). Seguido a esto, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente dentro de la cámara húmeda. Posteriormente, se tomó la tira con pinza y escurrió en papel absorbente. Se traspasó al riel siguiente y se adicionó el buffer de equilibrio 2 (con Iodoacetamida (IAA)): Urea 6M; 1.5 M Tris pH 8.8 75 mM; Glicerol 29.3 %; SDS 2%; IAA 2.5%; Trazas de bromofenol. Se programó el equipo de Isoelectroenfoque IPGPhor-3, con la optimización del voltaje para tiras de 7 cm. Por lo que se aplicó el siguiente procedimiento: 1) corriente constante de 0.1 W, 1 h; 2) corriente constante de 0.5 W, 8000 Vhrs; 3) Voltaje constante de, 1000 V, 1h. En este tiempo, se preparó el gel SDS-PAGE con peiqueta larga de un pocillo y soluciones de equilibrio, que posteriormente se corrieron de la misma manera que los geles SDS-PAGE descritos en la sección anterior.

2.8 Anclaje del aptámero a la superficie de óxido de grafeno

Los próximos experimentos fueron llevados a cabo en el Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química. (CELEQ), CICIMA (Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería en Materiales) y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET).

Se siguió el procedimiento descrito por Bonanni *et al*, 2012. Por lo que se expuso la superficie de óxido de grafeno a una disolución de 0,05 M de EDC y 0,03 M de sulfo-NHS con una incubación suave a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente, se lavó la superficie con agua destilada y se colocó el aptámero con el extremo 3' modificado por un "linker" aminado, la incubación se realizó a 50 °C por 3 horas, con la debida precaución de evitar desecación de la disolución del aptámero sobre la superficie. Finalmente, se lavó la superficie en tres ciclos de 10 minutos con agua destilada con el fin de lavar interacciones inespecíficas.

2.9 Espectroscopía Raman, XPS y AFM

Para la preparación de la superficie se partió del grafeno CVD sobre cobre, el cual se transfirió a un chip de silicio por medio de la adsorción por PMMA. Posteriormente, se llevó a cabo la degradación del cobre con una disolución de persulfato de potasio

saturada. Luego, se tomó el polímero con el chip de silicio y se disolvió el PMMA en acetona en una incubación a temperatura ambiente por alrededor de 3 días.

La oxidación del grafeno se llevó a cabo en el plasma-oxígeno, por lo que se colocaron los chips de silicio en el equipo durante un tiempo de entre 2 a 15 minutos para optimizar la oxidación. Dicha optimización se caracterizó por medio de espectroscopia Raman acoplado a microscopia confocal en el equipo WITec Alpha300R con un láser de argón a 532 nm. La rejilla utilizada fue de 1800 del tipo *Edge*. Además, las longitudes de onda de emisión fueron evaluadas de entre los 400 cm^{-1} hasta los 1300 cm^{-1} .

Para la toma de espectros XPS, se corrigieron los valores según la señal C1s como calibración del equipo a 284 eV, y se procedió a medir la excitación alrededor de los 134 eV para el fósforo y 400 eV para el nitrógeno. El AFM se tomó siguiendo el protocolo del equipo *A Bruker Dimension Icon with Peak Force Tapping* según las indicaciones para la escala de 200 nm en el eje x-y; y 5,00 nm en el eje z.

2.10 Microscopía de epifluorescencia

Se siguió un procedimiento desarrollado por el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia (LIBA). Las esporas de *C. difficile* se incubaron en la superficie de óxido de grafeno funcionalizado con el aptámero, al menos una hora a temperatura ambiente en PBS. Posteriormente, se lavó la superficie tres veces con PBS-Tween 20 para eliminar el exceso de esporas. Posteriormente, se trataron las esporas con una solución de Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se incubó con un anticuerpo anti-espora de *C. difficile* conjugado con Alexa Fluóor 488 por 1 hora en un ambiente oscuro. Se lavó la superficie tres veces con PBS/Tween 20 (2%) para eliminar cualquier interacción inespecífica. Finalmente, la superficie se observó mediante un microscopio de epifluorescencia con un cubo de excitación a 460 nm y emisión a 488 nm, lo que permitió detectar la fluorescencia de las esporas.

2.11 H-RMN

Se usó el equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del Centro de Investigación en Productor Naturales de la Universidad de Costa Rica (CIPRONA). Se llevo a cabo la comparación de señales según la presencia de un buffer de fosfatos, usando PBS 10 mM, 150 mM NaCl, 95% D₂O/5% H₂O, 256 pulsos, 600 MHz. También se llevó a cabo la comparación de señales a lo largo de temperaturas entre los 5 °C y los 25 °C, usando el sistema de 10 mM PBS, 150 mM NaCl, 95% D₂O/5% H₂O, 256 pulsos, 600 MHz.

2.12 Estructura 2D ssADN

Se usó el algoritmo descrito por Zuker, 2003. Por lo que se usó el software UNAFold. Este es un webserver que usa un método computacional que predice la energía libre mínima necesaria para mantener la estabilidad de una secuencia de ADN dada y su estructura 2D correspondiente según valores de energía.

2.13 Estructura 3D ssADN

Se usó el algoritmo descrito por Zhang et al, 2022. Por lo que se corrió la simulación en el software 3dRNA/DNA para la predicción de las estructuras tridimensionales de moléculas de ARN y ADN basándose en sus secuencias y estructuras 2D. Se ensambló la estructura 3D final y se refinó a través de funciones de energía de grano grueso (“Coarse grained”), presentes en el mismo algoritmo.

2.14 Estructura 3D de la interacción ADN-proteína

Se usó la estructura cristalizada de la proteína de S-layer PDB (7ACY), la cual fue cristalizada por Lanzoni-Mangutchi et al, 2022. Se usaron las estructuras del aptámero obtenidas en los pasos anteriores. Posteriormente optimizadas a través del campo de fuerza MARTINI (Honorato et al, 2019), a través de modelos de grano grueso. Se realizó el docking (interacción proteína-aptámero) a través de HADDOCK2.4 (Kurkcuoglu & Bonvin, 2019), con optimización de valores de energía que son calculados a través de un algoritmo llamado FCC descrito en el software (Takemura & Kitao, 2019).

Capítulo 3: Resultados y discusión

3.1 Caracterización de la interacción biológica entre el aptámero y el blanco molecular

En la **Figura 3.1.1** se presentan los resultados obtenidos para los tres métodos de extracción usados. Desde un punto de vista cualitativo, se puede observar que el mejor buffer de extracción correspondió al método descrito por el tratamiento 1 (Permpoonpattana et al, 2011). Por otro lado, en las corridas realizadas de los extractos siguiendo los métodos del tratamiento 2 (Escobar-Cortes et al, 2013); y tratamiento 3 (Barra-Barrasco et al, 2013) se puede observar que las bandas no son definidas y existe una alta relación señal/ruido. Por lo que podría implicar la presencia de complejos proteicos no desnaturalizados que evitan la migración y resolución de dichas proteínas a lo largo del gel (Rath et al, 2009; Backman et al, 2018).

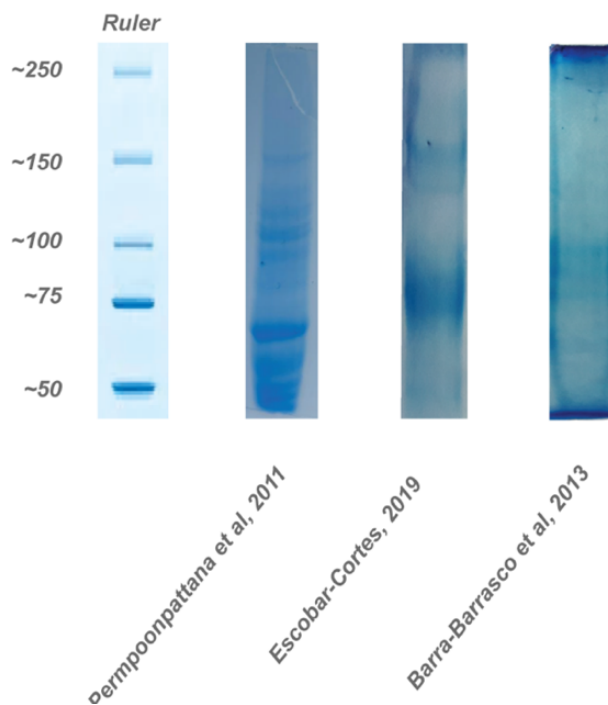


Figura 3.1. 1. Comparación de los diferentes métodos empleados en la extracción de proteínas de la espora de *C. difficile* mediante la elucidación de bandas obtenidas en gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 12%.

El resultado anterior es interesante desde un punto de vista estructural, esto pues puede implicar que existen interacciones entre las proteínas de la espora que son altamente sensibles al pH, pero que juegan un papel importante al mantener la estabilidad estructural de la misma. Esto tiene sentido pues, Kochan et al, 2018 y Shen et al, 2020; demostraron que debido a que las esporas requieren atravesar cambios de pH a lo largo del sistema digestivo, las enzimas de las capas externas son las encargadas de detectar las condiciones ideales presentes en el colon (pH~9,5), aumentando la permeabilidad ante dicho valor de pH hacia otros factores que permitan la posterior germinación.

De lo anterior se anticipa que los péptidos presentes en dichas capas son principalmente ácidos. Por lo que a partir de estos resultados también podría explicarse el por qué los desinfectantes más activos para el control de las esporas son los del tipo básico como el hipoclorito de sodio, por lo que el desarrollo de nuevas moléculas con grupos funcionales básicos podría traer resultados promisorios para la desinfección de superficies.

Tanto el tratamiento 2 como el tratamiento 3, presentaron la mayor coloración azul sin ninguna o poca definición de bandas, lo que implica que el uso de surfactantes no es suficiente para interrumpir las interacciones no covalentes que mantienen dichos complejos proteicos estables.

Con la finalidad de evaluar el desempeño de los métodos empleados, se caracterizó la significancia estadística por medio de un diseño de bloques. En la **Figura 3.1.2**, se presenta el gráfico correspondiente al análisis de varianza. De manera general, se puede observar que las varianzas obtenidas para los diferentes lotes muestran comportamientos similares.

Con el fin de corroborar estadísticamente que la variación entre lotes o el almacenamiento de las esporas no tuviera un efecto significativo que evitara la comparación de los datos, se realizó la prueba de Barlett. Dicha prueba consideró como hipótesis nula la homogeneidad de varianzas, mientras que la alternativa se planteó

como el caso en el que las varianzas son heterogéneas. Como resultado se obtuvo un valor de $p=0,6$ ($p > 0,05$) (Anexo 3.1), indicando que no es posible rechazar la hipótesis nula y como consecuencia, se establece a un 95% de confianza que las varianzas entre los lotes están igualmente distribuidas y son independientes entre sí, es decir comparables.

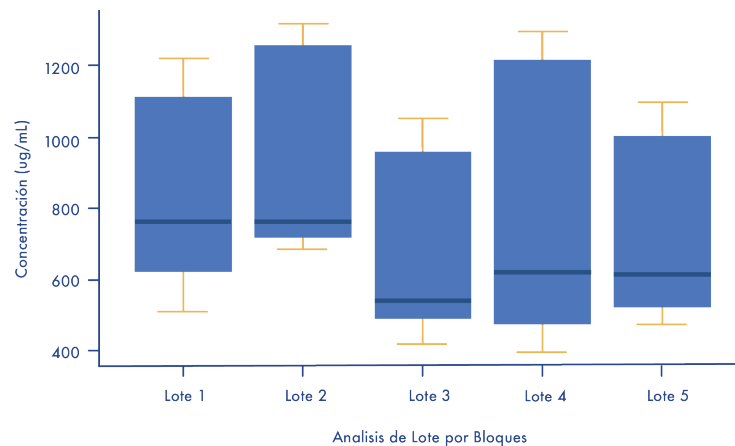


Figura 3.1. 2. Análisis de varianza considerando los lotes esporas de *C. difficile* a las cuales se les aplicaron los tratamientos 1, 2, y 3 como parte del diseño experimental por bloques.

En la **Figura 3.1.3** se presenta la concentración media (y valores individuales) obtenida para los diferentes lotes según el tratamiento de extracción. En concordancia con el ensayo de gel SDS-PAGE, se obtuvo que el tratamiento 1 (Permpoonpattana et al, 2011) presentó la mayor eficiencia en la cantidad de proteínas extraídas con concentraciones medias superiores a las 1 000 µg/mL. Por su parte, al comparar los tratamientos 2 y 3, no fue posible establecer cuál presentó de manera general una mayor concentración de proteínas en la extracción, puesto que se obtuvieron comportamientos variables entre lotes.

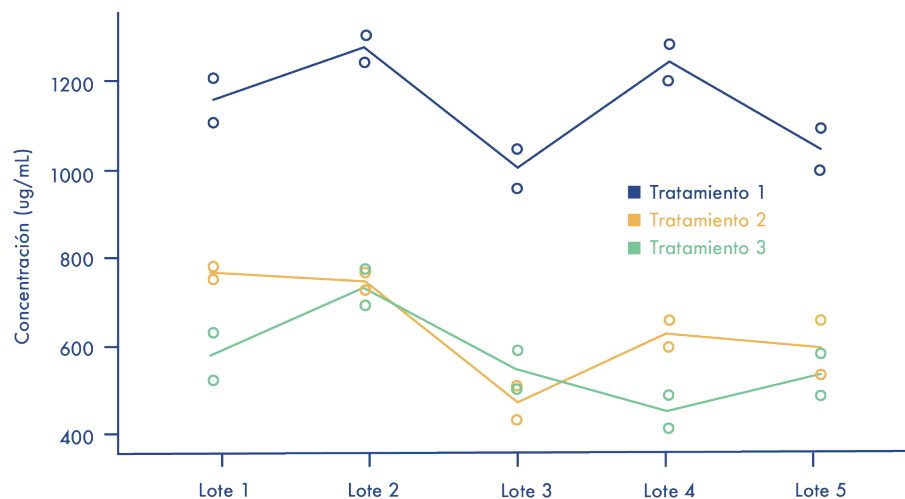


Figura 3.1. 3. Análisis de la concentración obtenida por tratamiento en cada lote de esporas de *C. difficile*.

Con el propósito de respaldar el análisis gráfico descrito, se efectuó un análisis de varianzas (ANOVA). En este caso, la hipótesis nula establece que las medias de los tratamientos son iguales, mientras que la alternativa indica que al menos una de las medias es distinta. En el **Anexo 3.1** se muestran los resultados del ANOVA. En este caso, se obtuvo un valor p de 0,0003 ($p < 0,5$) dando como resultado el rechazo de la hipótesis nula planteada.

Por ende, se estableció que al menos una de las medias de concentración de proteínas por tratamiento es diferente, siendo este resultado compatible con la gráfica anterior. Sin embargo, con este resultado no es posible sustentar estadísticamente cuál o cuales de los tratamientos presentaron medias diferentes al resto.

Las comparaciones de Tukey fueron por lo tanto utilizadas para determinar cuál tratamiento o tratamientos eran significativamente diferentes entre sí (Yu et al, 2021). Dicha prueba consistió en la comparación de la varianza de estos con el fin de calcular un valor crítico que permitiera evaluar la diferencia entre las medias de cualquier par de grupos.

Si la diferencia entre las medias de dos grupos es mayor que el valor crítico la diferencia es estadísticamente significativa y se dice que los grupos son distintos entre

sí. Los resultados obtenidos a través del análisis de Tukey (**ver anexo 3.1**) indicaron que existe una diferencia significativa entre el tratamiento 1 y el tratamiento 2; así como entre el tratamiento 1 y el tratamiento 3. Sin embargo, no es posible aseverar lo mismo entre el tratamiento 2 y el tratamiento 3 (aspecto que se sugirió con la interacción estadística observable en la gráfica).

Al estimar la diferencia correspondiente entre los tratamientos se obtuvo que el tratamiento 1 (*Permpoonpattana et al, 2011*) presentó una concentración mayor de al menos 453 ug/mL que el tratamiento 2 (*Escobar-Cortés, 2013*), y de al menos 532 ug/mL más que el tratamiento 3 (*Barra-Barrasco et al, 2013*) a un nivel de confianza del 95% de confianza.

Posteriormente, se clasificaron los diferentes péptidos obtenidos en los geles usando espectrometría de masas, tal y como se expuso en materiales y métodos. En la Figura **3.1.4**, se puede observar que el método de extracción elegido obtuvo la mayor detección e identificación de proteínas en las diferentes categorías funcionales, al compararse con los datos reportados en la literatura.

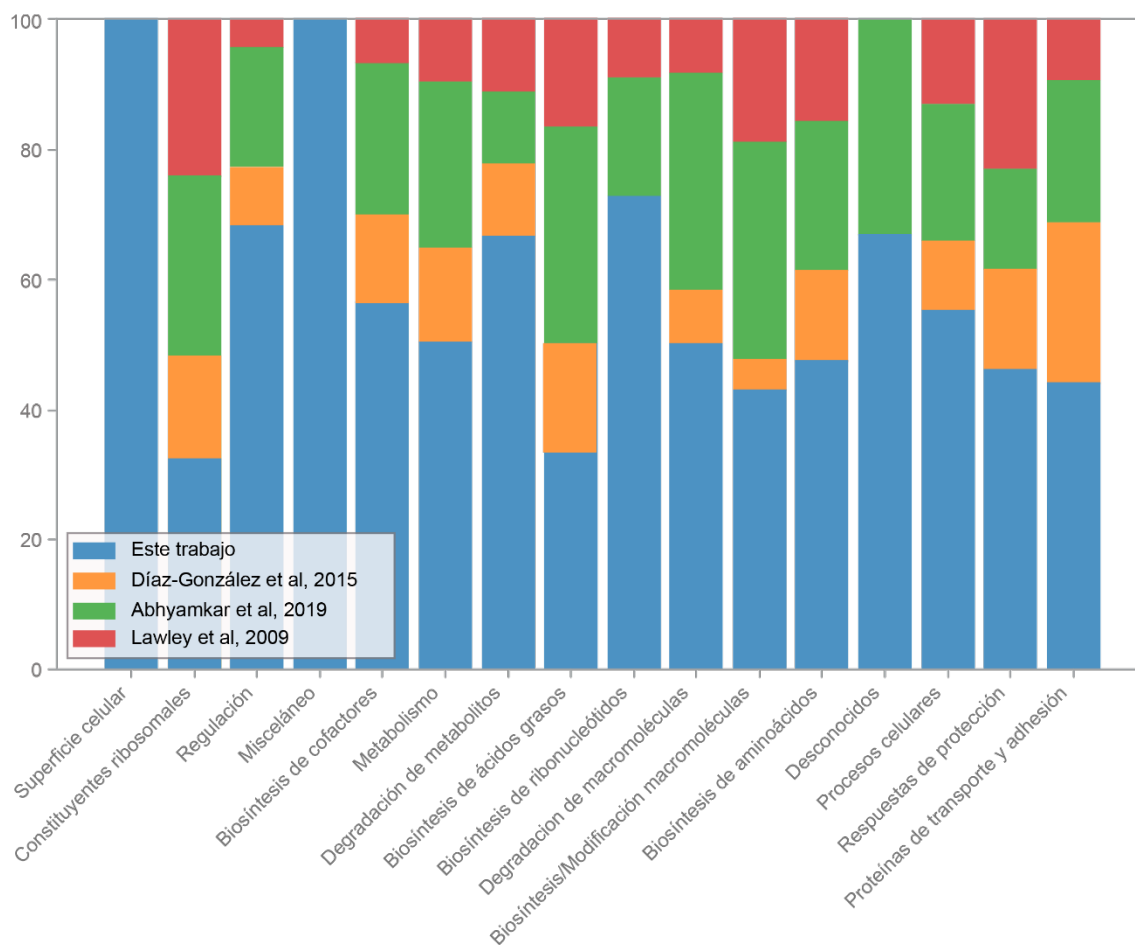


Figura 3.1. 4. Categorización funcional de las proteínas identificadas en las esporas de *C. difficile* CQ33 y su comparación con las bases de datos en la literatura.

Es importante recalcar que dicha diferencia puede deberse no solo a la estrategia utilizada, sino también como se mencionó en el **capítulo 1.2**, que los péptidos y características morfológicas de la espora son dependientes de la cepa en estudio. La cepa usada en esta tesis fue CQ33 (NAP1, Quesada-Gómez et al, 2010), mientras que los estudios en comparación corresponden a esporas de la cepa de referencia *C. difficile* 630.

Analizando la base de datos comparativa que se generó a través de los datos proteómicos, se pudo observar que existen proteínas que se encuentran presentes en las tres bases de datos, pero también saltó a la vista la presencia de proteínas que no se habían reportado anteriormente como componentes de la espora (*ver anexo 3.1.6*).

Como parte de los resultados de este ensayo, se encontraron en total 99 proteínas no reportadas antes en la literatura como componentes proteicos de esporas de *C. difficile* (Figura 3.1.5).

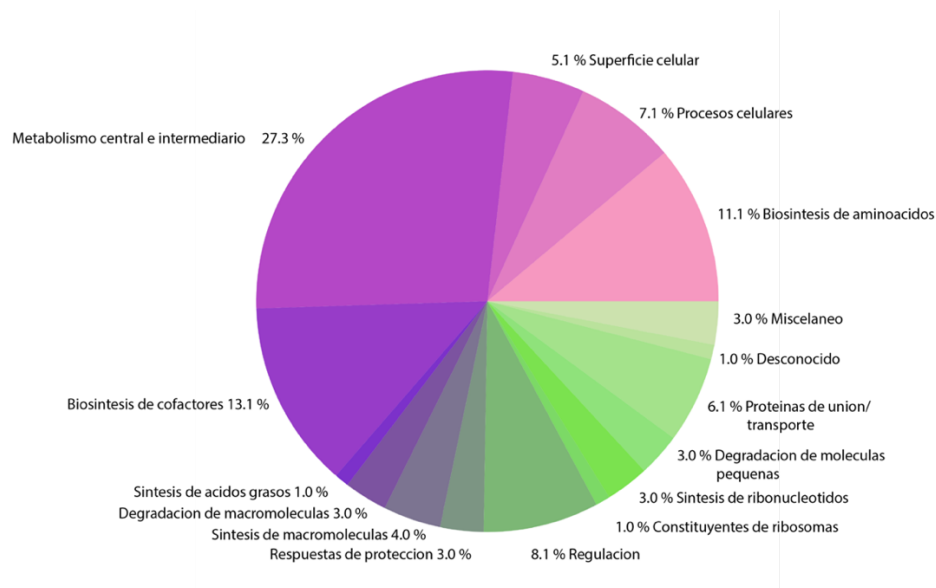


Figura 3.1. 5. Categorización funcional de las 99 proteínas identificadas en la espora de *C. difficile* CQ33 que no habían sido previamente reportadas en la literatura.

Es importante indicar que no necesariamente las funciones reportadas por dichas proteínas en células germinativas cumplirán el mismo tipo de funciones en la espora. El tipo de proteínas que no cumplen con el esquema usual en el que un gen es traducido a una proteína con una sola función específica se llama, proteínas “moonlight” (Jeffery, 2017; Singh and Bhalla, 2020). Este término considera que existen proteínas con múltiples funciones, y que dichos roles se expresan dependiendo del contexto celular en el que se encuentran, ya sea localización, expresión o componentes circundantes.

Uno de los ejemplos más llamativos ha sido la identificación de proteínas encargadas de procesos celulares básicos, principalmente metabólicos, que están implicadas en funciones patogénicas como factores de virulencia en bacterias. Se puede observar en la **Figura 3.1.5** la gran cantidad de proteínas identificadas que pertenecen a los procesos de metabolismo central e intermediario de la bacteria. Por lo que dichas proteínas podrían jugar roles no esperados en procesos de patogénesis e inflamación.

Otro detalle en particular que vale la pena hacer hincapié corresponde a la identificación de proteínas de capa-S en esporas de *C. difficile* durante el desarrollo de esta tesis. Se cree que dicha capa solo se encuentra en células germinativas y está especializada en funciones de adherencia a través de un entramado tridimensional complejo (Lanzoni-Mangutchi et al, 2022). Sin embargo, se encontraron dichos péptidos y sus precursores con frecuencias altas, generando confianza en su detección. Además, basado en el método de purificación de esporas aplicado, se puede descartar la presencia de células germinativas en dicho preparado (González-Carballo & Rodríguez, 2021). Lo anterior podría vislumbrar un mecanismo no descrito antes como estrategia de adhesión a superficies bióticas y abióticas usado por la spora.

Una vez que se caracterizó el proteoma de la espora, se emplearon diferentes técnicas con el fin de elucidar el blanco molecular del aptámero.

La primera técnica empleada en este trabajo fue la inmunoprecipitación. En la **Figura 3.1.6**, se observa el gel resultante al realizar este ensayo. Es posible observar la banda de poca intensidad de color obtenida a través de la tinción azul de coomasie. Por lo que se siguieron múltiples optimizaciones con el fin de mejorar dicha intensidad o captación de proteína. Sin embargo, dicha intensidad no fue posible incrementar aun cambiando los tiempos de incubación.

Lo anterior pudo deberse a dos posibilidades, la primera es que existiera una baja cobertura de funcionalización del aptámero biotinilado en la superficie de las partículas magnéticas por efectos del impedimento estérico de dicho sistema en particular; la segunda es que existiera una baja concentración del blanco molecular en la muestra de proteínas extraídas (*o ambas*).

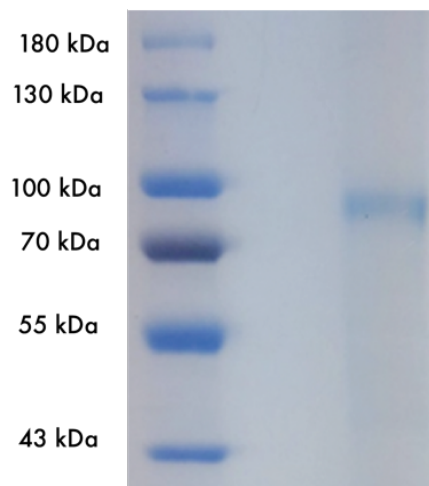


Figura 3.1. 6. Gel de SDS de la proteína captada por las partículas magnéticas funcionalizadas con el complejo estreptavidina y aptámero biotinilado.

Con el fin de identificar dicho péptido o péptidos presentes en la banda antes descrita, se realizó espectrometría de masas Orbitrap. La **Tabla 3.1.1** recopila los péptidos que se obtuvieron a través de dicho análisis. Sin embargo, basando la frecuencia de los fragmentos encontrados (*#Peptides*) en todas las opciones fue de 1. Lo cual indica que el grado de confianza de la identificación de estos no es satisfactorio, y por lo tanto se determina como un resultado indeterminado.

Sin embargo, de los fragmentos identificados el único reportado como parte del proteoma de la espora fue el fragmento de S-Layer.

Tabla 3.1. 1. Péptidos identificados en la digestión de bandas obtenidas a partir de un gel SDS-PAGE después del ensayo de inmunoprecipitación a través de las partículas magnéticas funcionalizadas con el complejo estreptavidina y aptámero biotinilado.

Código de acceso del péptido	#Peptides	Descripción
D0V7K3 (FliC)	1	Flagelina (fragmento) OS= <i>Clostridioides difficile</i> OX=1496 GN=FliC
E3WHS0	1	Surface Layer A (Fragment) OS= <i>Clostridioides difficile</i> OX=1496 GN=SlpA
A0A146JCR1	1	Surface Layer A (Fragment) OS= <i>Clostridioides difficile</i> OX=1496 GN=SlpA
Q4ACB5	1	S-Layer Protein (Fragment) OS= <i>Clostridioides difficile</i> OX=1496 GN=SlpA

La proteína de capa S no es un componente reconocido como parte de la espora de *C. difficile* en la literatura, y por lo tanto su reconocimiento tanto en los datos proteómicos como en este ensayo de interatómica con el aptámero debe ser tratado con cautela. Sin embargo, despierta el futuro interés de comprobar su expresión en estas estructuras.

A manera de prueba de concepto se realizó un ensayo simple de microscopía TEM con el fin de corroborar si esporas expuestas al aptámero reaccionan con un anticuerpo anti-SlpA (**Figura 3.1.7**). Como resultado, se encontró que el aptámero generó ultraestructuras similares a redes al estar en contacto con las esporas de *C. difficile*

(Figura 3.1.7B), y dichas estructuras fueron comparables a las estructuras observadas al aplicar el tratamiento de la espora en presencia del anticuerpo anti-SlpA (Figura 3.1.7C). En Figura 3.1.7A se observa el experimento control, es decir la microscopia de la espora *C. difficile* CQ33 cuya morfología no está bien definida debido a que no se realizó la tinción usual para lograr resolver las microestructuras como corteza, capa proteica, exosporium y núcleo, por lo que lo observado es la proyección de la espora en el eje X y Y del haz de la microscopia electrónica.

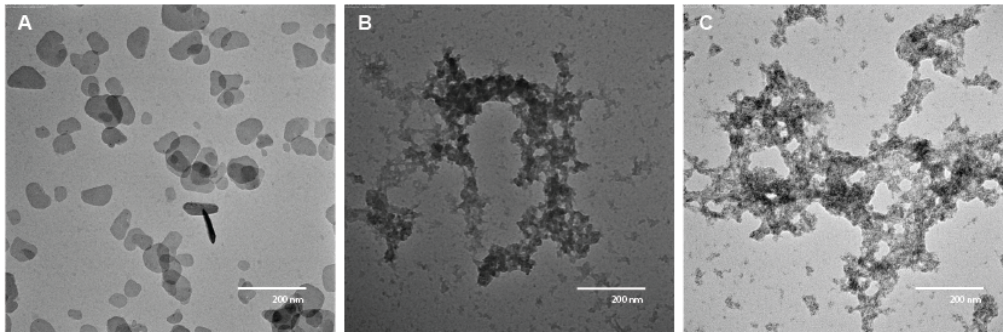


Figura 3.1. 7. Microscopia electrónica TEM de A) la espora *C. difficile* CQ33 (control), B) Espora + Aptámero y C) Espora + anticuerpo anti- SlpA.

Este resultado tampoco es concluyente pero su objetivo fue observar de una manera indirecta la interacción similar a anticuerpo que presenta el aptámero ante la presencia de la espora. Por lo que surge una de las preguntas derivadas a este proyecto: “Existe en las esporas de *C. difficile* una estructura homologa conformada por péptidos de S-layer similar a la red presente en células vegetativas?” Esto es importante pues como se había mencionado, la presencia de dichas estructuras podría cambiar la perspectiva del papel de la espora en los procesos infecciosos y su mecanismo de adherencia a superficies bióticas y abióticas.

La siguiente estrategia usada para la identificación del blanco molecular fue el Western Blot tanto en 1 dimensión como en 2 dimensiones.

Una de las limitaciones que presenta en análisis a través de 2 dimensiones, es que los anfolitos son susceptibles a sales y matrices con pH muy ácidos o básicos, por lo que

el sistema de extracción empleado (tratamiento 1) es incompatible para ser aplicado de manera directa a la tira IPG.

Con el fin de cambiar el buffer se decidió realizar una purificación de la muestra a través de membranas de diálisis de 3 kDa como límite de poro. Es decir que todo tipo de solventes y estructuras menores a 3 kDa pueden ser separadas del sistema de la muestra a través de ultra-centrifugación. Sin embargo, al realizarse dicho procedimiento e intentar eluir el mismo a un nuevo sistema de buffer con pH neutro y un contenido iónico menor, se generó un precipitado gelatinoso. Dicho precipitado puede deberse a la desestabilización generada por cambios de pH y agentes caotrópicos al cambiar de buffer.

Debido a lo anterior, se prosiguió a realizar la extracción de las proteínas de la espora usando el buffer recomendado por las tiras IPG (Depagne & Chevalier, 2012). En la **figura 3.1.8**, se puede observar el gel realizado con dicho método de extracción. Se puede observar el cambio de masa molecular de las bandas con respecto al SDS-PAGE anteriormente descrito, así como la fuerte tendencia que tienen los péptidos entre los 100-150 kDa a pertenecer en una misma línea horizontal y poco separada puntualmente. Lo anterior puede indicar la presencia de complejos proteicos no desnaturalizados, es decir que dicho sistema de extracción no logra disrumpir las fuertes interacciones presentes en los péptidos de la espora y por lo tanto no se obtiene una buena resolución (Corrales & Calvete, 2014).

Lo anterior puede ser resuelto a través de la optimización de un nuevo sistema de extracción o la aplicación de sistemas de purificación diferentes al uso de membranas de diálisis. Uno de los métodos aplicados fue la precipitación de los péptidos por medio de TCA (ácido tricarbóxico) (Corrales & Calvete, 2014). Sin embargo, la reconstitución de estos en sistemas amortiguadores compatibles con la técnica de 2 dimensiones no permitió la resolubilización del precipitado de proteínas.

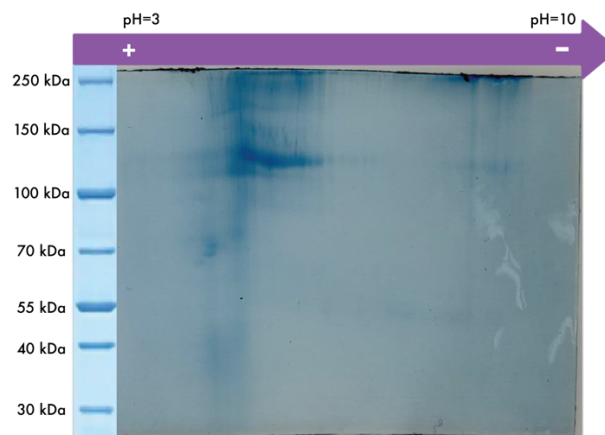


Figura 3.1. 8. Electroforesis 2D de la muestra de proteínas de la espora de *C. difficile*.

De manera paralela al Western blot 2D, se optimizó el Western blot 1D. En cuanto a dicho procedimiento no hubo ningún cambio en el proceso de extracción pues se transfirieron los mismos geles generados en el SDS-PAGE con el tratamiento 1. La optimización de la técnica se concentró en tiempos de transferencia, el bloqueo de la membrana con el fin de evitar interacciones inespecíficas debido a la sobreexposición al aptámero, así como las concentraciones de aptámero y conjugado HRP-estreptavidina para generar señales reproducibles y de buena.

Sin embargo, en el periodo que aparecieron los retos asociados al requerimiento de un sistema de extracción compatible con el Isoelectroenfoco, el Western Blot 1D arrojó un resultado que conllevó al descarte de la estrategia utilizada.

En la **Figura 3.1.9**, se muestra la serie de mediciones y controles que se llevaron a cabo en el Western Blot 1D. En **3.1.9A**, se observa el caso ideal en el que la señal obtenida en la membrana corresponde únicamente a la interacción entre el aptámero biotinilado y la proteína blanco. En **3.1.9B**, se muestra el primer control realizado el cual se basó en la hipótesis de que al menos uno de los péptidos presentes en la membrana tuviera la capacidad de captar biotina (o su análogo con constante de unión similar, destiobiotina) y generar una señal a través de la interacción con la estreptavidina del conjugado HRP-estreptavidina durante el revelado de la membrana. Por último, en **3.1.9C** se muestra el segundo control basado en la hipótesis de que al menos uno de los

péptidos presentes en la membrana tuviera biotinizaciones endógenas en su estructura por lo que podría generar señal a través de la interacción con la estreptavidina del conjugado HRP-estreptavidina durante el revelado de la membrana.

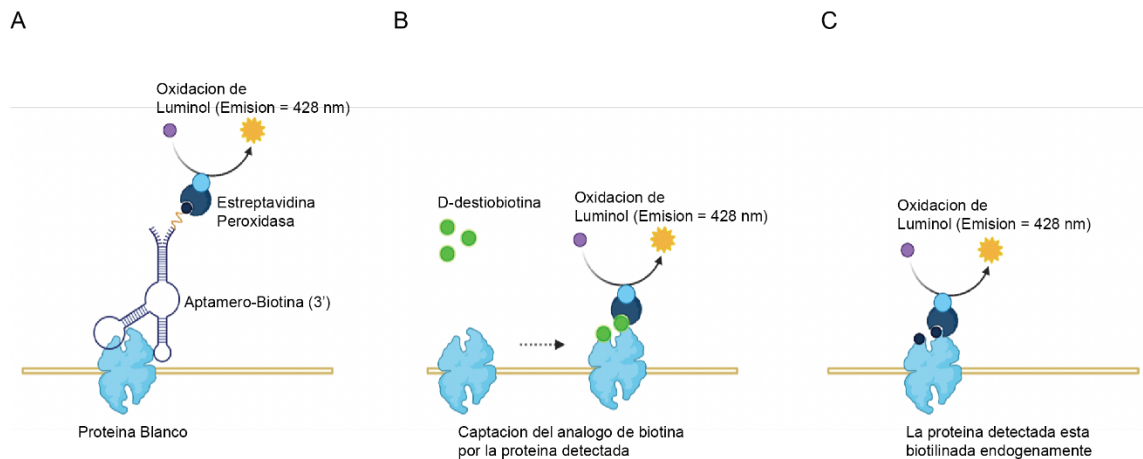


Figura 3.1. 9. Diagrama del diseño de experimento para validar la interacción del aptámero con proteínas de la espora de *C. difficile* y sus controles correspondientes.

En la figura **3.1.10**, se puede observar que las tres señales presentes en las tres membranas son similares. Dicho resultado podría tener dos posibles explicaciones, la primera es que el blanco molecular del aptámero estuviera biotilnado o tuviera la misma masa molar a la de una proteína biotilnada, lo cual generara la presencia de la señal de revelado en la misma banda.

La segunda posibilidad es que el aptámero no generara interacción medible con los componentes proteicos presentes en la membrana y que dicha señal se debiera solo a la presencia de proteínas biotilnadas en la espora de *C. difficile* y no a la interacción. Vale la pena recalcar que el tipo de ensayo realizado en este estudio es el más estándar reportado a lo largo de la literatura, por lo que el resultado obtenido en los controles no era un detalle que podría preverse.

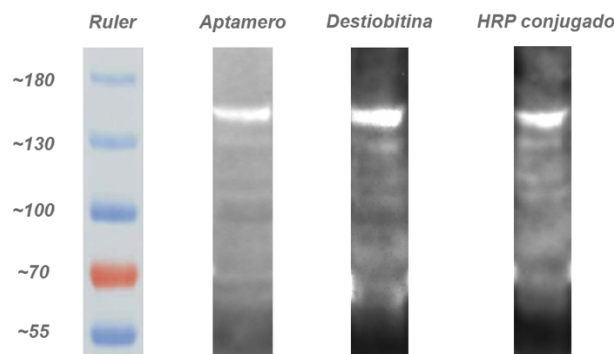


Figura 3.1. 10. Membranas PDVF reveladas a través de quimioluminiscencia.

La literatura indica que la biotina es un cofactor esencial para proteínas de la familia carboxilasas en la célula germinativa de *C. difficile*, y que la presencia de bajos niveles de biotina incrementa la producción de toxinas durante los procesos infecciosos (Yamakawa et al, 1996). A su vez, Charlton et al, 2015; en un estudio de lipoproteínas detectadas en células germinativas reportó un enriquecimiento incrementado de proteínas en la cepa R20291 al usar una técnica de “Pull Down” que atribuyó a la presencia de biotilaciones endógenas en esa muestra, y que dicho comportamiento era diferente al comparar con la cepa 630.

Sin embargo, investigaciones como las realizadas por Oliveira et al, 2019; a pesar de que usan una estrategia similar para detectar interacciones entre componentes de la superficie de la bacteria y sus toxinas no cuenta con blancos que corroboren posibles biotilaciones endógenas de la bacteria. Lamm-Schmidt et al, 2021; reportaron la proteína KhpB como un regulador de la producción de toxinas en *C. difficile* al unirse al RNA encargado de la transcripción de estas. En el estudio tampoco muestran explícitamente un sistema de controles para verificar la biotilaciones endógenas que puedan llevar a falsos positivos.

Se pueden observar más ejemplos de este tipo, sobre todo en estudios en lo que se aplican anticuerpos anti-toxina TcdB y TcdA biotilados, tales como el realizado por Bradshaw et al, 2017; para la cuantificación de producción toxigénica de diferentes cepas de *C. difficile*, los cuales se desarrollaron sin considerar los efectos de interferencia provenientes de biotinas endógenas.

Lo discutido anteriormente tiene como fuente particular la poca estandarización de métodos y control de calidad correspondiente a los ensayos obtenidos a través de Western Blot. Grant et al, 2019; publicaron un artículo en el que discuten desviaciones generadas en ensayos de interacción por la falta de controles de anticuerpos o partículas de reconocimiento poco caracterizados o la omisión de controles para evitar la detección antígenos endógenos con modificaciones que generen falsos positivos en las mediciones. Tal y como se discutió en el capítulo 1.5; los métodos para el desarrollo y validación de las secuencias de aptámeros son parte de los grandes retos que se deben superar para seguir desarrollando tecnologías basadas en estos. A su vez, vale la pena mencionar que la secuencia analizada en este trabajo son la primera iteración, y como también se discutió en dicho capítulo, debido a la alta flexibilidad y promiscuidad de interacción que presentan las cadenas de oligonucleótidos es requerido continuar con la modificación y optimización de dicha secuencia a través de más ciclos de ensayos SELEX.

También es importante mencionar que al comparar las masas molares de los péptidos encontrados por medio del método de “pull-down” con las partículas magnéticas (~80 kDa) es diferente a la señal obtenida por el western blot (~160 kDa), por lo que genera aún más incertidumbre en la variabilidad del resultado obtenido entre ambos métodos.

En la literatura se han reportado este tipo de casos donde se encuentra una alta variabilidad en ensayos de especificidad y blancos moleculares de los aptámeros como partículas de reconocimiento. El ejemplo más reciente es el reportado por Drabik et al, 2018; donde se llevó a cabo la validación del blanco molecular de un aptámero de ssDNA a través de cuatro estrategias diferentes. Se llevaron a cabo el Western Blot con aptámero biotinilado y otro modificado con el cromóforo atto-488, la inmunoprecipitación con partículas magnéticas, el acoplamiento por cercanía a través de deshidratación de la muestra con para-formaldehído y el análisis de tiempo de difusión en columnas de HPLC. La conclusión de dichos experimentos comprobó que cada uno de los métodos presento una amplia selección de péptidos con posibilidad de

interacción, pero la repetibilidad de lo obtenido fue muy baja al comparar diferentes técnicas.

A pesar de lo discutido anteriormente, se pueden proponer hipótesis plausibles que expliquen y unifiquen los resultados obtenidos, así como mecanismos plausibles de los posibles modos de interacción entre el aptámero y los componentes de la espora de *C. difficile* (**Figura 3.1.11**)

- A) El aptámero interactúa con dominios proteicos biotinilados, por lo que la proteína que se encontró en el Western blot podría ser el blanco, pero su señal de quimioluminiscencia es enmascarada por la biotina endógena. A su vez, podría existir una alta variabilidad de modificaciones postraduccionales de los péptidos de las esporas, y por lo tanto la proteína de S-layer reconocida en el “Pull-Down” no se descarta que también sea endógenamente biotinilada. En esta hipótesis, se consideraría el aptámero como no apto para su uso en campo por la alta cantidad de proteínas biotiniladas endógenamente que podrían provocar falsos positivos.
- B) El aptámero interactúa con un complejo proteico o requiere de estructuras cuaternarias para ejercer su reconocimiento. Por lo que la señal en el Western Blot es una proteína endógenamente biotinilada que no es el blanco molecular, a su vez la proteína de S-layer reconocida por el ensayo de “Pull-Down” es un falso positivo asociado a la técnica. Por lo tanto, los métodos existentes para elucidar dichas interacciones no permiten entender el modo de anclaje del aptámero con la espora por la complejidad del epítipo que se está intentando elucidar.
- C) El aptámero interactúa en la interfaz entre el péptido y una modificación postraducciona (Ej. glicosilaciones, fosforilaciones, enlaces disulfuro), que se ven alterados durante el proceso de

extracción de péptidos. Esta hipótesis implicaría que ambas señales obtenidas por Western Blot y “Pull-Down” son falsos positivos mediados por la alta complejidad de la matriz de proteínas de la espora.

D) El aptámero interactúa con espacios químicos generados por conformaciones de modificaciones postraduccionales u otros grupos funcionales que no necesariamente pueden ser propiciados por la presencia de péptidos en específico. Por ejemplo, el caso en el que el aptámero requiriera la interacción cercana entre una glicosilación y una fosforilación sin importar el péptido o los péptidos en donde estas se encuentren.

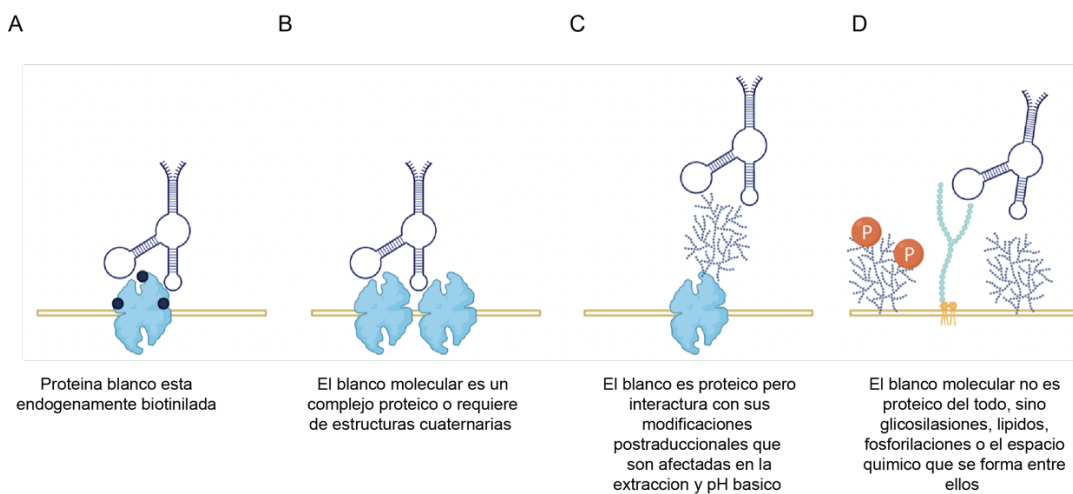


Figura 3.1. 11. Hipótesis de los modos de interacción del aptámero con los componentes de la espora de *C. difficile* CQ33.

Vale la pena recalcar que el uso de técnicas basadas en geles a pesar de que son las más indicadas para el estudio de interacciones tienen amplias limitaciones. Posiblemente la más persistente al momento de discutir las diferentes hipótesis de posibles modos de interacción entre el aptámero y los componentes de la espora, es que los geles son como ventanas cuyos límites están mediados por propiedades

fisicoquímicas. Dichas propiedades son el punto isoeléctrico de los péptidos, su masa molecular, la solubilidad de estos ante diferentes búferes de extracción y otras variables; por lo que el blanco molecular podría no estar tomado en cuenta en estos ensayos al no presentar el rango de dichas propiedades requerido para ser analizado en este tipo de estrategias.

3.2 Caracterización del anclaje del aptámero a la superficie de grafeno

Tal y como se trató en el **capítulo 1.4**, el grafeno y sus derivados como el óxido de grafeno tienen características fisicoquímicas únicas que los hace ser altamente atractivos para aplicaciones en biosensores. Sin embargo, cambios en la calidad y uniformidad de la superficie pueden afectar la calidad de la medición (Shahriari *et al*, 2021). Por lo tanto, cada etapa, desde la preparación de la superficie hasta la funcionalización puede afectar el rendimiento y la sensibilidad de los biosensores basados en estos materiales (Zou *et al*, 2017; Stulik *et al*, 2022).

Es por esto por lo que se requieren enfoques estandarizados para garantizar que las propiedades de la superficie sean consistentes y reproducibles entre grupos de investigación. Este trabajo se enfocó en el diseño de pasos de optimización para la generación de superficies funcionalizadas a través del anclaje de aptámeros de manera reproducible, así como la medición espectroscópica de cada paso clave para evaluar la calidad de dichos métodos (Zou *et al*, 2017; Stulik *et al*, 2022).

El primer paso que se siguió fue el uso de microscopia con el fin verificar la calidad de la transferencia de la superficie de CVD grafeno. Posteriormente, se expuso el grafeno a una cámara de plasma-oxígeno, cuya función principal es la de oxidar la superficie del grafeno para generar el óxido de grafeno. Durante este proceso, se rompen los enlaces de carbono-carbono de este, y se introducen grupos funcionales que contienen oxígeno, tales como grupos hidroxilo, carbonilo y carboxílicos (Cui *et al*, 2017) (**Figura 3.2.1**).

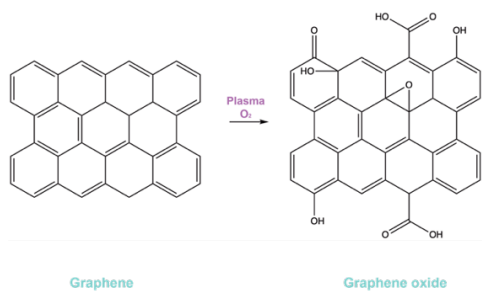


Figura 3.2. 1. Esquema general de la reacción del grafeno ante la exposición a oxígeno-plasma para generar óxido de grafeno (Figura original generada en ChemDraw 16.0).

A través de las señales en el espectro Raman se puede demostrar la formación de óxido de grafeno, así como la optimización del tiempo de exposición requerido en el plasma para no excederse en el tratamiento de oxidación (**Figura 3.2.2**). La señal D (alrededor de 1350 cm^{-1}) y G (alrededor de 1580 cm^{-1}) hacen parte de las más conspicuas para identificar el óxido de grafeno. La señal D representa el desorden o las deformidades en la estructura del grafeno, y su intensidad es significativamente mayor en el óxido de grafeno que en el grafeno. Por otro lado, la señal G representa la configuración planar de los enlaces sp^2 presentes en el grafeno.

Es importante recalcar la importancia de la relación que existe entre las señales D/G, esto pues son una medida indirecta de la relación entre los enlaces sp^3 y sp^2 presentes en la superficie después de la oxidación (Ni *et al*, 2008; Liu *et al*, 2013; Giegold *et al*, 2020).

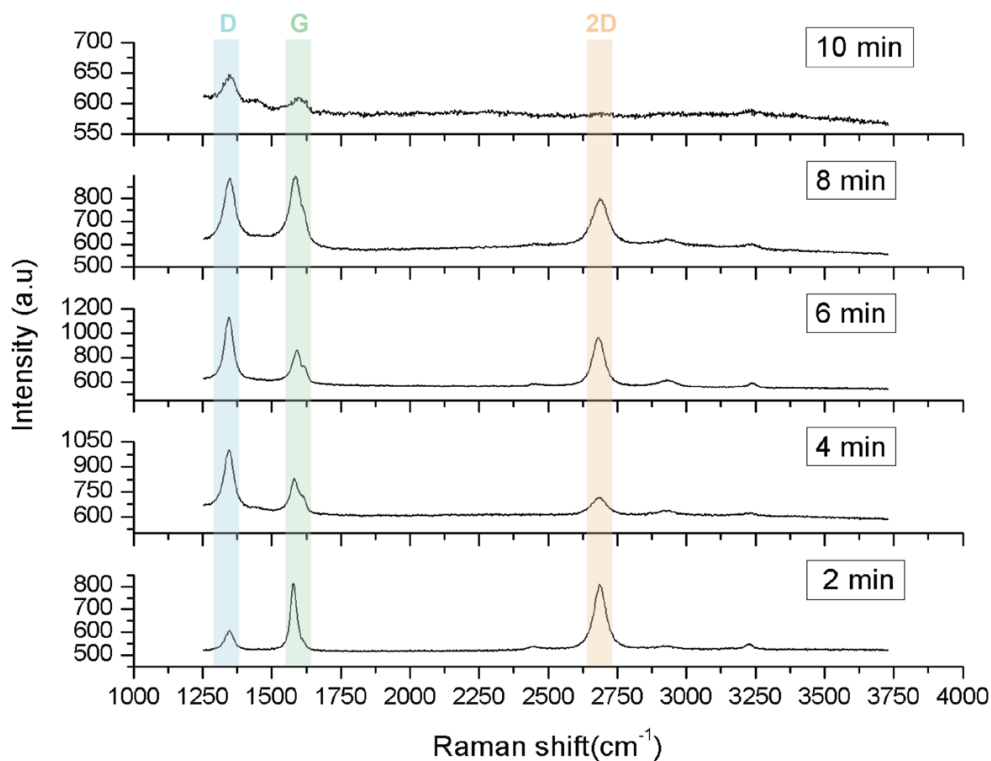


Figura 3.2. 2. Optimización de la oxidación de la superficie de grafeno CVD a través de oxígeno-plasma para la generación de óxido de grafeno.

En específico durante este proceso se buscó el tiempo de oxidación que presentara la señal D más alta, pero que mantuviera la señal G más baja posible. Esto pues dicho patrón implica la existencia de defectos en la superficie provenientes de la oxidación, sin poner en riesgo la conectividad de los carbonos en la cual se basa la alta conductividad de los sistemas de grafeno y sus derivados.

A través de la reacción de la superficie de óxido de grafeno con los componentes sulfo-NHS y EDC fue posible modificar la superficie con el aptámero CDBS-1. El EDC es el clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, su función principal es la de activar los ácidos carboxílicos formados en la superficie de óxido de grafeno. Su adición propicia el ataque nucleofílico de sustratos ricos en electrones, como alcoholes o aminas.

El sulfo-NHS es un derivado soluble en agua y estable de la N-Hidroxisulfosuccinimida (NHS), al añadirse al sistema de reacción este ataca el grupo acilo del o-acilisourea inestable que se forma durante la reacción de la superficie con el EDC (**Figura 3.2.3**). Una vez se genera dicho intermediario estable, se puede adicionar el aptámero modificado en el extremo 3' con un grupo amino, el cual permite generar el anclaje covalente del oligonucleótido a la superficie de óxido de grafeno (Bonanni *et al*, 2012).

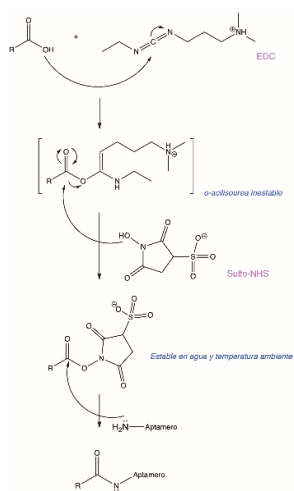


Figura 3.2. 3. Reacción de la funcionalización del oxido de grafeno con el aptámero a través de la reacción con EDC y sulfo-NHS (Figura original generada en ChemDraw 16.0).

A través de la microscopía AFM se obtuvo la información topográfica sobre la superficie del biosensor con el fin de verificar la modificación de la rugosidad una vez se generó el anclaje del aptámero con la superficie (**Figura 3.2.4**). Como se explicó en el **capítulo 1.4**, la técnica de microscopía AFM mide la deflexión de una sonda mientras se escanea la superficie de interés (Pérez *et al*, 2019; Zhu *et al*, 2020). Se puede observar que después de la modificación de la superficie fue posible detectar un aumento en la rugosidad de la superficie, lo que confirma la modificación del óxido de grafeno.

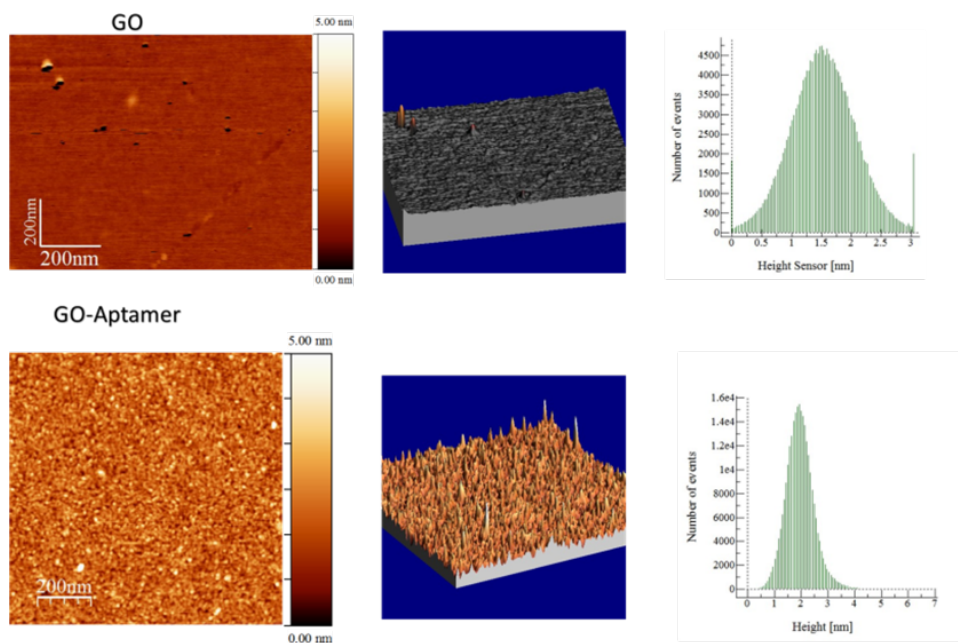


Figura 3.2. 4. Análisis de la modificación de la rugosidad de la superficie de óxido de grafeno después de la reacción de anclaje con el aptámero.

También se realizó la caracterización de la superficie a través del análisis XPS. Esta técnica también fue mencionada en el **capítulo 1.4**, y su principal objetivo es la de obtener información sobre la presencia de átomos presentes en una superficie. A través del bombardeo de rayos X en la superficie se puede obtener la medición de la energía cinética de los fotoelectrones liberados de la muestra. Dicha energía cinética es característica de los elementos presentes en la muestra (Jia *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2013).

En este caso específico el objetivo fue encontrar la presencia de átomos que no estuvieran presentes en la superficie o sistema de reacción, por lo que el fósforo y nitrógeno, surgen como átomos clave que solo se podrían encontrar en la estructura del aptámero (**Figura 3.2.5**). En la **Figura 3.3.5A**, se puede apreciar la detección del fósforo correspondientes a los fotoelectrones liberados del orbital 2p de este. Dicha energía de enlace tiene un valor de alrededor de 134 eV (Kim *et al*, 2018). Luego, en la **Figura 3.3.5B**, se puede observar que la emisión de fotoelectrones provenientes del orbital 1s del nitrógeno, los cuales normalmente lo realizan alrededor de los 400 eV (Kim *et al*, 2021).

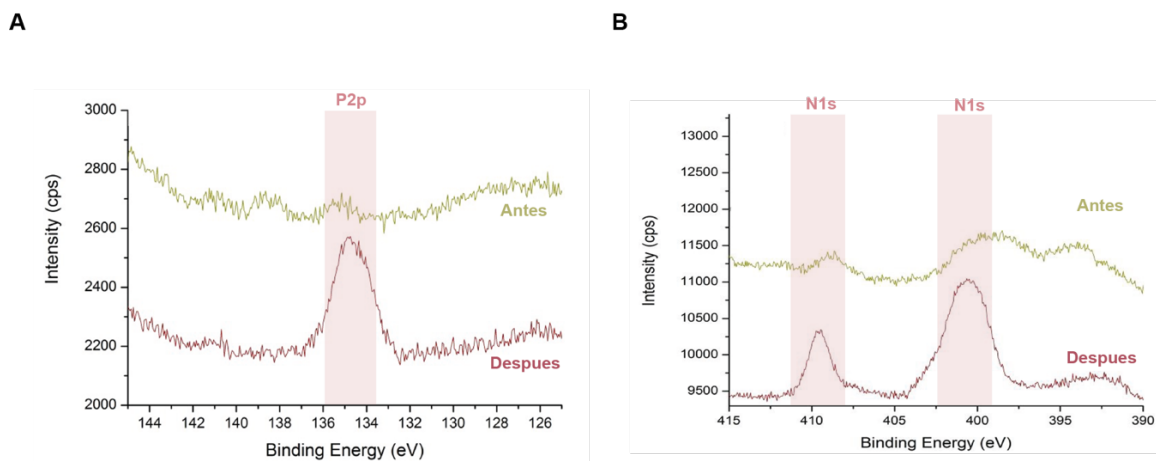


Figura 3.2. 5. Análisis XPS de la superficie antes y después de la reacción de funcionalización con el aptámero. A) Señal XPS detectada en la región de los orbitales 2p del fosforo; B) Señal XPS detectada en la región de los orbitales s del nitrógeno.

A lo largo de estos experimentos de caracterización se logró demostrar de manera sistemática el anclaje y su optimización asociada. Vale la pena recalcar que el valor agregado de los datos presentados en esta sección es la generación de la serie de pasos por los cuales se puede verificar la calidad de la oxidación de la superficie y el anclaje de cadenas de ADN como aptámeros para la generación de biosensores reproducibles.

Con el fin de validar la interacción del aptámero, una de las técnicas empleadas fue la microscopía de epifluorescencia mediante el uso de un anticuerpo genérico anti-espora de *C. difficile* y un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente (Alexa Flúor—488). Por lo que se usaron las superficies desarrolladas y caracterizadas por los métodos antes descritos para luego dispersarse la espora a lo largo de la superficie. Luego de la incubación a 37 °C por 1 hora se realizaron múltiples lavados con el fin de evitar interacciones inespecíficas con el sistema de detección. En la **Figura 3.2.6**, se puede observar la presencia de las esporas a lo largo de la superficie, lo que confirma su potencial de interacción con el sistema de detección.

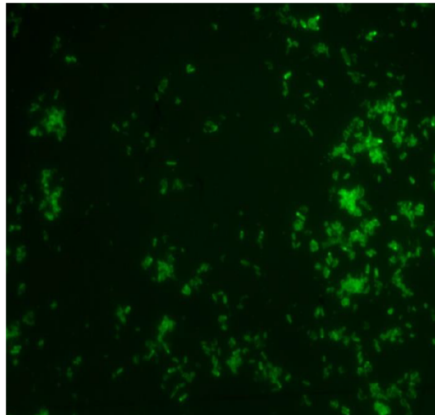


Figura 3.2. 6. Validación a través de microscopía de epifluorescencia de la interacción de la espora con el sistema de detección de óxido de grafeno funcionalizado con el aptámero.

También se realizó otra validación de dicha interacción entre el sistema de detección con la espora a través de la microscopía AFM (**Figura 3.2.7**). Esta técnica permitió la generación de una imagen de alta resolución de la presencia de la espora en la superficie aún después de múltiples lavados.

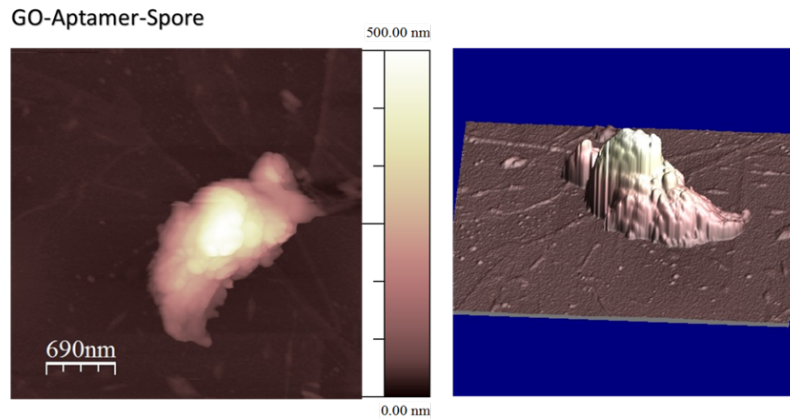


Figura 3.2. 7. Validación a través de microscopia AFM de la interacción de la espora con el sistema de detección de óxido de grafeno funcionalizado con el aptámero.

Estas validaciones son importantes como punto inicial para la posterior caracterización analítica que es requerida para el desarrollo de un biosensor. Dichos parámetros se encuentran fuera de los objetivos de esta tesis, sin embargo, fundamentan la viabilidad del sistema de detección. En la **Figura 3.2.8**, se muestra un ejemplo del chip con canales de microfluidica en el que se pretende continuar con el cálculo de límites de detección, repetibilidad y estabilidad de la señal en futuros proyectos.

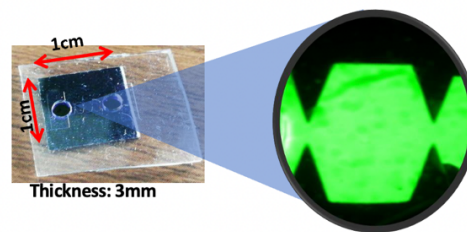


Figura 3.2. 8. Diseño del biosensor planificado dentro de la colaboración que usara los datos presentados en esta tesis.

3.3 Modelo Computacional de la interacción biológica entre el aptámero y el blanco molecular

Tal y como se discutió en el capítulo 1.6, el H-RMN es uno de los métodos experimentales que pueden ser empleados para la elucidación de estructuras de cadenas de nucleótidos. Sin embargo, debido a limitaciones de equipo y acceso a aptámeros marcados con ^{13}C y ^{15}N , se eligió esta técnica solo como una estrategia inicial para indagar en el comportamiento fisicoquímico del aptámero en cuestión. El objetivo de este análisis fue observar posibles variaciones en la región de *7.10 ppm a 8.50 ppm* ante cambios estructurales provocados por la salinidad del Buffer de fosfatos, como reconstituyente del aptámero (PBS 10 mM, 150 mM NaCl), así como el efecto que tiene la temperatura en el plegamiento de la secuencia (*Los espectros completos se encuentran en el Anexo 3.4*).

Efecto de la salinidad:

Los cambios en la salinidad del buffer en el que el aptámero es reconstituido pueden influir en el plegamiento de este. Tal y como se discutió en el **Capítulo 1.6**, los iones interactúan con la carga negativa del esqueleto de fosfato, por lo tanto, generan una disminución de las fuerzas de repulsión de las cargas electrostáticas negativas de estos. Es decir, a medida que aumenta la concentración de sal, los iones pueden neutralizar las fuerzas de repulsión para facilitar el plegamiento de los ácidos nucleicos en estructuras más compactas como horquillas o bucles (Furtig et al, 2003).

En la **Figura 3.3.1**, se puede observar la presencia de señales en el rango de 7,10 a 8,50 ppm en el espectro H-NMR del aptámero al agregarse PBS. Dicha variación podría estar relacionada con la estabilización de las interacciones de apilamiento por parte de las bases nitrogenadas, en particular la adenina (A) y guanina (G) (Furtig et al, 2003). A su vez, la ausencia de señales entre los 9,0 ppm y 12 ppm (*ver espectros Anexo 3.4*), no implica que la estructura no presente una organización compleja y formación de puentes de hidrogeno. Dicha ausencia podría deberse a un efecto de alta cinética de intercambio de protones con el solvente o cambios conformacionales que generalmente ocurren en

rangos de tiempo de los picosegundos y que no son posibles de analizar a través de técnicas experimentales (Churcher et al, 2020). Sin embargo, las señales que pueden ser encontradas en este espectro, indican que ante la presencia de una mayor salinidad ocurren cambios en el ambiente químico circundante de los protones aromáticos de las bases nitrogenadas, por lo que a modo de hipótesis se puede pensar que dirigen dicha estructura a un estado de estabilidad temporal que posteriormente facilita la formación de estructuras funcionales para generar la interacción con el blanco determinado (Weisshoff et al, 2018).

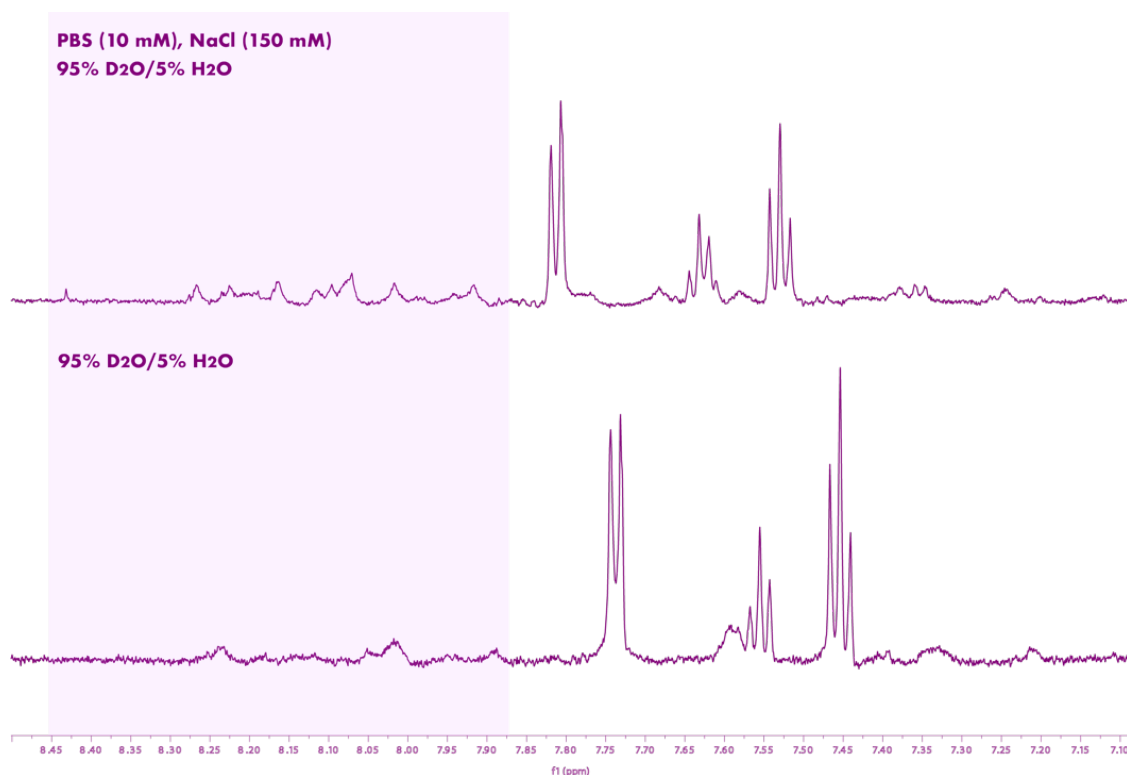


Figura 3.3. 1. Variaciones en las señales de RMN en la región de 7.10 ppm a 8.50 ppm ante cambios provocados por la presencia de Buffer de fosfatos (PBS 10 mM, 150 mM NaCl, 95% D₂O/5% H₂O, 256 pulsos, 600 MHz).

Efecto de la temperatura:

En la **Figura 3.3.2**, se puede observar el efecto que tiene la temperatura (entre los 5 °C y los 25 °C) en las señales obtenidas por el H-RMN. Este efecto puede deberse a la disminución de las posibles conformaciones al disminuir la temperatura. Churcher et al, 2020; encontró un comportamiento similar al analizar la estructura de un aptámero y la interacción con su ligando (cocaína) a lo largo de diferentes temperaturas. En dicha investigación se encontró que los apareamientos de ciertas bases nitrogenadas de la secuencia disminuían su capacidad de intercambio de protones con el solvente, así como una menor cinética de movimiento conformacional, por lo que las señales del H-RMN eran menores aun en presencia del ligando en el medio. Dicho resultado es importante pues implica que la afinidad de la interacción es susceptible a cambios de temperatura.

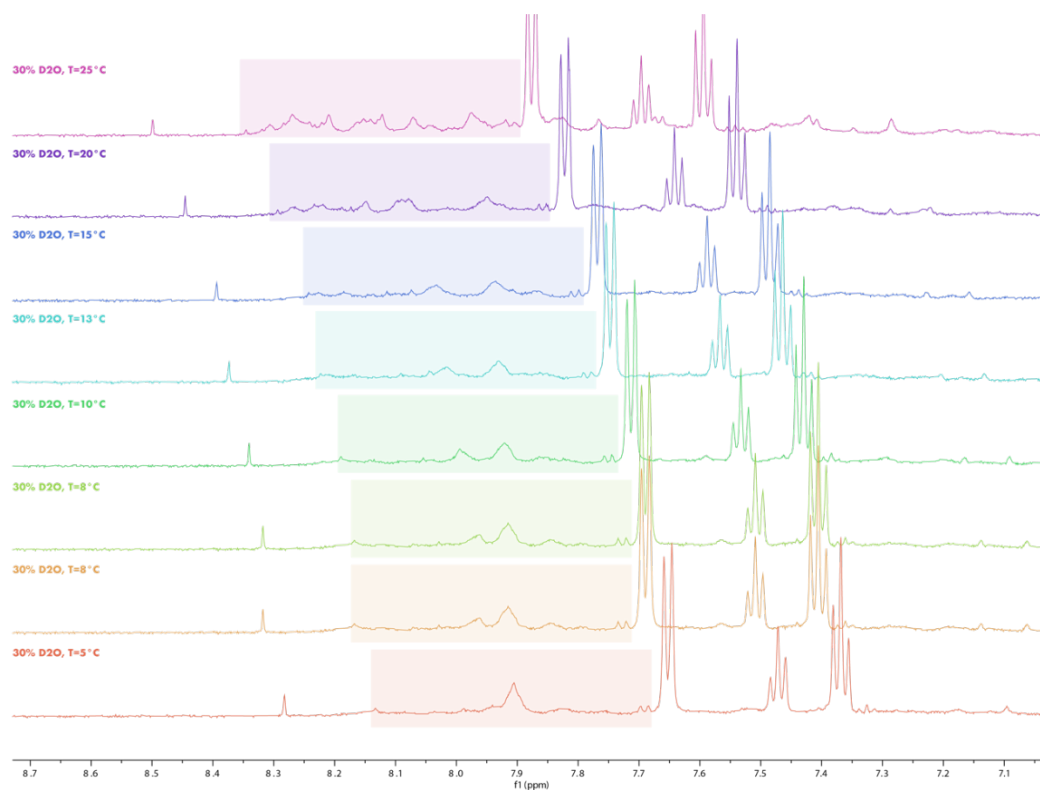


Figura 3.3. 2. Variaciones en las señales de RMN en la región de 7,00 ppm a 8,70 ppm ante cambios provocados por temperaturas entre los 5 °C y los 25 °C (10 mM PBS, 150 mM NaCl, 95% D₂O/5% H₂O, 256 pulsos, 600 MHz).

Para llevar a cabo el análisis del plegamiento conformacional del aptámero se usó el algoritmo UNAFold. Este es un webserver que usa un método computacional que predice la energía libre mínima necesaria para mantener la estabilidad de una secuencia de ADN dada y su estructura 2D correspondiente. El algoritmo presentado por Zuker, 2003; aún sigue vigente en el funcionamiento de la plataforma y este considera todas las posibles formas en que la secuencia de ADN puede “aparearse”, mientras identifica la conformación con la energía libre más baja basados valores de energía pre-establecidos.

En la **Figura 3.3.3**, se observa el diagrama generado por el algoritmo. Este fue el único resultado obtenido, lo cual podría indicar que dicha estructura 2D presenta la mayor energía de estabilización que el sistema puede alcanzar. Es recalcar que el apareamiento se genera entre los pares de bases ubicados del nucleótido 13 al 16 con sus pares ubicados entre 7 al 4. También salta a la vista la presencia de cuatro puentes de hidrógeno consecutivos que brindan origen a un solo nudo (“knot” en inglés). Dichas estructuras se creen que son las encargadas de las principales funciones de reconocimiento por parte de los aptámeros (Darfeuille et al, 2016; Sullivan, 2019). A su vez, los parámetros termodinámicos indican que la estructura tiene un valor de energía libre asociada de: $\Delta G = -0,55$ kcal/mol a la temperatura a la que se realizaron las reconstituciones de los aptámeros (50 °C), y a una concentración iónica de Na^+ de 150 mM. Dichas condiciones se usaron con el fin de mantener la consistencia con los resultados obtenidos en el análisis previo de RMN.

Es importante también mencionar que el hecho de que solo cuatro bases nitrogenadas tengan probabilidad de interactuar generaría una explicación del porque durante el análisis de RMN no se obtuvieron señales claras dentro del rango de los 9,0 ppm y 12 ppm donde se esperaría encontrar la señal del protón imino proveniente de los puentes de hidrogeno entre los apareamientos. Sin embargo, debido a la existencia de cadenas con menor probabilidad de generar puentes de hidrogeno (mayor flexibilidad), podría aumentar la frecuencia con la que dichos protones son intercambiados por el solvente, disminuyendo su resolución por medio de RMN (Furtig

et al, 2003). Por otro lado, debido a lo anterior tendría que las fuerzas de apilamiento e interacciones electroestáticas tomen un papel clave para la estabilización de la estructura del aptámero CDBS-1. Por lo tanto, esto se alinea con lo obtenido en las señales del rango de 7.10 ppm a 8.50 ppm donde se ubican las conexiones internas entre los protones de las bases nitrogenadas de manera paralela a la cadena de fosfatos (Furtig et al, 2003).

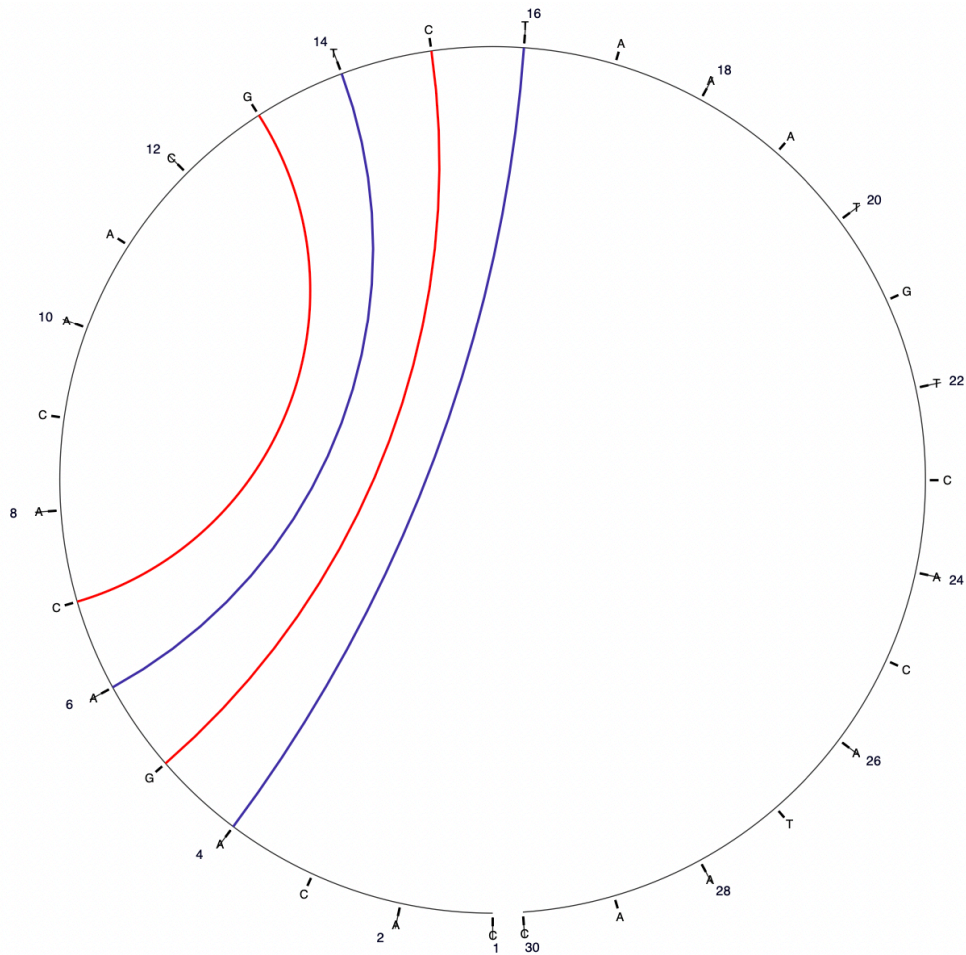


Figura 3.3. 3. Diagrama generado por mFold como modelo de la organización estructural 2D del aptámero.

Posterior a encontrar dicha organización estructural 2D, se continuó con los experimentos de plegamiento y organización 3D. Estos se realizaron a través del algoritmo descrito por Zhang et al, 2022. 3dRNA/DNA es un método computacional para predecir las estructuras tridimensionales de moléculas de ARN y ADN basándose en sus secuencias y estructuras 2D. El método se enfoca en el ensamblaje de fragmentos y estructuras homologas que se encuentran publicadas en bases de datos estructurales.

En la **Figura 3.3.4**, se pueden observar los modelos de la estructura 3D del aptámero. Dichas estructuras son el resultante de los procesos de iteración que conlleva el ensamble y comparación de estructuras contenidas en una base de datos. Las estructuras mostradas en dicha figura se encuentran organizadas en orden de energía, siendo A la estructura más estable y por lo tanto con un grado de confianza mayor de representar al menos una de las conformaciones activas del aptámero a lo largo de tiempo.

Vale la pena recalcar la presencia de interacciones no canónicas en todas las estructuras obtenidas. Dichas interacciones no son las usualmente encontradas en el apareamiento descrito por el modelo de Watson y Crick, sino que se refieren a interacciones entre bases nitrogenadas no complementarias, interacciones de apilamiento, o interacciones entre bases nitrogenadas y azúcares o fosfatos (Bansal et al, 2022).

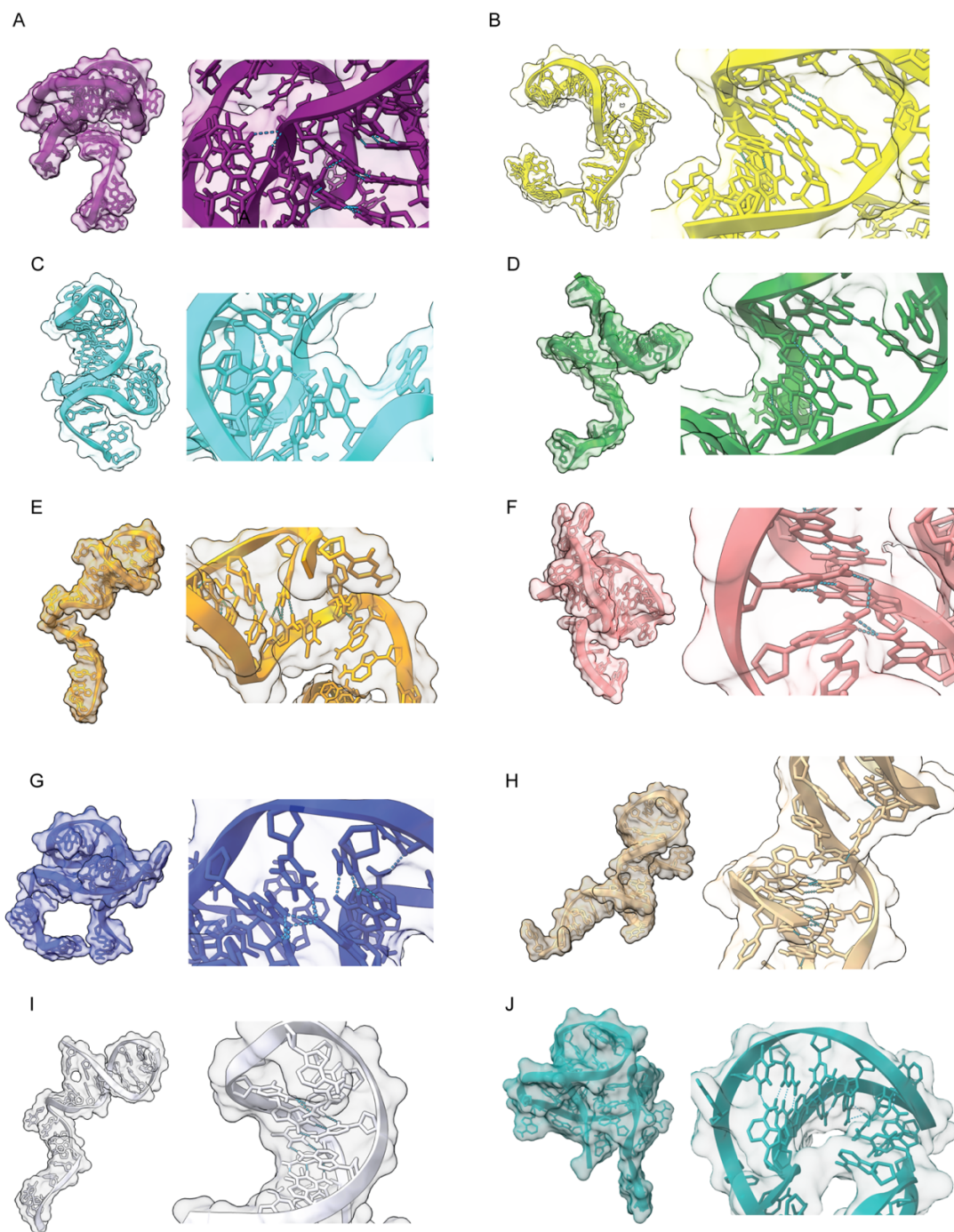


Figura 3.3. 4. Modelos de la estructura del aptámero optimizados por algoritmos grano grueso.

Se puede mencionar que de manera general el extremo 3' del aptámero se encontró como el extremo con menor impedimento estérico en la mayoría de las estructuras. Esto es pertinente para el sistema de detección generado, pues el anclaje realizado, y las pruebas moleculares que se realizaron tomando en cuenta solo la modificación en dicho extremo. Finalmente, es importante recalcar que estas conformaciones no necesariamente serán las mismas que se encontrarán ancladas en la superficie de óxido de grafeno, tal y como se discutió en el capítulo 1.4, la presencia del material rico en electrones puede generar cambios en la estructura electrónica de los aptámeros, lo que puede generar la variación de los efectos termodinámicos en la cadena del aptámero.

A pesar de no haber sido un resultado concluyente, dentro de los posibles blancos de interacción que se obtuvieron fueron las proteínas que componen la capa S. Dicha capa se encuentra constituida por complejos proteicos de proteínas SlpA de diferentes pesos moleculares. Estas forman una red en forma de tamiz molecular que se cree que evita la penetración de macromoléculas de cierto peso molecular al espacio más próximo de la bacteria, además de funciones de adhesinas debido a su alta área superficial (Lanzoni-Mangutchi et al, 2022).

Dicha estructura fue descargada del PDB (7ACY), la cual fue cristalizada por Lanzoni-Mangutchi et al, 2022; de *C. difficile* 630 con una resolución de 2.55 Å. Las estructuras del aptámero que se tomaron en cuenta fueron las presentadas en la **Figura 3.3.4**. Dichas estructuras fueron optimizadas a través del campo de fuerza MARTINI (Honorato et al, 2019), los cuales siguieron un patrón clásico a los modelos de grano grueso explicados en el capítulo 1.6. El docking (interacción proteína -aptámero) fue llevado a cabo en HADDOCK2.4 (Kurkcuoglu & Bonvin, 2019).

En la **Figura 3.3.5**, se observa el resultado de la estructura más estable generada por el modelo de interacción aptámero- proteína. Vale la pena mencionar que de las estructuras analizadas el aptámero tuvo una mayor afinidad a unirse en los dominios cercanos a los mostrados en **Figura 3.3.5-a, b**. Esto podría indicar que existe cierto patrón

de componentes en dicho dominio que impone cierta atracción para la interacción con el aptámero. A su vez, como se ve en la **Figura 3.3.5-b** la cual corresponde a la proyección desde el eje y-z, la zona de interacción corresponde a la cara externa del complejo proteico. Lo anterior es interesante, pues no se generó ningún tipo de limitación estructural para que durante el proceso de interacción se guiara el anclaje a dicha zona.

Otro detalle por destacar es que al analizar la **Figura 3.3.5-a** la cual corresponde a la proyección desde el eje x-y, se observa que el dominio de interacción se encuentra en los extremos que a su vez interactúan con otras unidades del mismo complejo para formar el entramado o red antes descrita. Dicha cercanía entre aptámeros y sitios de anclaje podría explicar la formación de redes al aplicar el aptámero en solución ante la presencia de la espora. Al estar tan cercanos entre sí y al ser los dominios repetitivos, los aptámeros podrían tender a agregarse e interactuar con las cadenas libres más flexibles formando un complejo en forma de dímero que aumente la avidéz del reconocimiento por parte de este.

Finalmente, en la **Figura 3.3.5-c**, se observa la porción del aptámero (en naranja) y la proteína (en blanco) donde se genera la energía más estable de interacción entre ambas estructuras. Se puede observar la presencia de tres puentes de hidrogeno mediados por el aminoácido tirosina como extremo donante y los oxígenos del grupo fosfato de la citosina-25 como extremos aceptores.

A su vez, la presencia de aminoácidos básicos como la lisina también generan la interacción entre el grupo de guanidina con los protones presentes en el azúcar de la timina-14. Se puede observar además la interacción del grupo OH de la serina con el protón y el nitrógeno de la guanina-21. Adicionalmente, las fuerzas de interacción de Van der Waals entre las nubes pi de las bases nitrogenadas que también podrían tener implicaciones de estabilización a través de sus interacciones no polares.

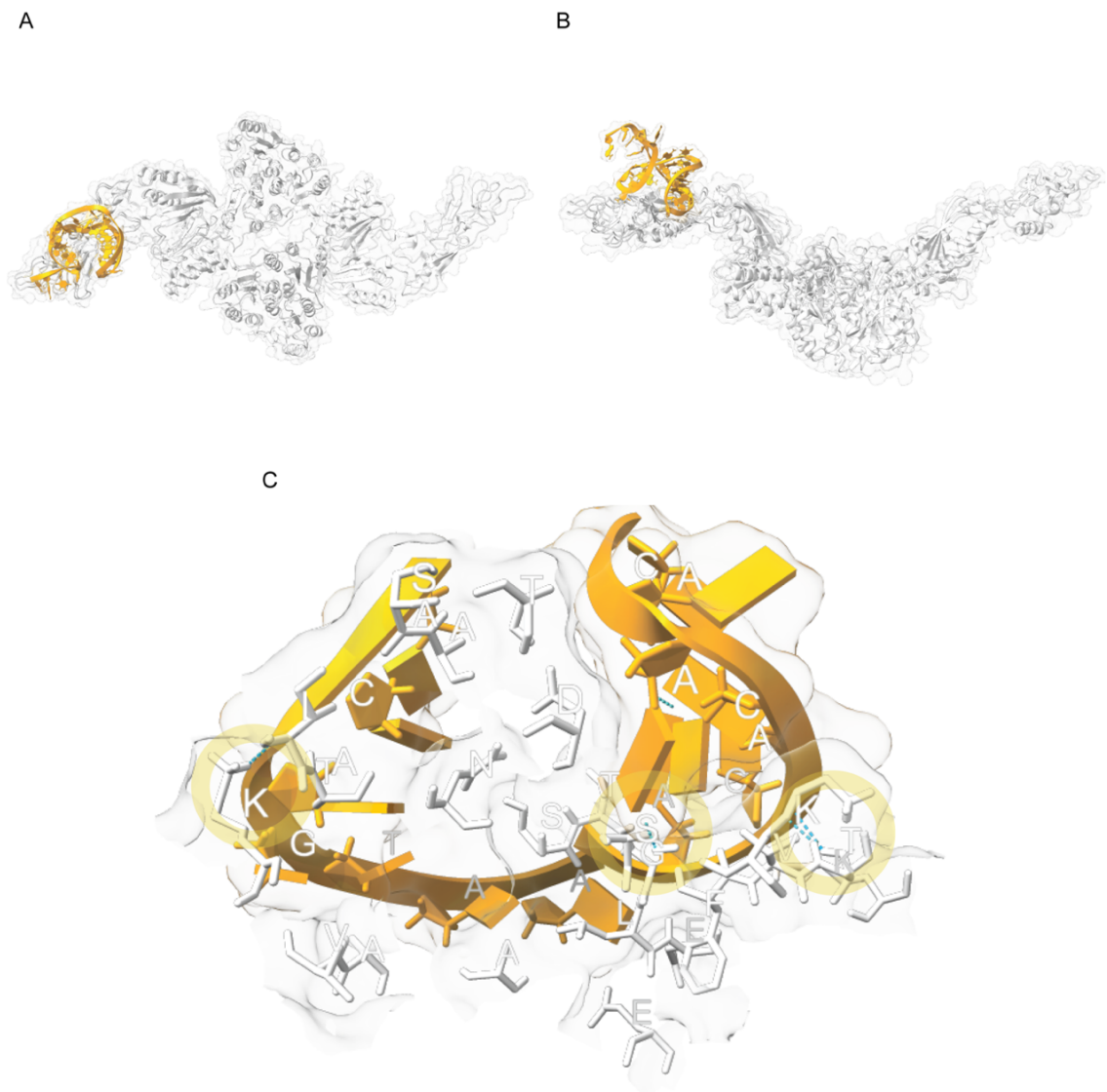


Figura 3.3. 5. Modelo de la interacción del aptámero con la proteína SlpA como posible componente de la capa S-layer (no antes descrito) de las esporas de *C. difficile*.

Estos resultados obtenidos desde el punto de vista computacional podrían apoyar una de las hipótesis mencionadas en el *capítulo 3.1*. Específicamente, la hipótesis D en la que se indica:

“El aptámero interactúa con espacios químicos generados por conformaciones de modificaciones postraduccionales u otros grupos funcionales que no necesariamente pueden ser propiciados por la presencia de péptidos en específico. Por ejemplo, el caso en el que el aptámero requiriera la interacción cercana entre una glicosilación y una fosforilación sin importar el péptido o los péptidos en donde estas se encuentren.”

Esto debido a que la presencia de los grupos de interacción mencionados de la **Figura 3.3.5-c** son grupos comunes en las proteínas de *C. difficile*, principalmente las lisinas y las tirosinas al ser mayoritariamente péptidos básicos y polares correspondientemente. Por lo que el modo de interacción más simple es la atracción por cargas electrostáticas y puentes de hidrogeno entre los grupos fosfatos y los aminoácidos básicos y polares presentes en la superficie de este tipo de estructuras.

Aún se requiere mayor validación experimental como cristalografía de rayos X o microscopia cryo-EM para elucidar el blanco molecular y el modo de interacción entre ambas estructuras. Sin embargo, este trabajo se genera la primera exploración de la posible interacción entre componentes proteicos de la espora de *C. difficile* y un aptámero de cadena sencilla de ADN.

Capítulo 4: Conclusiones y recomendaciones

Se destacó la importancia de la estandarización de métodos de extracción de proteínas de las cepas menos estudiadas de *C. difficile*. Además, en este trabajo se modificó la categorización funcional usada por Diaz-Gonzales et al, 2015; para ser adaptada a un contexto más apropiado para esporas y se compararon los diferentes artículos presentes en la literatura basados en estas nuevas categorías.

Se encontraron 99 péptidos que no habían sido reportados anteriormente como parte de las esporas de *C. difficile*; dentro de las cuales la gran mayoría (27,3%) hacen parte del metabolismo central. Debido a esto, se discutió sobre las proteínas “moonlight” y el papel de ciertas proteínas asociadas al metabolismo en funciones no esperables, tales como factores de virulencia. Dichos casos se generan en contextos diferentes a lo usual, por lo que se propone que la gran cantidad de proteínas metabólicas presentes en las capas externas de la spora podrían tener funciones en la patogénesis a través de procesos de “moonlighting” aún no descritos.

Se realizaron ensayos moleculares para verificar la interacción del aptámero con proteínas de la spora de *C. difficile*. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron concluyentes al obtener la interacción del sistema HRP-estreptavidina con posibles proteínas endógenas biotiniladas al realizar Western Blot de 1 dimensión y la baja detección por espectrometría de masas del péptido captado por la inmunoprecipitación mediada por partículas magnéticas.

Se recomienda el uso de diferentes técnicas moleculares como SRP para la obtención de resultados confirmatorios a la interacción. A su vez, se recomienda el análisis de Cryo-EM de la estructura del aptámero con su blanco molecular o la cristalografía de rayos X para la elucidación de la interacción entre ambas estructuras.

El anclaje del aptámero con la spora se determinó mediante métodos de microscopía de fuerza atómica y espectroscopía de efecto fotoeléctrico.

Se obtuvo el modelaje molecular tomando en cuenta la optimización previa de las condiciones de salinidad generada por RMN. Además, se estudió a diferentes niveles

la organización estructural del aptámero, esto con el fin de entender posteriormente su enlace en el ensayo de interacción en presencia de la proteína SlpA de la capa S. A pesar de que dicho blanco molecular no se considera totalmente concluyente, es interesante que los modos de anclaje se lleven a cabo en un área determinada del blanco molecular que es consistente con dominios que están expuestos en contacto con el ambiente. La hipótesis con la que se concluye es que es posible que el aptámero interactúe con grupos ácidos y polares de las proteínas de la superficie de la espora que pueden verse afectados en carga o en ambiente estructural requerido debido a los agentes caotrópicos y surfactantes requeridos para la solubilización de los péptidos de la espora.

Se generó el modelo de la interacción con uno de los posibles componentes de la espora de *C. difficile*, el cual requiere de más validación estructural, así la comprobación de que dicho componente (S-layer) se encuentra en las esporas de esta bacteria.

Bibliografía

1. Abdallah, C., Dumas-Gaudot, E., Renaut, J., & Sergeant, K. (2012). Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *International Journal of Plant Genomics*, 2012. doi:10.1155/2012/494572
2. Abhyankar, W., Zheng, L., Brul, S., de Koster, C. G., & de Koning, L. J. (2019). Vegetative Cell and Spore Proteomes of *Peptoclostridium difficile* show finite differences and reveal potential biomarkers. *BioRxiv*. doi:10.1101/598045
3. Abujamel, T., Cadnum, J. L., Jury, L. A., Sunkesula, V. C. K., Kundrapu, S., Jump, R. L. P., ... Donskey, C. J. (2013). Defining the Vulnerable Period for Re-Establishment of *Clostridium difficile* Colonization after Treatment of *C. difficile* Infection with Oral Vancomycin or Metronidazole. *PLOS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0076269
4. Adelman, M. W., Woodworth, M. H., Shaffer, V. O., Martin, G. S., & Kraft, C. S. (2020). Critical Care Management of the Patient with *Clostridioides difficile*. *Critical Care Medicine*. doi:10.1097/ccm.0000000000004739
5. Akinwande, D., Brennan, C. J., Bunch, J. S., Egberts, P., Felts, J. R., Gao, H., ... Zhu, Y. (2017). A review on mechanics and mechanical properties of 2D materials—Graphene and beyond. *Extreme Mechanics Letters*. doi:10.1016/j.eml.2017.01.008
6. Al-Gaashani, R., Najjar, A., Zakaria, Y., Zakaria, Y., Mansour, S., & Atieh, M. A. (2019). XPS and structural studies of high quality graphene oxide and reduced graphene oxide prepared by different chemical oxidation methods. *Ceramics International*. doi:10.1016/j.ceramint.2019.04.165
7. Amiri, A., Naraghi, M., Ahmadi, G., Soleymaniha, M., & Shanbedi, M. (2018). A review on liquid-phase exfoliation for scalable production of pure graphene, wrinkled, crumpled and functionalized graphene and challenges. *FlatChem*. doi:10.1016/j.flatc.2018.03.004
8. Aptamers, |., & Sakamoto, T. (2017). *MINI-REVIEW NMR study of aptamers*. 1, 13–18.

9. Arroyo, L. G., Rousseau, J., Willey, B. M., Low, D. E., Staempfli, H., McGeer, A., & Weese, J. S. (2005). Use of a selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*, 5341–5343. doi:10.1128/JCM.43.10.5341-5343.2005
10. Arthur, D. J., Silvy, R. P., Wallis, P., Tan, Y., Rocha, J.-D. R., Resasco, D. E., ... Hurley, W. (2012). Carbon nanomaterial commercialization: Lessons for graphene from carbon nanotubes. *Mrs Bulletin*. doi:10.1557/mrs.2012.276
11. Asempa, T. E., & Nicolau, D. P. (2017). *Clostridium difficile* infection in the elderly: an update on management. *Clinical Interventions in Aging*. doi:10.2147/cia.s149089
12. Bahreyni, A., Tahmasebi, S., Ramezani, M., Alibolandi, M., Danesh, N. M., Abnous, K., & Taghdisi, S. M. (2019). A novel fluorescent aptasensor for sensitive detection of PDGF-BB protein based on a split complementary strand of aptamer and magnetic beads. *Sensors and Actuators B-Chemical*. doi:10.1016/j.snb.2018.10.047
13. Balandin, A. A., Ghosh, S., Bao, W., Calizo, I., Teweldebrhan, D., Miao, F., & Lau, C. N. (2008). Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene. *Nano Letters*. doi:10.1021/nl0731872
14. Baloh, M., & Sorg, J. A. (2021). *Clostridioides difficile* SpoVAD and SpoVAE Interact and Are Required for Dipicolinic Acid Uptake into Spores. *Journal of Bacteriology*. doi:10.1128/jb.00394-21
15. Bansal, A., Kaushik, S., & Kukreti, S. (2022). Non-canonical DNA structures: Diversity and disease association. *Frontiers in Genetics*, *13*, 102–113. doi:10.3389/fgene.2022.959258
16. Baggerman, G., Boonen, K., Verleyen, P., De Loof, A., Schoofs, L. (2005). Peptidomic analysis of the larval *Drosophila melanogaster* central nervous system by two-dimensional capillary liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* *40*(2): 250-260.

17. Barker, A. K., Zellmer, C., Tischendorf, J., Duster, M., Valentine, S., Wright, M. O., & Safdar, N. (2017). On the hands of patients with *Clostridium difficile*: A study of spore prevalence and the effect of hand hygiene on *C difficile* removal. *American Journal of Infection Control*. doi:10.1016/j.ajic.2017.03.005
18. Betancur, A. F., Ornelas-Soto, N., Garay-Tapia, A. M., Garay-Tapia, A. M., Pérez, F. R., Pérez, F. R., ... García, A. G. (2018). A general strategy for direct synthesis of reduced graphene oxide by chemical exfoliation of graphite. *Materials Chemistry and Physics*. doi:10.1016/j.matchemphys.2018.07.019
19. Bizzotto, D., Burgess, I. J., Doneux, T., Sagara, T., & Yu, H. Z. (1 2018). Beyond Simple Cartoons: Challenges in Characterizing Electrochemical Biosensor Interfaces. *ACS Sensors*, 3, 5–12. doi:10.1021/acssensors.7b00840
20. Bogomolova, A., Bogomolova, A., Komarova, E., Komarova, E., Reber, K., Gerasimov, T., ... Aldissi, M. (2009). Challenges of electrochemical impedance spectroscopy in protein biosensing. *Analytical Chemistry*. doi:10.1021/ac9002358
21. Boisbouvier, J., Brutscher, B., Pardi, A., Marion, D., & Simorre, J. P. (7 2000). NMR determination of sugar puckers in nucleic acids from CSA-dipolar cross-correlated relaxation [8]. *Journal of the American Chemical Society*, 122, 6779–6780. doi:10.1021/ja000976b
22. Bonanni, A., Ambrosi, A., & Pumera, M. (2 2012). Nucleic acid functionalized graphene for biosensing. *Chemistry - A European Journal*, 18, 1668–1673. doi:10.1002/chem.201102850
23. Boneschanscher, M. P., van der Lit, J., Sun, Z., Swart, I., Liljeroth, P., & Vanmaekelbergh, D. (2012). Quantitative Atomic Resolution Force Imaging on Epitaxial Graphene with Reactive and Nonreactive AFM Probes. *ACS Nano*. doi:10.1021/nn3040155
24. Bothe, J. R., Nikolova, E. N., Eichhorn, C. D., Chugh, J., Hansen, A. L., & Al-Hashimi, H. M. (11 2011). Characterizing RNA dynamics at atomic resolution using

solution-state NMR spectroscopy. *Nature Methods*, 8, 919–931. doi:10.1038/nmeth.1735

25. Bottari, F., Daems, E., de Vries, A.-M., Van Wielendaele, P., Van Wielendaele, P., Trashin, S. A., ... Wael, K. D. (2020). Do Aptamers Always Bind? The Need for a Multifaceted Analytical Approach When Demonstrating Binding Affinity between Aptamer and Low Molecular Weight Compounds. *Journal of the American Chemical Society*. doi:10.1021/jacs.0c08691

26. Boyda, D. L., Boyda, D. L., Braguta, V., Katsnelson, M. I., & Ulybyshev, M. V. (2016). Many-body effects on graphene conductivity: Quantum Monte Carlo calculations. *Physical Review B*. doi:10.1103/physrevb.94.085421

27. Bradshaw, W. J., Kirby, J. M., Roberts, A. K., Shone, C. C., & Acharya, K. R. (2017). Cwp2 from *Clostridium difficile* exhibits an extended three domain fold and cell adhesion in vitro. *FEBS Journal*, 284, 2886–2898. doi:10.1111/febs.14157

28. Brintlinger, T., Brintlinger, T. H., Buckhout-White, S., Bassim, N., Mathur, D., Samanta, A., ... Ancona, M. G. (2020). Chemical Mapping of Unstained DNA Origami Using STEM/EDS and Graphene Supports. *Null*. doi:10.1021/acsnm.9b02574

29. Brown, K. A., Langford, B., Schwartz, K. L., Diong, C., Garber, G., Garber, G., ... Daneman, N. (2020). Antibiotic Prescribing Choices and Their Comparative *C. Difficile* Infection Risks: A Longitudinal Case-Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases*. doi:10.1093/cid/ciaa124

30. Bruno, J. G. (2022). Applications in Which Aptamers Are Needed or Wanted in Diagnostics and Therapeutics. *Pharmaceuticals*. doi:10.3390/ph15060693

31. Buggy, B. P., Wilson, K. H., & Fekety, R. (1983). *Comparison of Methods for Recovery of Clostridium difficile from an Environmental Surface* (Vol. 18, pp. 348–352). Retrieved from <https://journals.asm.org/journal/jcm>

32. Byun, J., & Byun, J. (2021). Recent progress and opportunities for nucleic acid aptamers. *Life*. doi:10.3390/life11030193

33. Canoura, J., Yu, H., Alkhamis, O., Roncancio, D., Farhana, R., & Xiao, Y. (1 2021). Accelerating Post-SELEX Aptamer Engineering Using Exonuclease Digestion. *Journal of the American Chemical Society*, *143*, 805–816. doi:10.1021/jacs.0c09559
34. Carling, P. C., O’Hara, L. M., Harris, A. D., & Olmsted, R. (3 2023). Mitigating hospital-onset *Clostridioides difficile* : The impact of an optimized environmental hygiene program in eight hospitals. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *44*, 440–446. doi:10.1017/ice.2022.84
35. Chansaenpak, K., Kamkaew, A., Lisnund, S., Prachai, P., Ratwirunkit, P., Jingpho, T., ... Pinyou, P. (1 2021). Development of a Sensitive Self-Powered Glucose Biosensor Based on an Enzymatic Biofuel Cell. *Biosensors*, *11*. doi:10.3390/bios11010016
36. Chappelle, M. L. de la, & Pucci, A. (2013). *Multi-Signal Processing Biosensors and Bioactuators Based on Biocomputing Concept*. <https://doi.org/10.1201/b14594-15>
37. Chapnick, D. A., Bunker, E., Liu, X., & Old, W. M. (2019). Temporal Metabolite, Ion, and Enzyme Activity Profiling Using Fluorescence Microscopy and Genetically Encoded Biosensors. *Methods of Molecular Biology*. doi:10.1007/978-1-4939-9236-2_21
38. Charlton, T. M., Kovacs-Simon, A., Michell, S. L., Fairweather, N. F., & Tate, E. W. (11 2015). Quantitative Lipoproteomics in *Clostridium difficile* Reveals a Role for Lipoproteins in Sporulation. *Chemistry and Biology*, *22*, 1562–1573. doi:10.1016/j.chembiol.2015.10.006
39. Chen, S., Hwang, M. T., Wang, J., Ganguli, A., Park, I., Kim, Y., ... Bashir, R. (2022). Advances in Electronic Nano-biosensors and New Frontiers in Bioengineering. *International Electron Devices Meeting*. doi:10.1109/iedm45625.2022.10019512
40. Cheng, S., Tu, Z., Zheng, S., Cheng, X., Han, H., Wang, C., ... Gu, B. (2021). An efficient SERS platform for the ultrasensitive detection of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* via wheat germ agglutinin-modified magnetic SERS

substrate and streptavidin/aptamer co-functionalized SERS tags. *Analytica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.aca.2021.339155

41. Chiticaru, E. A., Pilan, L., Damian, C.-M., Damian, C.-M., Damian, C.-M., Damian, C. M., ... Ioniță, M. (2019). Influence of Graphene Oxide Concentration when Fabricating an Electrochemical Biosensor for DNA Detection. *Biosensors*. doi:10.3390/bios9040113

42. Chivers, C. E., Koner, A. L., Lowe, E. D., & Howarth, M. (4 2011). How the biotin-streptavidin interaction was made even stronger: Investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochemical Journal*, 435, 55–63. doi:10.1042/BJ20101593

43. Churcher, Z. R., Garaev, D., Hunter, H. N., & Johnson, P. E. (9 2020). Reduction in Dynamics of Base pair Opening upon Ligand Binding by the Cocaine-Binding Aptamer. *Biophysical Journal*, 119, 1147–1156. doi:10.1016/j.bpj.2020.08.012

44. Connor, M. C., Flynn, P. B., Fairley, D., Marks, N. J., Manesiotis, P., Graham, W., ... McGrath, J. W. (2017). Evolutionary clade affects resistance of *Clostridium difficile* spores to Cold Atmospheric Plasma. *Scientific Reports*. doi:10.1038/srep41814

45. Corrales, F.; Calvete, J.(2014). Manual de proteomica. Sociedad Española de Proteomica.

46. Gonzalez-Carballo, Gian-Carlo and Rodriguez, César. Resistencia de esporas de *Clostridioides difficile* de la cepa NAP_{CR1}(Clostridiales: Peptostreptococcaceae) al dicloroisocianurato de sodio. *Rev. biol. trop* [online]. 2021, vol.69, n.2, pp.755-762. ISSN 0034-7744. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v69i2.42255>.

47. Cui, Y., Lee, Y. H., & Yang, J. W. (12 2017). Impact of Carboxyl Groups in Graphene Oxide on Chemoselective Alcohol Oxidation with Ultra-Low Carbocatalyst Loading. *Scientific Reports*, 7. doi:10.1038/s41598-017-03468-4

48. Daher, M. G., Taya, S. A., Colak, I., Patel, S. K., Olaimat, M. M., & Ramahi, O. (5 2022). Surface plasmon resonance biosensor based on graphene layer for the

detection of waterborne bacteria. *Journal of Biophotonics*, 15. doi:10.1002/jbio.202200001

49. Dans, P. D., Walther, J., Gómez, H., & Orozco, M. (4 2016). Multiscale simulation of DNA. *Current Opinion in Structural Biology*, 37, 29–45. doi:10.1016/j.sbi.2015.11.011

50. Dans, P. D., Zeida, A., MacHado, M. R., & Pantano, S. (5 2010). A coarse grained model for atomic-detailed DNA simulations with explicit electrostatics. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6, 1711–1725. doi:10.1021/ct900653p

51. Darfeuille, F., Reigadas, S., Hansen, J. B., Orum, H., Primo, C. D., & Toulmé, J. J. (10 2006). Aptamers targeted to an RNA hairpin show improved specificity compared to that of complementary oligonucleotides. *Biochemistry*, 45, 12076–12082. doi:10.1021/bi0606344

52. Delcourt, S. G., & Blake, R. D. (1991). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Stacking Energies in DNA** (Vol. 266, pp. 15160–15169).

53. Deng, B., Liu, Z., Peng, L.-M., & Peng, H. (2019). Toward Mass Production of CVD Graphene Films. *Advanced Materials*. doi:10.1002/adma.201800996

54. Dhanjai, Lu, X., Wu, L., Chen, J., & Lu, Y. (4 2020). Robust Single-Molecule Enzyme Nanocapsules for Biosensing with Significantly Improved Biosensor Stability. *Analytical Chemistry*, 92, 5830–5837. doi:10.1021/acs.analchem.9b05466

55. Diab, S. S., Rodriguez-Bertos, A., Rodríguez-Bertos, A., & Uzal, F. A. (2013). Pathology and diagnostic criteria of *Clostridium difficile* enteric infection in horses. *Veterinary Pathology*. doi:10.1177/0300985813489039

56. Díaz-González, F., Milano, M., Olguin-Araneda, V., Pizarro-Cerda, J., Castro-Córdova, P., Tzeng, S. C., ... Paredes-Sabja, D. (6 2015). Protein composition of the outermost exosporium-like layer of *Clostridium difficile* 630 spores. *Journal of Proteomics*, Vol. 123, pp. 1–13. doi:10.1016/j.jprot.2015.03.035

57. Dimiev, A. M., Khannanov, A., Vagizov, F. G., Vakhitov, I. R., Kiiamov, A., Shukhina, K., & Tour, J. M. (2018). Revisiting the Mechanism of Oxidative Unzipping of

Multiwall Carbon Nanotubes to Graphene Nanoribbons. *ACS Nano*. doi:10.1021/acsnano.8b01617

58. Dindorkar, S. S., Dindorkar, S. S., Yadav, A., & Yadav, A. (2022). Comparative study on adsorption behaviour of the monolayer graphene, boron nitride and silicon carbide hetero-sheets towards carbon monoxide: Insights from first-principle studies. *Computational and Theoretical Chemistry*. doi:10.1016/j.comptc.2022.113676

59. Dortz, L. L. L., Rouxel, C., Leroy, Q., Brosseau, N., Boulouis, H.-J., Haddad, N., ... Deshuillers, P. (2022). Optimized Lambda Exonuclease Digestion or Purification Using Streptavidin-Coated Beads: Which One Is Best for Successful DNA Aptamer Selection? *Methods and Protocols*. doi:10.3390/mps5060089

60. Drabik, A., Ner-Kluza, J., Mielczarek, P., Civit, L., Mayer, G., & Silberring, J. (6 2018). Advances in the Study of Aptamer-Protein Target Identification Using the Chromatographic Approach. *Journal of Proteome Research*, 17, 2174–2181. doi:10.1021/acs.jproteome.8b00122

61. Dufrenne, J., Tatini, S., & Notermans, S. (1994). *Stability of spores of Bacillus cereus stored on silicagel* (Vol. 23, pp. 111–116).

62. Dyer, C., Hutt, L. P., Burky, R., & Joshi, L. T. (2019). Biocide Resistance and Transmission of *Clostridium difficile* Spores Spiked onto Clinical Surfaces from an American Health Care Facility. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/aem.01090-19

63. Edmonds, S. L., Edmonds, S. L., Zapka, C., Zapka, C. A., Kasper, D. J., Gerber, R., ... Gerding, D. N. (2013). Effectiveness of hand hygiene for removal of *Clostridium difficile* spores from hands. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. doi:10.1086/669521

64. Edwards, A. L., Garst, A. D., & Batey, R. T. (2009). Determining Structures of RNA Aptamers and Riboswitches by X-Ray Crystallography. *Methods of Molecular Biology*. doi:10.1007/978-1-59745-557-2_9

65. Edwards, A. N., Karim, S. T., Pascual, R. A., Jowhar, L. M., Anderson, S. E., & McBride, S. M. (2016). Chemical and Stress Resistances of *Clostridium difficile* Spores and Vegetative Cells. *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2016.01698
66. Ercan, H., Resch, U., Hsu, F., Mitulovic, G., Bileck, A., Gerner, C., ... Zellner, M. (3 2023). A Practical and Analytical Comparative Study of Gel-Based Top-Down and Gel-Free Bottom-Up Proteomics Including Unbiased Proteoform Detection. *Cells*, 12. doi:10.3390/cells12050747
67. Fazrin, E. I., Sofiatin, Y., Gaffar, S., Subroto, T., & Hartati, Y. W. (2021). A Functionalized Screen-Printed Carbon with CeO₂/AuNP-Streptavidin-Biotinylated Aptamer as an Electrochemical Biosensor for Detection of Epithelial Sodium Channel (ENaC). *Social Science Research Network*. doi:10.2139/ssrn.3897780
68. Fellows, T., Ho, L. S. J., Ho, L., Flanagan, S., Fogel, R., Ojo, D., & Limson, J. (2020). Gold nanoparticle-streptavidin conjugates for rapid and efficient screening of aptamer function in lateral flow sensors using novel CD4-binding aptamers identified through Crossover-SELEX. *Analyst*. doi:10.1039/d0an00634c
69. Ferreira, D. C. M., Mendes, R. K., & Kubota, L. T. (2010). Kinetic studies of HRP adsorption on ds-DNA immobilized on gold electrode surface by EIS and SPR. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. doi:10.1590/s0103-50532010000900008
70. Fischer, C., Hünninger, T., Jarck, J. H., Frohnmeyer, E., Kallinich, C., Haase, I., ... Fischer, M. (8 2015). Food Sensing: Aptamer-Based Trapping of *Bacillus cereus* Spores with Specific Detection via Real Time PCR in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 8050–8057. doi:10.1021/acs.jafc.5b03738
71. Francis, M. B., Allen, C. A., & Sorg, J. A. (2015). Spore cortex hydrolysis precedes dipicolinic acid release during *Clostridium difficile* spore germination. *Journal of Bacteriology*, 197, 2276–2283. doi:10.1128/JB.02575-14
72. Freedberg, D. E., Salmasian, H., Cohen, B., Abrams, J. A., & Larson, E. (2016). Receipt of Antibiotics in Hospitalized Patients and Risk for *Clostridium difficile*

Infection in Subsequent Patients Who Occupy the Same Bed. *JAMA Internal Medicine*. doi:10.1001/jamainternmed.2016.6193

73. Freeman, J. (2003). *The effects of storage conditions on viability of Clostridium difficile vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces* (Vol. 56, pp. 126–128). Retrieved from www.jclinpath.com

74. Fürtig, B., Richter, C., Wöhnert, J., & Schwalbe, H. (10 2003). NMR spectroscopy of RNA. *ChemBioChem*, 4, 936–962. doi:10.1002/cbic.200300700

75. Gao, Y., Yu, H., Tian, J., Xiao, B., & Xiao, B. (2021). Nonenzymatic DNA-Based Fluorescence Biosensor Combining Carbon Dots and Graphene Oxide with Target-Induced DNA Strand Displacement for microRNA Detection. *Nanomaterials*. doi:10.3390/nano11102608

76. Gautier, A. (2022). Fluorescence-Activating and Absorption-Shifting Tags for Advanced Imaging and Biosensing. *Accounts of Chemical Research*. doi:10.1021/acs.accounts.2c00098

77. Giansanti, P., Tsiatsiani, L., Low, T. Y., & Heck, A. J. R. (5 2016). Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nature Protocols*, 11, 993–1006. doi:10.1038/nprot.2016.057

78. Giegold, V., Lange, L., Ciesielski, R., & Hartschuh, A. (2020). Non-linear Raman scattering intensities in graphene. *Nanoscale*. doi:10.1039/c9nr10654e

79. Girinathan, B. P., Braun, S. E., Braun, S. E., Sirigireddy, A. R. S., Lopez, J. E., & Govind, R. (2016). Importance of Glutamate Dehydrogenase (GDH) in *Clostridium difficile* Colonization In Vivo. *PLOS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0160107

80. Grodecki, K., Jozwik, I., Baranowski, J. M., Teklinska, D., Strupinski, W., & Strupiński, W. (2016). SEM and Raman analysis of graphene on SiC(0001). *Micron*. doi:10.1016/j.micron.2015.05.013

81. Guerrero, D. M., Nerandzic, M. M., Jury, L. A., Jinno, S., Chang, S., & Donskey, C. J. (2012). Acquisition of spores on gloved hands after contact with the skin

of patients with *Clostridium difficile* infection and with environmental surfaces in their rooms. *American Journal of Infection Control*. doi:10.1016/j.ajic.2011.08.002

82. Guh, A., Adkins, S. H., Li, Q., Bulens, S. N., Farley, M. M., Smith, Z., ... McDonald, L. C. (2015). Risk Factors for Community-Associated *Clostridium difficile* Infection in Adults: A Case-Control Study. *Open Forum Infectious Diseases*. doi:10.1093/ofid/ofx171

83. Hazleton, K. Z., Hazleton, K. Z., Martin, C. G., Arnolds, K. L., Nusbacher, N. M., Moreno-Huizar, N., ... Lozupone, C. A. (2019). Dietary fat and fiber impacts intestinal microbiome resilience to antibiotics and *Clostridoides difficile* infection in mice. *BioRxiv*. doi:10.1101/828939

84. Hennequin, C., Porcheray, F., Waligora-Dupriet, A.-J., Collignon, A., Barc, M.-C., Bourlioux, P., & Karjalainen, T. (2001). *GroEL (Hsp60) of Clostridium difficile is involved in cell adherence* (Vol. 147, pp. 87–96). Retrieved from www.sanger.ac.uk

85. Hensgens, M. P. M., Hensgens, M. P. M., Keessen, E. C., Squire, M. M., Riley, T. V., Koene, M. G. J., ... Kuijper, E. J. (2012). *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection*. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x

86. Hermann, T., & Patel, D. J. (2000). Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science*. doi:10.1126/science.287.5454.820

87. Hianik, T., Ostatná, V., Zajacová, Z., Stoikova, E. E., & Evtugyn, G. (2005). Detection of aptamer-protein interactions using QCM and electrochemical indicator methods. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. doi:10.1016/j.bmcl.2004.10.083

88. Hirshon, J. M., Thompson, A. D., Limbago, B., McDonald, L. C., Bonkosky, M., Heimer, R., ... Braden, C. (2011). *Clostridium difficile* infection in outpatients, Maryland and Connecticut, USA, 2002-2007. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 1946–1949. doi:10.3201/eid1710.110069

89. Honorato, R. V., Roel-Touris, J., & Bonvin, A. M. J. J. (10 2019). MARTINI-Based Protein-DNA Coarse-Grained HADDOCKing. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6. doi:10.3389/fmolb.2019.00102
90. Hua, Y., Wang, R., & Li, D. (2022). A Fiber-based SPR Aptasensor for the In Vitro Detection of Inflammation Biomarkers. *Micromachines*. doi:10.3390/mi13071036
91. Huang, J., Park, G. W., Jones, R., Frazer, A., Vinjé, J., & Jiang, X. (2021). Efficacy of commercially available disinfectants against human norovirus surrogates and *Clostridioides difficile* endospores. *Null*. doi:10.21203/rs.3.rs-903165/v1
92. Huang, L., Huang, L., Huang, L., Zhang, D., Zhang, F., Zhang, F., ... Gan, Y. (2018). High-Contrast SEM Imaging of Supported Few-Layer Graphene for Differentiating Distinct Layers and Resolving Fine Features: There is Plenty of Room at the Bottom. *Small*. doi:10.1002/smll.201704190
93. Hui, W., Li, T., Liu, W., Zhou, C., Zhou, C., Gao, F., & Gao, F. (2019). Fecal microbiota transplantation for treatment of recurrent *C. difficile* infection: An updated randomized controlled trial meta-analysis. *PLOS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0210016
94. Jeffery, C. J. (1 2018). *Protein moonlighting: What is it, and why is it important?* (Vol. 373, pp. 669–670). doi:10.1098/rstb.2016.0523
95. Jeong, D. W., Kim, K., Lee, G., Kang, M., Chang, H., Jang, A. R., & Lee, J. O. (6 2022). Electrochemical Transparency of Graphene. *ACS Nano*, 16, 9278–9286. doi:10.1021/acsnano.2c01786
96. Ji, G., Tian, J., Xing, F., & Feng, Y. (2022). Optical Biosensor Based on Graphene and Its Derivatives for Detecting Biomolecules. *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms231810838
97. Jing, X., Wu, Y., Wang, D., Qu, C., Liu, J., Gao, C., ... Ashry, N. M. (12 2022). Ionic Strength-Dependent Attachment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on Graphene Oxide Surfaces. *Environmental Science and Technology*, 56, 16707–16715. doi:10.1021/acs.est.1c08672

98. Johnson, S. (2019). The Rise and Fall and Rise Again of Toxin Testing for the Diagnosis of *Clostridioides difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases*. doi:10.1093/cid/ciz012
99. Kappel, K., Zhang, K., Su, Z., Watkins, A. M., Kladwang, W., Li, S., ... Das, R. (7 2020). Accelerated cryo-EM-guided determination of three-dimensional RNA-only structures. *Nature Methods*, 17, 699–707. doi:10.1038/s41592-020-0878-9
100. Kassam, Z., Fabersunne, C. C., Smith, M., Alm, E. J., Kaplan, G. G., Nguyen, G. C., & Ananthakrishnan, A. N. (2016). *Clostridium difficile* associated risk of death score (CARDS): A novel severity score to predict mortality among hospitalised patients with *C. difficile* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. doi:10.1111/apt.13546
101. Kelly, C. P., Poxton, I. R., Shen, J., Shen, J., Wilcox, M. H., Gerding, D. N., ... Dorr, M. B. (2019). Effect of Endogenous *Clostridioides difficile* Toxin Antibodies on Recurrence of *C. difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases*. doi:10.1093/cid/ciz809
102. Kelly, C. R., Fischer, M., Allegretti, J. R., LaPlante, K., LaPlante, K. L., Stewart, D. B., ... Stollman, N. (2021). ACG Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and Treatment of *Clostridioides difficile* Infections. *The American Journal of Gastroenterology*. doi:10.14309/ajg.0000000000001278
103. Kenters, N., Huijskens, E. G. W., de Wit, S. C. J., Sanders, I. G. J. M., van Rosmalen, J., van Rosmalen, J., ... Voss, A. (2017). Effectiveness of various cleaning and disinfectant products on *Clostridium difficile* spores of PCR ribotypes 010, 014 and 027. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. doi:10.1186/s13756-017-0210-3
104. Kevorkian, Y., Shirley, D. J., & Shen, A. (3 2016). Regulation of *Clostridium difficile* spore germination by the CspA pseudoprotease domain. *Biochimie*, 122, 243–254. doi:10.1016/j.biochi.2015.07.023
105. Kiersnowska, Z. M., Lemiech-Mirowska, E., Michałkiewicz, M., Sierocka, A., & Marczak, M. (12 2022). Detection and Analysis of *Clostridioides difficile* Spores in

a Hospital Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19. doi:10.3390/ijerph192315670

106. Kim, B., Seo, M. R., Seo, M.-R., Kim, J., Kim, J., & Pai, H. (2019). Ribotype variability of *Clostridioides difficile* strains in patients with hospital-acquired *C. difficile* infections, community-acquired *C. difficile* infections, and colonization with toxigenic and non-toxicogenic strains of *C. difficile*. *Anaerobe*. doi:10.1016/j.anaerobe.2019.102086

107. Kim, D. J., Park, H. C., Sohn, I. Y., Jung, J. H., Yoon, O. J., Park, J. S., ... Lee, N. E. (2013). Electrical graphene aptasensor for ultra-sensitive detection of anthrax toxin with amplified signal transduction. *Small*, 9, 3352–3360. doi:10.1002/smll.201203245

108. Kim, G., Lee, J., Liu, T., Liu, T., Liu, T., Liu, T., ... Grey, C. P. (2021). Characterizing Nitrogen Sites in Nitrogen-Doped Reduced Graphene Oxide: A Combined Solid-State ¹⁵N NMR, XPS, and DFT Approach. *Journal of Physical Chemistry C*. doi:10.1021/acs.jpcc.1c02669

109. Kim, H. S., & Kim, H. (2011). Sporocidal Activity of Selected Disinfectants against *Clostridium difficile*. *Null*. doi:null

110. Kim, H., Jeong, S., Kim, M., Chong, Y., Lee, Y., & Lee, K. (2012). Detection of *Clostridium difficile* toxin A/B genes by multiplex real-time PCR for the diagnosis of *C. difficile* infection. *Journal of Medical Microbiology*. doi:10.1099/jmm.0.035618-0

111. Kim, S. S., Britcher, L., Kumar, S., Kumar, S., Kumar, S., & Griesser, H. J. (2018). XPS study of sulfur and phosphorus compounds with different oxidation states. *Sains Malaysiana*. doi:10.17576/jsm-2018-4708-33

112. Knecht, H., Neulinger, S. C., Heinsen, F.-A., Knecht, C., Schilhabel, A., Schmitz, R. A., ... Ott, S. J. (2014). Effects of β -lactam antibiotics and fluoroquinolones on human gut microbiota in relation to *Clostridium difficile* associated diarrhea. *PLOS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0089417

113. Kochan, T. J., Foley, M. H., Shoshiev, M. S., Somers, M. J., Carlson, P. E., & Hanna, P. C. (8 2018). Updates to *Clostridium difficile* spore germination. *Journal of Bacteriology*, 200. doi:10.1128/JB.00218-18
114. Kochanowsky, R. M., Carothers, K. E., Roxas, B., Anwar, F., Viswanathan, V., & Vedantam, G. (2022). A superoxide reductase contributes to *Clostridioides difficile* resistance to oxygen. *BioRxiv*. doi:10.1101/2022.12.19.521142
115. Kong, H. Y., & Byun, J. (2 2015). Screening and Characterization of a Novel RNA Aptamer That Specifically Binds to Human Prostatic Acid Phosphatase and Human Prostate Cancer Cells. *Molecules and Cells*, 38, 171–179. doi:10.14348/MOLCELLS.2015.2272
116. Kosynkin, D. V., Higginbotham, A. L., Sinitskii, A., Lomeda, J. R., Dimiev, A. M., Price, B. K., & Tour, J. M. (2009). Longitudinal unzipping of carbon nanotubes to form graphene nanoribbons. *Nature*. doi:10.1038/nature07872
117. Kurkcuoglu, Z., & Bonvin, A. M. J. J. (2 2020). Pre- and post-docking sampling of conformational changes using ClustENM and HADDOCK for protein-protein and protein-DNA systems. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 88, 292–306. doi:10.1002/prot.25802
118. Kwan, Y. C. G., Ng, G. M., & Huan, C. H. A. (2015). Identification of functional groups and determination of carboxyl formation temperature in graphene oxide using the XPS O 1s spectrum. *Thin Solid Films*. doi:10.1016/j.tsf.2015.07.051
119. Landelle, C., Verachten, M., Legrand, P., Girou, E., Barbut, F., Barbut, F., & Buisson, C. B. (2014). Contamination of healthcare workers' hands with *Clostridium difficile* spores after caring for patients with *C. difficile* infection. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. doi:10.1086/674396
120. Lang, H., Peng, Y., Peng, Y., Cao, X., & Zou, K. (2020). Atomic-Scale Friction Characteristics of Graphene under Conductive AFM with Applied Voltages. *ACS Applied Materials & Interfaces*. doi:10.1021/acsaami.0c06868

121. Lanzoni-Mangutchi, P., Banerji, O., Wilson, J., Barwinska-Sendra, A., Kirk, J. A., Vaz, F., ... Salgado, P. S. (12 2022). Structure and assembly of the S-layer in *C. difficile*. *Nature Communications*, Vol. 13. doi:10.1038/s41467-022-28196-w
122. Large, M., Large, M. J., Large, M. J., Ogilvie, S. P., Graf, A. A., Lynch, P., ... Dalton, A. B. (2020). Large-Scale Surfactant Exfoliation of Graphene and Conductivity-Optimized Graphite Enabling Wireless Connectivity. *Advanced Materials and Technologies*. doi:10.1002/admt.202000284
123. Latham, M. P., Zimmermann, G. R., & Pardi, A. (4 2009). NMR chemical exchange as a probe for ligand-binding kinetics in a theophylline-binding RNA aptamer. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 5052–5053. doi:10.1021/ja900695m
124. Lawler, A. J., Lambert, P. A., & Worthington, T. (9 2020). A Revised Understanding of *Clostridioides difficile* Spore Germination. *Trends in Microbiology*, 28, 744–752. doi:10.1016/j.tim.2020.03.004
125. Lawley, T. D., Croucher, N. J., Yu, L., Clare, S., Sebaihia, M., Goulding, D., ... Dougan, G. (9 2009). Proteomic and genomic characterization of highly infectious *Clostridium difficile* 630 spores. *Journal of Bacteriology*, 191, 5377–5386. doi:10.1128/JB.00597-09
126. Lee, H. S., Plechot, K., Gohil, S., & Le, J. (6 2021). *Clostridium difficile*: Diagnosis and the Consequence of Over Diagnosis. *Infectious Diseases and Therapy*, 10, 687–697. doi:10.1007/s40121-021-00417-7
127. Li, J., Li, J., Li, J., Li, M., Li, M., Li, M., ... Wan, L.-J. (2016). Click and Patterned Functionalization of Graphene by Diels–Alder Reaction. *Journal of the American Chemical Society*. doi:10.1021/jacs.6b02209
128. Li, L., Xu, S., Yan, H., Yan, H., Yan, H., Li, X., ... Tan, W. (2020). Nucleic Acid Aptamers for Molecular Diagnostics and Therapeutics: Advances and Perspectives. *Angewandte Chemie*. doi:10.1002/anie.202003563

129. Li, P., Wang, L., Sun, M., Yao, J., Li, W., Lu, W., ... Feng, W. (2022). Binding Affinity and Conformation of Conjugated AS1411 Aptamer at Cationic Lipid Bilayer Interface. *Physical Chemistry Chemical Physics*. doi:10.1039/d1cp05753g
130. Lindmark, M. (2018). Optimization of quality assured dataflow from biosensors : time series analysis of plankton respiration by oxygen optodes. *Null*. doi:null
131. Liu, J., Li, Q., Zou, Y., Qian, Q., Qian, Q., Jin, Y.-H., ... Fan, S. (2013). The Dependence of Graphene Raman D-band on Carrier Density. *Nano Letters*. doi:10.1021/nl4035048
132. Liu, X., Song, J., Yang, R., Su, S., Zhang, L., Huang, Y., & Fan, Q. (2022). Recent Advances of Biosensors Based on Split Aptamers in Biological Analysis: A Review. *IEEE Sensors Journal*. doi:10.1109/jsen.2022.3176601
133. Longtin, Y., Paquet-Bolduc, B., Gilca, R., Garenc, C., Fortin, É., Longtin, J., ... Loo, V. G. (2016). Effect of Detecting and Isolating *Clostridium difficile* Carriers at Hospital Admission on the Incidence of *C difficile* Infections: A Quasi-Experimental Controlled Study. *JAMA Internal Medicine*. doi:10.1001/jamainternmed.2016.0177
134. Lopez. (1999). *2-D Proteome Analysis Protocols*.
135. Lu, S.-Y., Jin, M., Zhang, Y., Niu, Y., Gao, J.-C., & Li, C. M. (2018). Chemically Exfoliating Biomass into a Graphene-like Porous Active Carbon with Rational Pore Structure, Good Conductivity, and Large Surface Area for High-Performance Supercapacitors. *Advanced Energy Materials*. doi:10.1002/aenm.201702545
136. Lu, Z., Wu, L., Dai, X., Wang, Y., Sun, M., Zhou, C., ... Rao, H. (2021). Novel flexible bifunctional amperometric biosensor based on laser engraved porous graphene array electrodes: Highly sensitive electrochemical determination of hydrogen peroxide and glucose. *Journal of Hazardous Materials*. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123774
137. Lyu, C., Khan, I. M., & Wang, Z. (7 2021). Capture-SELEX for aptamer selection: A short review. *Talanta*, 229. doi:10.1016/j.talanta.2021.122274

138. Macaya, R. F., Schultze, P., Smith, F. W., Roe, J. A., Roe, J. A., Roe, J. A., ... Feigon, J. (1993). Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.90.8.3745
139. Macdonald, H., Bonnet, H., Heyden, A. V. D., Defrancq, E., Spinelli, N., Coche-Guérente, L., & Dejeu, J. (6 2019). Influence of Aptamer Surface Coverage on Small Target Recognition: A SPR and QCM-D Comparative Study. *Journal of Physical Chemistry C*, *123*, 13561–13568. doi:10.1021/acs.jpcc.9b00845
140. Marcovitz, A., & Levy, Y. (2011). Frustration in protein-DNA binding influences conformational switching and target search kinetics. *BIOPHYSICS AND COMPUTATIONAL BIOLOGY*, *108*, 17957–17962. doi:10.1073/pnas.1109594108/-/DCSupplemental
141. Marin-Gonzalez, A., Vilhena, J. G., Perez, R., & Moreno-Herrero, F. (7 2021). A molecular view of DNA flexibility. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *54*, e8. doi:10.1017/S0033583521000068
142. Marko, J. F. (1 2015). Biophysics of protein-DNA interactions and chromosome organization. *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications*, *418*, 126–153. doi:10.1016/j.physa.2014.07.045
143. Matsumoto H, Haniu H, Komori N. Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE. *Methods Mol Biol*. 2019;1855:101-105. doi: 10.1007/978-1-4939-8793-1_10. PMID: 30426411.
144. Malyshev, D., Jones, I. A., McCracken, M., Öberg, R., Harper, G. M., Joshi, L. T., & Andersson, M. (12 2023). Hypervirulent R20291 *Clostridioides difficile* spores show disinfection resilience to sodium hypochlorite despite structural changes. *BMC Microbiology*, *23*. doi:10.1186/s12866-023-02787-z
145. Meyer, J. C. (2014). Transmission electron microscopy (TEM) of graphene. *Null*. doi:10.1533/9780857099334.2.101

146. Moayeri, M., Leppla, S. H., Vrentas, C., Pomerantsev, A. P., & Liu, S. (10 2015). Anthrax Pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, *69*, 185–208. doi:10.1146/annurev-micro-091014-104523
147. Mondal, J., An, J. M., Surwase, S. S., Chakraborty, K., Sutradhar, S. C., Hwang, J., ... Lee, Y.-K. (2022). Carbon Nanotube and Its Derived Nanomaterials Based High Performance Biosensing Platform. *Biosensors*. doi:10.3390/bios12090731
148. Moon, J., Kim, G., Park, S. B., Lim, J., & Mo, C. (4 2015). Comparison of whole-cell SELEX methods for the identification of Staphylococcus Aureus-specific DNA aptamers. *Sensors (Switzerland)*, *15*, 8884–8897. doi:10.3390/s150408884
149. Moulick, S., Alam, R., & Pal, A. N. (11 2022). Sensing Remote Bulk Defects through Resistance Noise in a Large-Area Graphene Field-Effect Transistor. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *14*, 51105–51112. doi:10.1021/acscami.2c14499
150. Nakatsuka, N., Yang, K.-A., Abendroth, J. M., Cheung, K. M., Xu, X., Yang, H., ... Andrews, A. M. (2018). Aptamer–field-effect transistors overcome Debye length limitations for small-molecule sensing. *Science*. doi:10.1126/science.aao6750
151. Naresh, V., & Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors*. doi:10.3390/s21041109
152. Nerandzic, M. M., & Donskey, C. J. (2013). Activate to eradicate: inhibition of *Clostridium difficile* spore outgrowth by the synergistic effects of osmotic activation and nisin. *PLOS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0054740
153. Nho, S. W., Kim, M., Kim, S. J., Foley, S. L., Nayak, R., Kweon, O., & Cerniglia, C. E. (8 2021). Pragmatic strategy for fecal specimen storage and the corresponding testmethods for *Clostridioides difficile* diagnosis. *Pathogens*, *10*. doi:10.3390/pathogens10081049
154. Ni, O. H., Yu, T., Yu, T., Lu, Y., Wang, Y., Feng, Y. P., & Shen, Z. (2008). Uniaxial Strain on Graphene: Raman Spectroscopy Study and Band-Gap. *ACS Nano*. doi:10.1021/nn800459e

155. Nieuwland, C., Hamlin, T. A., Guerra, C. F., Barone, G., & Bickelhaupt, F. M. (2022). B-DNA Structure and Stability: The Role of Nucleotide Composition and Order. *ChemistryOpen*, *11*. doi:10.1002/open.202100231
156. Nissle, K., Kopf, D., & Rösler, A. (2016). Asymptomatic and yet *C. difficile*-toxin positive? Prevalence and risk factors of carriers of toxigenic *Clostridium difficile* among geriatric in-patients. *BMC Geriatrics*. doi:10.1186/s12877-016-0358-3
157. Norimatsu, W., & Kusunoki, M. (2014). Growth of graphene from SiC0001 surfaces and its mechanisms. *Semiconductor Science and Technology*. doi:10.1088/0268-1242/29/6/064009
158. Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., ... Firsov, A. A. (2000). *Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films* (Vol. 404, p. 3824). Retrieved from Kluwer website: <http://science.sciencemag.org/>
159. Ogunbunmi, E. T., Roznowski, A. P., & Fane, B. A. (2021). *The Effects of Packaged, but Misguided, Single-Stranded DNA Genomes Are Transmitted to the Outer Surface of the ϕ X174 Capsid*.
160. Oliveira, M. E., Lopes, B. V., Rossato, J. H. H., Maron, G. K., Gallo, B. B., Rosa, A. B. L., ... Carreño, N. L. V. (2022). Electrochemical Biosensor Based on Laser-Induced Graphene for COVID-19 Diagnosing: Rapid and Low-Cost Detection of SARS-CoV-2 Biomarker Antibodies. *Surfaces*. doi:10.3390/surfaces5010012
161. Onyenwoke, R. U., Brill, J. A., Farahi, K., & Wiegel, J. (2004). Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch (Firmicutes). *Archives of Microbiology*, *182*, 182–192. doi:10.1007/s00203-004-0696-y
162. Orrell, K. E., & Melnyk, R. A. (2021). *Translocation expands the scope of the large clostridial toxin family* (Vol. 46, pp. 953–959). doi:10.1016/j.tibs.2021.07.007
163. Orrell, K. E., Mansfield, M. J., Doxey, A. C., & Melnyk, R. A. (2020). The *C. difficile* toxin B membrane translocation machinery is an evolutionarily conserved protein delivery apparatus. *Nature Communications*, *11*. doi:10.1038/s41467-020-14306-z

164. Panigrahi, S., Bhattacharya, A., Bhattacharya, A., Bhattacharya, A., Bhattacharya, A., Banerjee, S., ... Bhattacharyya, D. (2012). Interaction of Nucleobases with Wrinkled Graphene Surface: Dispersion Corrected DFT and AFM Studies. *Journal of Physical Chemistry C*. doi:10.1021/jp207588s
165. Papageorgiou, D. G., Kinloch, I. A., & Young, R. J. (2017). Mechanical properties of graphene and graphene-based nanocomposites. *Progress in Materials Science*. doi:10.1016/j.pmatsci.2017.07.004
166. Paredes-Sabja, D., Shen, A., & Sorg, J. A. (2014). *Clostridium difficile* spore biology: Sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, 22, 406–416. doi:10.1016/j.tim.2014.04.003
167. Park, M.-H., Kim, T.-H., & Yang, C.-W. (2012). Thickness contrast of few-layered graphene in SEM. *Surface and Interface Analysis*. doi:10.1002/sia.4995
168. Park, Y., Kang, B., Ahn, C. H., Cho, H. K., Kwon, H., Park, S., ... Kim, K. (2019). Bionanoelectronic platform with a lipid bilayer/CVD-grown MoS₂ hybrid. *Biosensors and Bioelectronics*, 142. doi:10.1016/j.bios.2019.111512
169. Pawel, G. T., Ma, Y., Wu, Y., Lu, Y., & Peinetti, A. (2022). Binding Affinity Measurements Between DNA Aptamers and their Virus Targets Using ELONA and MST. *Bio-Protocol*. doi:10.21769/bioprotoc.4548
170. Pereira, O. R. E., Caldeira, J. M. L. P., & Rodrigues, J. J. P. C. (2011). Body sensor network mobile solutions for biofeedback monitoring. *Mobile Networks and Applications*. doi:10.1007/s11036-010-0278-y
171. Permpoonpattana, P., Tolls, E. H., Nadem, R., Tan, S., Brisson, A., & Cutting, S. M. (2011). Surface layers of *Clostridium difficile* endospores. *Journal of Bacteriology*, 193, 6461–6470. doi:10.1128/JB.05182-11
172. Pezzini, S., Miseikis, V., Pace, S., Rossella, F., Rossella, F., Watanabe, K., ... Coletti, C. (2020). High-quality electrical transport using scalable CVD graphene. *ArXiv: Mesoscale and Nanoscale Physics*. doi:10.1088/2053-1583/aba645

173. Plutnar, J., Pumera, M., & Sofer, Z. (2018). The chemistry of CVD graphene. *Journal of Materials Chemistry C*. doi:10.1039/c8tc00463c
174. Record, M. T., Mazur, S. J., Melanfon, P., Roe, J.-H., Shaner, S. L., & Unger, L. (1981). *DOUBLE HELICAL DNA: CONFORMATIONS, PHYSICAL PROPERTIES, AND INTERACTIONS WITH LIGANDS*. Retrieved from www.annualreviews.org
175. Salavagione, H. J., Salavagione, H. J., Quiles-Díaz, S., Shuttleworth, P. S., Ellis, G. J., Ellis, G., & Gómez-Fatou, M. A. (2020). Graphene Functionalization for Polymer Nanocomposites. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. doi:10.1002/0471440264.pst670
176. Samuels, A. J., & Carey, J. D. (2015). Engineering Graphene Conductivity for Flexible and High-Frequency Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*. doi:10.1021/acsami.5b05140
177. Sanderson, M. R., & Skelly, J. V. (9 2007). *Macromolecular Crystallography: Conventional and high-throughput methods* (Vol. 9780198520979, pp. 1–304). doi:10.1093/acprof:oso/9780198520979.001.0001
178. Santalucia, J. (1998). *A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics* (Vol. 95, pp. 1460–1465). Retrieved from www.pnas.org.
179. Santalucia, J., Allawi, H. T., & Seneviratne, P. A. (1996). *Improved Nearest-Neighbor Parameters for Predicting DNA Duplex Stability †*.
180. Schnieders, R., Keyhani, S., Schwalbe, H., & Fürtig, B. (2020). More than Proton Detection—New Avenues for NMR Spectroscopy of RNA. *Chemistry: A European Journal*. doi:10.1002/chem.201903355
181. Sebahia, M., Wren, B. W., Mullany, P., Fairweather, N. F., Minton, N., Stabler, R., ... Parkhill, J. (7 2006). The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature Genetics*, 38, 779–786. doi:10.1038/ng1830

182. Semiromi, D. T., & Azimian, A. R. (2012). Molecular dynamics simulation of annular flow boiling with the modified Lennard-Jones potential function. *Heat and Mass Transfer*. doi:10.1007/s00231-011-0855-z
183. Shafiee, A., Iravani, S., & Varma, R. S. (2022). Graphene and graphene oxide with anticancer applications: Challenges and future perspectives. *MedComm*. doi:10.1002/mco2.118
184. Shahriari, S., Sastry, M., Panjekar, S., Panjekar, S., Jones, R., Raman, R. K. S., & Raman, R. K. S. (2021). Graphene and Graphene Oxide as a Support for Biomolecules in the Development of Biosensors. *Nanotechnology, Science and Applications*. doi:10.2147/nsa.s334487
185. Shen, A. (9 2020). *Clostridioides difficile* Spore Formation and Germination: New Insights and Opportunities for Intervention. *Annual Review of Microbiology*, 74, 545–566. doi:10.1146/annurev-micro-011320
186. Shen, A., Shen, A., & Shen, A. (2020). *Clostridioides difficile* Spore Formation and Germination: New Insights and Opportunities for Intervention. *Annual Review of Microbiology*. doi:10.1146/annurev-micro-011320-011321
187. Shrestha, S. K., Sunkesula, V. C. K., Kundrapu, S., Tomas, M. E., Nerandzic, M. M., & Donskey, C. J. (2016). Acquisition of *Clostridium difficile* on Hands of Healthcare Personnel Caring for Patients with Resolved *C. difficile* Infection. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. doi:10.1017/ice.2015.335
188. Singh, N., & Bhalla, N. (2020). *Moonlighting Proteins*. doi:10.1146/annurev-genet-030620
189. Slomski, A., & Slomski, A. (2022). Postantibiotic Microbiome Therapeutic Reduces *C. difficile* Recurrence. *JAMA*. doi:10.1001/jama.2022.3753
190. Smith, C. S. (2016). *Unlocking the Bible Story* (p. 330). Moody Publishers.
191. Stobinski, L., Lesiak, B., Malolepszy, A., Mazurkiewicz, M., Mierzwa, B., Zemek, J., ... Bieloshapka, I. (2014). Graphene oxide and reduced graphene oxide

studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*. doi:10.1016/j.elspec.2014.07.003

192. Stulik, J., Musil, O., Josefík, F., & Kadlec, P. (2022). Graphene-Based Temperature Sensors—Comparison of the Temperature and Humidity Dependences. *Nanomaterials*. doi:10.3390/nano12091594

193. Sugimoto, N., Nakano, S.-I., Yoneyama, M., & Honda, K.-I. (1996). *Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes* (Vol. 24, pp. 4501–4505).

194. Sumdani, M. G., Islam, M. R., Yahaya, A. N. A., & Safie, S. I. (2021). Recent advances of the graphite exfoliation processes and structural modification of graphene: a review. *Journal of Nanoparticle Research*. doi:10.1007/s11051-021-05371-6

195. Sullivan, R., Adams, M. C., Naik, R. R., & Milam, V. T. (4 2019). Analyzing secondary structure patterns in DNA aptamers identified via compels. *Molecules*, 24. doi:10.3390/molecules24081572

196. Susi, T., Pichler, T., & Ayala, P. (2015). X-ray photoelectron spectroscopy of graphitic carbon nanomaterials doped with heteroatoms. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. doi:10.3762/bjnano.6.17

197. Swiecki, M. K., Lisanby, M. W., Shu, F., Turnbough, C. L., & Kearney, J. F. (5 2006). Monoclonal Antibodies for Bacillus anthracis Spore Detection and Functional Analyses of Spore Germination and Outgrowth. *The Journal of Immunology*, 176, 6076–6084. doi:10.4049/jimmunol.176.10.6076

198. Talat, M., Tripathi, P., & Srivastava, O. N. (2017). Facile Synthesis of Large Surface Area Graphene and Its Applications. *Null*. doi:10.1007/978-981-10-3842-6_7

199. Taranova, M., Hirsh, A. D., Perkins, N. C., & Andricioaei, I. (9 2014). Role of microscopic flexibility in tightly curved DNA. *Journal of Physical Chemistry B*, 118, 11028–11036. doi:10.1021/jp502233u

200. Terasawa, T.-O., Norimatsu, W., & Kusunoki, M. (2017). Growth of Graphene from Decomposition of SiC Controlled by Ar Flow Rate. *The Japan Society of Applied Physics*. doi:null
201. Trachman, R. J., Stagno, J. R., Conrad, C. E., Jones, C. P., Fischer, P., Fischer, P., ... Ferré-D'Amaré, A. R. (2019). Co-crystal structure of the iMango-III fluorescent RNA aptamer using an X-ray free-electron laser. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications*. doi:10.1107/s2053230x19010136
202. Tran, J. C., & Doucette, A. A. (4 2008). Rapid and effective focusing in a carrier ampholyte solution isoelectric focusing system: A proteome prefractionation tool. *Journal of Proteome Research*, 7, 1761–1766. doi:10.1021/pr700677u
203. Turner, N. A., Warren, B., Gergen-Teague, M. F., Addison, R. M., Addison, B., Rutala, W. A., ... Anderson, D. J. (2021). Impact of Oral Metronidazole, Vancomycin, and Fidaxomicin on Host Shedding and Environmental Contamination with *Clostridioides difficile*. *Clinical Infectious Diseases*. doi:10.1093/cid/ciab473
204. Vashist, S. K. (8 2012). Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. *Diagnostics*, 2, 23–33. doi:10.3390/diagnostics2030023
205. Verma, M. L., Sukriti, N., Dhanya, B. S., Saini, R., Das, A., & Varma, R. S. (2022). Synthesis and application of graphene-based sensors in biology: a review. *Environmental Chemistry Letters*. doi:10.1007/s10311-022-01404-1
206. Vologodskii, A. V., Amirikyan, B. R., Lyubchenko, Y. L., & Kamenetskii, M. D. F.-. (1984). Allowance for heterogeneous stacking in the DNA helix-coil transition theory. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2, 131–148. doi:10.1080/07391102.1984.10507552
207. Wahl, M. C., & Sundaralingam, M. (1997). *Crystal Structures of A-DNA*. 44, 45–63. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(1997)44:1<45::AID-BIP4>3.0.CO;2

208. Wang, L., Lai, R., Zhang, L., Zeng, M., & Fu, L. (4 2022). In Situ Investigating the Mechanism of Graphene Growth by Chemical Vapor Deposition. *ACS Materials Letters*, *4*, 528–540. doi:10.1021/acsmaterialslett.1c00783

209. Wang, X., Tan, D., Tan, D., Chu, Z., Chen, L., Chen, X., ... Chen, G. (2016). Mechanical properties of polymer composites reinforced by functionalized graphene prepared via direct exfoliation of graphite flakes in styrene. *RSC Advances*. doi:10.1039/c6ra24479c

210. Wang, Y., Wang, Y., Chen, Z., Wu, Z., Li, Y., Yang, W., & Li, Y. (2018). High-Efficiency Production of Graphene by Supercritical CO₂ Exfoliation with Rapid Expansion. *Langmuir*. doi:10.1021/acs.langmuir.8b01030

211. Warriner, K., Xu, C., Habash, M., Sultan, S., & Weese, S. J. (2017). Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: Significant sources of *C. difficile* community-acquired infection? *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.13338

212. Weisshoff, H., Wenzel, K., Schulze-Rothe, S., Nikolenko, H., Davideit, H., Becker, N. P., ... Haberland, A. (8 2018). Characterization of Aptamer BC 007 Substance and Product Using Circular Dichroism and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *107*, 2033–2041. doi:10.1016/j.xphs.2018.04.003

213. Wieczorkiewicz, J. T., Lopansri, B. K., Cheknis, A., Osmolski, J. R., Hecht, D. W., Gerding, D. N., & Johnson, S. (2016). Fluoroquinolone and Macrolide Exposure Predict *Clostridium difficile* Infection with the Highly Fluoroquinolone- and Macrolide-Resistant Epidemic *C. difficile* Strain BI/NAP1/027. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. doi:10.1128/aac.01820-15

214. Włodarczyk, J., Woehler, A., Kobe, F., Ponimaskin, E., Zeug, A., & Neher, E. (1 2008). Analysis of FRET signals in the presence of free donors and acceptors. *Biophysical Journal*, *94*, 986–1000. doi:10.1529/biophysj.107.111773

215. Wilian, A. C., Julia, P.-C., Anna, C. C. A., André, S. P., Camilla, D. B., Paulo, R. R. C., ... U., K. A. (2014). Lennard-Jones energies short-range (LJ-SR) and Coulombic

potential within R-coulomb Coul-SR) between LQB223, protein, DNA and water during MD simulations. *PLOS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0091191.t003

216. Wiesner, R., Scheller, C., Krebs, F., Wätzig, H., & Oltmann-Norden, I. (2020). A comparative study of CE-SDS, SDS-PAGE, and Simple Western: Influences of sample preparation on molecular weight determination of proteins. *ELECTROPHORESIS*, 42(3), 206–218. doi:10.1002/elps.202000199

217. Wu, S., Jiang, M., Mao, H., Zhao, N., He, D., Chen, Q., ... Song, X.-M. (2022). A sensitive cholesterol electrochemical biosensor based on biomimetic cerasome and graphene quantum dots. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. doi:10.1007/s00216-022-03986-9

218. Wu, Y., Lu, J., & Kang, T. (7 2016). *Human single-stranded DNA binding proteins: Guardians of genome stability* (Vol. 48, pp. 671–677). doi:10.1093/abbs/gmw044

219. Xi, H., Jiang, H., Juhas, M., & Zhang, Y. (2022). Fluorescent Detection of Human Angiotensinogen Protein by G-quadruplex Aptamer. *Analyst*. doi:10.1039/d2an01057g

220. Xia, Z., Bellani, V., Bellani, V., Sun, J., Sun, J., Palermo, V., & Palermo, V. (2020). Electrochemical exfoliation of graphite in H₂SO₄, Li₂SO₄ and NaClO₄ solutions monitored in situ by Raman microscopy and spectroscopy. *Faraday Discussions*. doi:10.1039/c9fd00123a

221. Xu, Z., Bando, Y., Bando, Y., Bando, Y., Liu, L., Liu, L., ... Golberg, D. (2011). Electrical Conductivity, Chemistry, and Bonding Alternations under Graphene Oxide to Graphene Transition As Revealed by In Situ TEM. *ACS Nano*. doi:10.1021/nn103200t

222. Yamakawa, K., Karasawa, T., Ikoma, S., & Nakamura, S. (1996). *Enhancement of Clostridium difficile toxin production in biotin-limited conditions* (Vol. 44, pp. 1–1).

223. Yan, S., Ilgu, M., Nilsen-Hamilton, M., & Lamm, M. H. (2022). Computational Modeling of RNA Aptamers: Structure Prediction of the Apo State. *Journal of Physical Chemistry B*. doi:10.1021/acs.jpccb.2c04649
224. Yang, J., Sun, H., Liang, H., Ji, H., Song, L., Gao, C., ... Xu, H. (2016). A Highly Efficient Metal-Free Oxygen Reduction Electrocatalyst Assembled from Carbon Nanotubes and Graphene. *Advanced Materials*. doi:10.1002/adma.201505855
225. Yang, W. W., & Ponce, A. (8 2009). Rapid endospore viability assay of *Clostridium sporogenes* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 213–216. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.024
226. Ye, Q., Zhang, Z., Liu, J., & Wang, X. (2022). Screen printed electrodes-based biosensors modified with functional nucleic acid probes and their applications in this pandemic age: A review. *Analytical Methods*. doi:10.1039/d2ay00666a
227. Yi, M., & Shen, Z. (2015). A review on mechanical exfoliation for the scalable production of graphene. *Journal of Materials Chemistry*. doi:10.1039/c5ta00252d
228. Zar, F. A. (2016). Review: NAATs diagnose *C. difficile*; vancomycin improves cure, and fidaxomicin reduces recurrence. *Annals of Internal Medicine*. doi:10.7326/acpjc-2016-165-2-004
229. Zeng, J., Wang, H., Dong, M., & Tian, G.-B. (2022). *Clostridioides difficile* spore: coat assembly and formation. *Emerging Microbes & Infections*. doi:10.1080/22221751.2022.2119168
230. Zha, M., Wang, N., Wang, N., Wang, N., Zhang, C., & Wang, Z. (2021). Inferring Single-Cell 3D Chromosomal Structures Based on the Lennard-Jones Potential. *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms22115914
231. Zhang, F., Cao, H., Yue, D., Yue, D., Yue, D., & Zhou, Z. (2013). Graphene Covalently Modified by DNA G-Base. *Journal of Physical Chemistry C*. doi:10.1021/jp307298p

232. Zhang, H., Wang, Y., Zhao, D., Zeng, D., Xia, J., Aldalbahi, A., ... Mi, X. (2015). Universal Fluorescence Biosensor Platform Based on Graphene Quantum Dots and Pyrene-Functionalized Molecular Beacons for Detection of MicroRNAs. *ACS Applied Materials & Interfaces*. doi:10.1021/acsami.5b04773
233. Zhang, Y., Xiong, Y., & Xiao, Y. (9 2022). 3dDNA: A Computational Method of Building DNA 3D Structures. *Molecules*, 27. doi:10.3390/molecules27185936
234. Zhou, X., Zhou, X., Guo, Y., Yiwei, W., Yang, R., Yang, R.-J., ... Li, J. (2019). A Novel Preparation Method of Multi-Layer Graphene with High-Crystallinity Based on Liquid Exfoliation Method by Using Expandable Graphite. *Physica Status Solidi B-Basic Solid State Physics*. doi:10.1002/pssb.201800657
235. Zhu, J., Zhang, K., Liu, K., & Shi, X. (2020). Adhesion characteristics of graphene oxide modified asphalt unveiled by surface free energy and AFM-scanned micro-morphology. *Construction and Building Materials*. doi:10.1016/j.conbuildmat.2020.118404
236. Zhu, S., Wu, Z., Niu, X., Zhan, X., Tao, H., & Wu, Y. (12 2022). Novel nanozyme-catalyzed and magnetically assisted colorimetric biosensor for Staphylococcus aureus detection with a low matrix effect from complex environments. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 373. doi:10.1016/j.snb.2022.132752
237. Zou, X., Wei, S., Jasensky, J., Xiao, M., Wang, Q., Brooks, C. L., & Chen, Z. (2017). Molecular Interactions between Graphene and Biological Molecules. *Journal of the American Chemical Society*. doi:10.1021/jacs.6b11226
238. Zubarev, R. A., & Makarov, A. (6 2013). Orbitrap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85, 5288–5296. doi:10.1021/ac4001223
239. Zuker, M. (7 2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31, 3406–3415. doi:10.1093/nar/gkg595

Anexos

Anexo 3.1:

A3.1.1. Código R para el cálculo de la prueba Barlett

```
##  
## Bartlett test of homogeneity of variances  
##  
## data: mod2$res by Tratamiento  
## Bartlett's K-squared = 0.93663, df = 2, p-value = 0.6261
```

A3.1.2. Código R para el cálculo de los valores de ANOVA

```
## Analysis of Variance Table  
##  
## Response: Conc  
##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)  
## Tratamiento  2 2102112 1051056 150.4075 6.187e-14 ***  
## i..Bloque    4  231964   57991   8.2986 0.0002692 ***  
## Residuals   23  160725    6988
```

A3.1.3. Código R para el cálculo de los valores de prueba Tuke

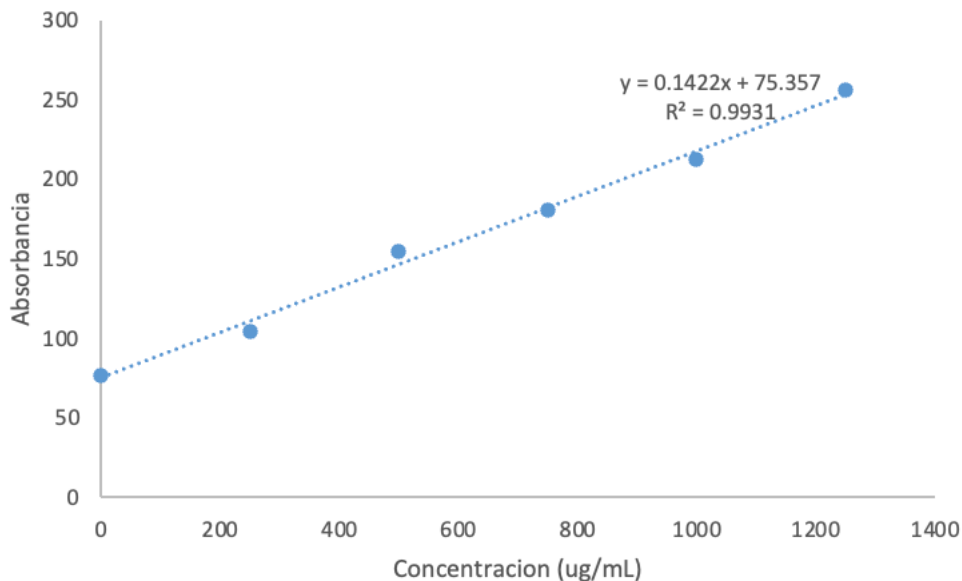
```
b.x=m[1]-m[2]  
b.y=m[1]-m[3]  
x.y=m[2]-m[3]  
d=c(b.x,b.y,x.y)  
cmres=anova(mod2)[3,3]  
ee=sqrt(2*cmres/10)  
q=d/ee  
p=ptukey(q*sqrt(2),3,23, lower.tail = F)  
names(p)=c("b.x", "b.y", "x.y")  
round(p,3)
```

```
##   b.x   b.y   x.y  
## 0.000 0.000 0.127
```

A3.1.4. Datos Excel para el cálculo de la curva de calibración de la cuantificación de proteínas por el método derivado de Lowry

SAMPLES	dup.1	dup.2	Average (ug/ml)	Dup.1 (ug/ml)	Dup.2 (ug/ml)	deviation	dil	final conc.
Tratamiento 1	249	234	1168.375527	1221.11814	1115.63291	74.5893229	1	1168.376
Tratamiento 2	182	186	764.0154712	749.950774	778.080169	19.8904861	1	764.0155
Tratamiento 3	164	148	567.1097046	623.368495	510.850914	79.5619444	1	567.1097
Tratamiento 1	254	263	1287.925457	1256.27989	1319.57103	44.7535937	1	1287.925
Tratamiento 2	184	178	742.9184248	764.015471	721.821378	29.8357292	1	742.9184
Tratamiento 3	185	173	728.8537271	771.04782	686.659634	59.6714583	1	728.8537
Tratamiento 1	212	225	1006.631505	960.921238	1052.34177	64.6440799	1	1006.632
Tratamiento 2	135	146	458.1082982	419.43038	496.786217	54.6988368	1	458.1083
Tratamiento 3	145	158	535.464135	489.753868	581.174402	64.6440799	1	535.4641
Tratamiento 1	248	260	1256.279887	1214.08579	1298.47398	59.6714583	1	1256.28
Tratamiento 2	159	168	619.8523207	588.206751	651.49789	44.7535937	1	619.8523
Tratamiento 3	143	132	437.0112518	475.68917	398.333333	54.6988368	1	437.0113
Tratamiento 1	232	218	1052.341772	1101.56821	1003.11533	69.6167014	1	1052.342
Tratamiento 2	168	150	588.2067511	651.49789	524.915612	89.5071875	1	588.2068
Tratamiento 3	157	143	524.9156118	574.142053	475.68917	69.6167014	1	524.9156
Tratamiento 1	78	73	1.005625879	18.5864979	-16.5752461	24.8631076	1	1.005626
Tratamiento 2	75	74	-6.026722925	-2.51054852	-9.54289733	4.97262153	1	-6.02672
Tratamiento 3	76	76	4.521800281	4.52180028	4.52180028	0	1	4.5218

A3.1.5. Curva de calibración de la cuantificación de proteínas por el método derivado de Lowry

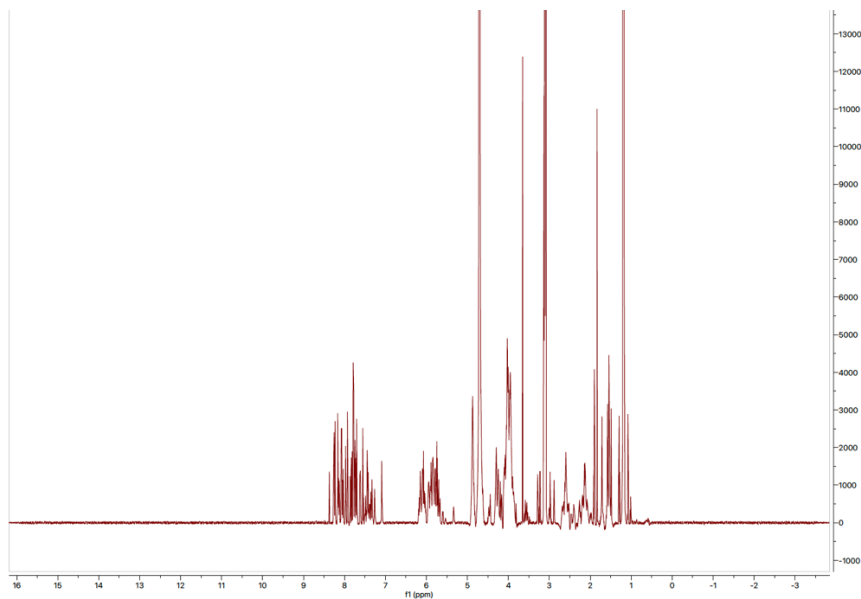


A3.1.6. Extracto de la base de datos de comparación entre los resultados obtenidos por el método de extracción seleccionado con respecto a la literatura de la proteómica de la espora de *C. difficile*.

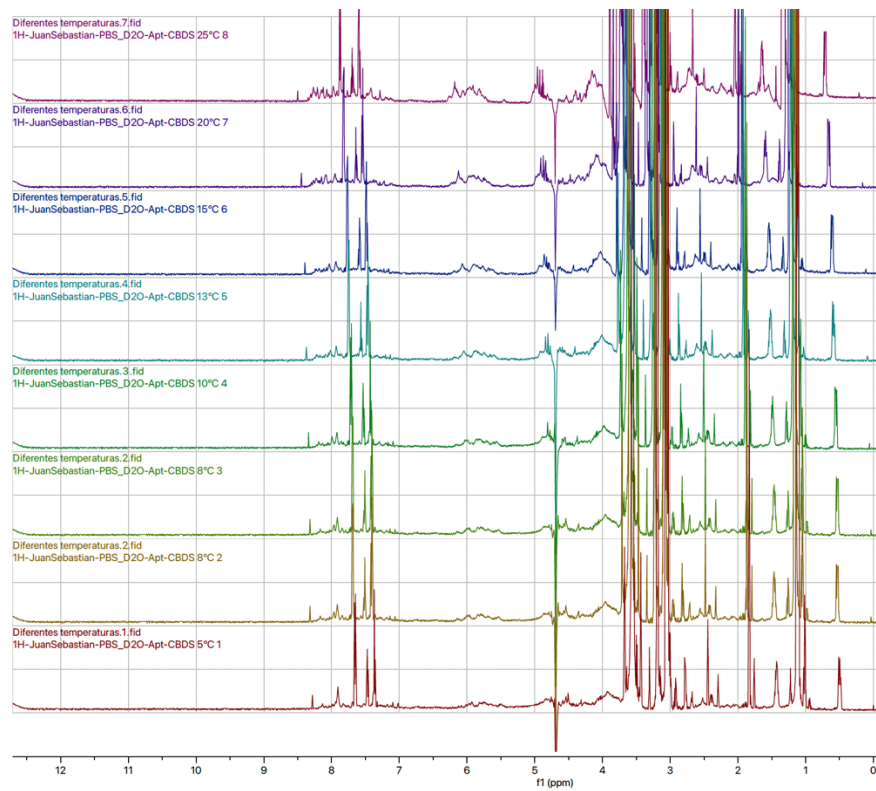
#Peptides	Avg. Mass	Description	Díaz-González et al. 2015	Abhyamkar et al. 2019	Lawley et al. 2009
18	29939	ABC-type transport system,cystine/ aminoacid-family extracellular solute-binding protein	✓	✓	
13	40860	Acetyl-CoA acetyltransferase	✓	✓	✓
14	49939	Acetyl-CoA decarboxylase/synthase complex subunit gamma			
11	32086	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta			
10	19705	Acetyltransferase		✓	
17	28423	Activator of 2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase			
26	40864	Acyl-CoA dehydrogenase		✓	
30	40908	Acyl-CoA dehydrogenase		✓	
30	40864	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	✓	✓	✓
13	47264	Adenylosuccinate synthetase		✓	
10	42371	Alanine-glyoxylate aminotransferase family protein			
21	98397	Alanine-tRNA ligase	✓	✓	
13	50681	Aldehyde dehydrogenase family protein			
34	96737	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	✓		✓
23	44798	Amino acid aminotransferase	✓	✓	
18	27757	Amino-acid ABC transporter ATP-binding protein	✓		
18	29939	Amino-acid ABC transporter substrate-binding protein	✓		✓
18	91941	Aminomethyl-transferring glycine dehydrogenase subunit GcvPA			
14	62017	Aminotransferase		✓	
10	42366	Aminotransferase, alanine-glyoxylate transaminase			
15	88521	Anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase			
15	88655	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase			
24	53819	Asparagine-tRNA ligase	✓	✓	✓
12	67495	Aspartate-tRNA ligase			✓
12	54664	ATP synthase subunit alpha	✓	✓	✓
13	49791	ATP synthase subunit beta	✓	✓	✓
10	25499	ATP/GTP-binding protein			
10	25499	ATP-binding protein			
15	60578	ATP-dependent RNA helicase			
18	26911	B3/4 domain-containing protein			
9	28671	Beta-subunit of electron transfer flavoprotein	✓		
30	76602	Bifunctional acetyl-CoA decarboxylase/synthase complex subunit alpha/beta			
13	28518	Bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, accessory protein		✓	
14	49939	Bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, delta subunit		✓	
30	76588	Bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, subunit alpha/beta		✓	
14	33720	Bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, subunit delta		✓	

Anexo 3.4:

A3.4.1. Espectro RMN-¹H del aptámero CDBS-1



A3.4.2. Espectro RMN-¹H del aptámero CDBS-1 ante diferentes temperaturas



A3.4.3. Valores de energía electrostática agrupadas por clústeres de las diferentes estructuras analizadas para el modelo de la interacción del aptámero con la proteína SlpA de la espora.

