



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA APLICADA**

**IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA PAPG Y ANTICUERPO
ANTI-PAPG EN MUESTRAS BIOLÓGICAS, IMPLEMENTANDO
UNA METODOLOGÍA BASADA EN BIOSENSORES ÓPTICOS**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA**

PRESENTA

IQ. ISABEL GUDELIA VAZQUEZ GUTIERREZ

DIRECTORES

DR. ABDÚ ORDUÑA DÍAZ (CIBA-IPN)

DR. JUAN XICOHTÉNCATL CORTES (HIMFG)

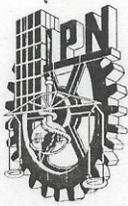
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. MARLON ROJAS LÓPEZ (CIBA-IPN)

M. EN C. ORLANDO ZACA MORAN (CIBA-IPN)

DRA. FLOR DE FÁTIMA ROSAS CÁRDENAS (CIBA-IPN)

TEPETITLA DE LARDIZABAL, DICIEMBRE 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 6 de Diciembre del 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA en su sesión ORDINARIA No. 12 celebrada el día 14 del mes de Diciembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Vázquez

Apellido paterno

Gutiérrez

Apellido materno

Isabel Gudelia

Nombre (s)

Con registro:

B	1	7	0	1	1	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

“Identificación de la proteína PapG y Anticuerpo Anti-PapG en muestras biológicas, implementando una metodología basada en biosensores ópticos”

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

- Funcionalización de películas delgadas
- Obtención de anticuerpos
- Detección de la proteína Pap-G

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dr. Abdu Orduña Díaz y Dr. Juan Xicohtencatl Cortés

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: Maestría en Biotecnología Aplicada

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dr. Abdu Orduña Díaz

Aspirante

Isabel G. Vázquez Gutiérrez

Dr. Juan Xicohtencatl Cortés

Presidente del Colegio

Dra. Ma. Myrna Solís Oba





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal siendo las 12:00 horas del día 30 del mes de Octubre del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de Maestría en Biotecnología Aplicada para examinar la tesis titulada:

Identificación de la Proteína PapG y Anticuerpo anti-PapG en Muestras Biológicas, Implementando una Metodología Basada en Biosensores Ópticos

Presentada por el alumno:

Vazquez Gutiérrez Isabel Gudelia
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

B	1	7	0	1	1	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Biotecnología Aplicada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Abdú Orduña Díaz
Director de Tesis
12205-EC-16 Colegiado

Dr. Juan Xicoténcatl Cortes
2° Director de Tesis
13088-EA-18 Visitante

Dra. Flor de Fátima Rosas Cárdenas
12884-EB-17 Colegiado

M. en C. Orlando Zaca Moran
12883-EB-17 Colegiado

Dr. Marlon Rojas López
11939-EG-16 Colegiado

Dr. Víctor Eric López y López
14525-EF-19 Colegiado

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. Diana Verónica Cortés Espinoza
13480-EF-18 Colegiado



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Unidad Tlaxcala
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal el día 30 del mes octubre del año 2019, la que suscribe Isabel Gudelia Vazquez Gutiérrez alumna del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro B170112, adscrito a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Abdú Orduña Díaz y Dr. Juan Xicohténcatl Cortes y cede los derechos del trabajo intitulado Identificación de la Proteína PapG y anticuerpo anti-PapG en Muestras Biológicas, Implementando una Metodología Basada en Biosensores Ópticos, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección isavqzg@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

I.Q. Isabel Gudelia Vazquez Gutiérrez

Agradecimientos



Agradecimiento especial a CONACYT por la beca otorgada con número de registro 637302 para la realización de este proyecto. Al Posgrado de Maestría en Biotecnología Aplicada de Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, por ser el pilar en mí desarrollo profesional.

Índice

Capítulo 1.....	1
Marco teórico.....	1
1.1 Infecciones del tracto urinario	1
1.2 Microorganismos patógenos	2
1.2.1 <i>Escherichia Coli</i> Uropatogénica (UPEC).....	2
1.2.2 Patogénesis de infecciones del tracto urinario.....	3
1.2.3 Adherencia y colonización.....	5
1.2.4 Factores de virulencia.....	6
1.2.5 Fimbria Tipo P.....	9
1.3 Métodos convencionales de detección de bacterias patógenas causantes de infecciones urinarias	10
1.3.1 Análisis de orina con tira reactiva.....	11
1.3.2 Análisis de orina microscópico.....	11
1.3.3 Cultivo de orina.....	11
1.4 Biosensor.....	12
1.4.1 Sistema de transducción empleados en biosensores	14
1.4.2 Elementos biológicos de reconocimiento utilizados en biosensores	15
1.5 Métodos de inmovilización del elemento biológico de reconocimiento	19
1.5.1 Inmovilización física del elemento biológico de reconocimiento	19
1.5.2 Inmovilización química del receptor biológico de reconocimiento.....	20
1.5.3 Inmovilización por bioafinidad del receptor biológico de reconocimiento	22
1.6 Ensamblado del biosensor.....	23
1.6.1 Monocapas autoensambladas (SAMs).....	23
1.6.2 Preparación de SAMs	24
1.7 Materiales utilizados como soporte para la inmovilización de receptor biológico de reconocimiento para el desarrollo de biosensores	26
1.7.1 Silicio.....	27
1.8 Técnicas de caracterización	28
1.8.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	28
1.8.2 Espectroscopia UV-Visible.....	29
Capítulo 2.....	30
Problema de estudio.....	30
2.1 Planteamiento del problema.....	30
2.2 Justificación	31
2.3 Objetivos de la investigación	32
2.3.1 Objetivo general.....	32
2.3.2 Objetivos específicos	32
2.4 Hipótesis	32
Capítulo 3.....	33
Materiales y métodos	33

3.1 Obtención de la proteína recombinante PapG	33
3.1.1 Clonación del gen en el vector de expresión pLATE31	33
3.1.2 Expresión y purificación de las proteínas	34
3.1.3 Caracterización de la proteína.....	35
3.2 Obtención de Anticuerpos policlonales	35
3.3 Modificación química de superficies	36
3.4 Inmovilización de las biomoléculas sobre el soporte de silicio	37
3.4.1 Inmovilización de la proteína recombinante PapG.....	37
3.4.2 Inmovilización de anticuerpos policlonales.....	37
3.5 Detección de biomoléculas	38
3.5.1 Detección de anticuerpos anti-PapG.....	38
3.5.2 Detección de proteína PapG.....	39
3.6 Detección de biomoléculas en muestra de orina.....	40
3.6.1 Detección de anticuerpos anti-PapG en muestra de orina	40
3.6.2 Detección de la proteína recombinante PapG en muestra de orina	40
Capítulo 4.....	41
Resultados y discusión	41
4.1 Obtención de la proteína recombinante PapG	41
4.1.1 Caracterización de la proteína.....	41
4.1.2 Cuantificación de la proteína PapG	41
4.1.3 Caracterización de la proteína PapG mediante espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier.....	42
4.2 Obtención de anticuerpos policlonales anti-PapG	44
4.2.1 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	44
4.2.2 Prueba de Western Blot para la detección de anticuerpos	45
4.2.3 Cuantificación de anticuerpos policlonales anti-PapG	46
4.2.4 Caracterización de anticuerpos policlonales por espectroscopia FTIR	47
4.3 Modificación química de superficies	49
4.4 Inmovilización de biomoléculas	50
4.4.1 Inmovilización de la proteína PapG.....	50
4.4.2 Inmovilización de anticuerpos anti-PapG.....	51
4.5 Detección de biomoléculas	52
4.5.1 Análisis de la detección de anticuerpos anti-PapG por FTIR	53
4.5.2 Análisis de la detección de la proteína PapG.....	56
4.6 Análisis de detección a diferentes concentraciones	58
4.6.1 Detección de anti-PapG	58
4.6.2 Detección de la proteína PapG.....	63
4.7 Análisis de detección en muestra real.....	65
4.7.1 Detección de anticuerpos anti-PapG en muestra de orina	66
4.7.1 Detección de la proteína PapG en muestra de orina	67
Conclusiones.....	68
Referencias.....	¡Error! Marcador no definido.

Lista de figuras

Figura 1 Patogénesis de infecciones del tracto urinaria: a) Infección urinaria no complicada e b) Infección urinaria complicada. Flores Mireles Ana L., Walke Jennifer N. r, Caparon Michael, y Hultgren Scott J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015 May; 13(5): 269–284.....	4
Figura 2 Adherencia y colonización de Escherichia coli uropatogénica. Riti Mann, Daniel G. Mediati, Iain G. Duggin, Elizabeth J. Harry and Amy L. Bottomley (2017). Metabolic Adaptations of Uropathogenic E. coli in the Urinary Tract. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7:241. doi: 10.3389/fcimb.2017.00241.	6
Figura 3 Mecanismo de patogenicidad de UPEC. Flores Mireles Ana L., Walke Jennifer N. r, Caparon Michael, y Hultgren Scott J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015 May; 13(5): 269–284.	8
Figura 4 Colonización por UPEC en los riñones. Flores Mireles Ana L., Walke Jennifer N. r, Caparon Michael, y Hultgren Scott J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015 May; 13(5): 269-284.	9
Figura 5 Fimbria Tipo P. Waksman Gabriel and Hultgren Scott J. Structural biology of the chaperone– usher pathway of pilus biogénesis. Nature Reviews Microbiology 7, 765-774, 2009.	10
Figura 6 Esquema funcional de un biosensor.	13
Figura 7 Estructura de un anticuerpo VL: fracción variable de la cadena ligera; VH: fracción variable de la cadena pesada; CH1, CH2: dominios de la cadena pesada en los que se concentran las funciones de reconocimiento antigénico; Fab: fracción de unión antigénica; Fc: fracción cristalizante conformada por CH2, CH3 de ambas cadenas pesadas y la bisagra. Machado Nina Patricia, Téllez German Alberto y Castaño Jhon Carlos (2006). Monoclonal antibodies: physical development and therapeutic perspectives. Asociación Colombiana de Infectología 10(3): 186-197.	17
Figura 8 Principales pasos involucrados en la producción de proteína recombinante. Alvaro R. Lara (2011). Producción de Proteínas Recombinantes en Escherichia coli. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 10, No. 2 (2011) 209-223.	19
Figura 9 Reacción química de EDC/NHS para la inmovilización de anticuerpos en plataformas modificadas con APTMS (3 aminopropiltrimetoxisilano). Modificado de (Vashist, 2012).....	21
Figura 10 Monocapa autoensamblada conformado por los grupos de anclaje, enlazante y funcional principal. Modificado de Ortiz Dosal Luis Carlos y Kolosovas Machuca Eleazar Samuel (2017). Ingeniería De Superficies y Monocapas Autoensambladas. Doctorado Institucional en Ingeniería y Ciencia de Materiales, UASLP.	24
Figura 11 Silanización en medio acuoso. Modificado de Hermanson, G. T. (2013). Bioconjugate Techniques (Third edition) Elsevier.	26
Figura 12 Diagrama general de trabajo.....	33
Figura 13 Modificación química de la superficie a) limpieza, b) activación y c) funcionalización del soporte de silicio.....	36

Figura 14 Inmovilización de la proteína PapG mediante la unión covalente del grupo carboxilo de la proteína con el grupo amino de la superficie modificada químicamente, formando un enlace amida.	37
Figura 15 Inmovilización de anticuerpos policlonales anti-PapG mediante la unión covalente del grupo carboxilo del anticuerpo con el grupo amino de la superficie modificada químicamente formando un enlace amida.	38
Figura 16 Detección de anticuerpos anti-PapG mediante la interacción del antígeno (epítopo) - anticuerpo (parátopo).	39
Figura 17 Detección de la proteína recombinante PapG mediante la interacción del antígeno (epítopo) - anticuerpo (parátopo).	39
Figura 18 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la proteína recombinante PapG. ...	41
Figura 19 Curva de calibración para la cuantificación de la proteína recombinante PapG	42
Figura 20 Espectro en FTIR de 400 a 4000 cm^{-1} de la proteína recombinante PapG.....	43
Figura 21 Segunda derivada del espectro FTIR de la proteína recombinante PapG en la región de la Amida I de proteínas.	44
Figura 22 Absorbancias obtenidas del Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto.	45
Figura 23 Patrón de reactividad de la prueba de Western Blot para la detección de anticuerpos en el suero sanguíneo del conejo.	46
Figura 24 Curva de calibración para la determinación de concentración de anticuerpos anti-PapG	46
Figura 25 Espectro FTIR de 400 a 4000 cm^{-1} del anti-PapG.....	47
Figura 26 Segunda derivada del espectro FTIR de los anticuerpos Anti-PapG en la región de la Amida I de proteínas.	48
Figura 27 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} de la modificación química de la superficie de silicio: silicio (azul), silicio funcionalizado (rojo) y APTMS puro (negro).	50
Figura 28 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} de la inmovilización de la proteína PapG, silicio funcionalizado (rojo), inmovilización de la proteína PapG en el soporte de silicio funcionalizado (rosa) y proteína PapG sin ningún tratamiento (negro).	51
Figura 29 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} de la inmovilización de los anticuerpos anti-PapG, silicio funcionalizado (rojo), inmovilización de los anticuerpos anti-PapG en el soporte de silicio modificado previamente (rosa) y anticuerpos anti-PapG sin ningún tratamiento (negro).	52
Figura 30 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} de los anticuerpos anti-PapG (rosa) y de la proteína recombinante PapG (azul).	53
Figura 31 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} de la detección de anticuerpos anti-PapG. Se observa la inmovilización de la proteína PapG (rosa), detección de anticuerpos anti-PapG (violeta) y los anticuerpos anti-PapG sin ningún tratamiento (negro).	54
Figura 32 Segunda derivada del espectro FTIR de la detección de anticuerpos Anti-PapG en la región de la Amida I de proteínas	55
Figura 33 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} de la detección de la proteína PapG. Se observa la inmovilización de anticuerpos anti-PapG (rosa), detección de la proteína PapG (violeta) y la proteína PapG sin ningún tratamiento (negro).	56

Figura 34 Segunda derivada de los espectros FTIR de la detección de la proteína PapG en la región de la Amida I de proteínas.	57
Figura 35 Espectros FTIR de la detección de anticuerpos anti-PapG a diferentes concentraciones.....	58
Figura 36 Análisis cuantitativo de la detección de anticuerpos en relación con la Amida II/Si-Si.....	60
Figura 37 Análisis cuantitativo de la detección de anticuerpos en relación con la Amida II/Si-H ₂	61
Figura 38 Análisis cuantitativo de la detección de anticuerpos en relación con la Amida II/Si-O-Si.....	62
Figura 39 Espectros FTIR de la detección de la proteína PapG a diferentes concentraciones	63
Figura 40 Análisis cuantitativo de la detección de la proteína PapG en relación con C=O/Si-Si.....	64
Figura 41 Espectro FTIR de la muestra de orina de paciente sano.....	65
Figura 42 Detección de anticuerpos anti-PapG en muestra de orina.	66
Figura 43 Detección de la proteína PapG en muestra de orina.....	67

Lista de tablas

Tabla 1 Clasificación de biosensores. Gonzales, V., Garcia, E., Ruiz, O., & Gago, L. (2005). Aplicaciones de Biosensores en la Industria Agroalimentaria. CEIM Dirección General de Universidades e Investigación, M-2213-2005.	14
Tabla 2 Oligonucleótidos usados en este estudio	34
Tabla 3 Intensidades relativas de la banda asociada a la detección (Amida II) y las bandas asociadas al biosensor (Si-Si, Si-O-Si y Si-H ₂)	59
Tabla 4 Intensidades relativas de la banda asociada a la detección (C=O 1730) y la banda asociada al biosensor (Si-Si).....	64

Abstract

Urinary tract infections (UTIs) are classified according to the site of infection: urine (asymptomatic bacteriuria), bladder (cystitis), kidney (pyelonephritis) and blood (bacteraemia). Pyelonephritis is mainly caused by the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) due to the fimbria pili (P) that expresses the PapG protein. The rapid, early and accessible detection of these pathogenic bacteria is an important medical care requirement. Recently, biosensors (based on the specific antigen-antibody interaction) have been developed for selective detection. This project proposes the implementation of a methodology based on the principle of an optical biosensor for the development of two biosensors for the identification of biomolecules such as PapG protein and anti-PapG antibody in biological samples. For the construction of the biosensors, the recombinant PapG protein was obtained as well as the anti-PapG polyclonal antibodies. These biosensors were constructed on silicon by means of self-assembly in monolayers (SAMs). This process (functionalization, immobilization and detection) was evaluated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The FTIR spectrum of the PapG protein detection showed bands corresponding to the functional groups C = O in 1730 cm^{-1} , a band in 1571 cm^{-1} of amide II and a band in 1660 cm^{-1} of amide I in addition, it showed a linear adjustment in a concentration range between 0.05 to $0.2\text{ }\mu\text{g} / \mu\text{l}$ obtaining an $R^2 = 0.97$. The FTIR spectrum of detection of Anti-PapG antibodies showed a band corresponding to amide II at 1450 cm^{-1} and a linear adjustment using concentrations in a range between 0.05 - $0.2\text{ }\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ($R^2 = 0.91$). The biosensor was able to detect anti-PapG antibodies in the urine sample, however there is still work to do regarding the detection of PapG protein in the urine sample, which is essential for its potential use for clinical diagnosis.

Resumen

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son clasificadas de acuerdo con el sitio de infección: orina (bacteriuria asintomática), vejiga (cistitis), riñón (pielonefritis) y sangre (bacteriemia). La pielonefritis es causada principalmente por la colonización de *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC) debido a la fimbria pili (P) que expresa la proteína PapG. La detección rápida, temprana y accesible de estas bacterias patógenas es un requisito importante de atención médica. Recientemente se han desarrollado biosensores (basados en la interacción específica antígeno-anticuerpo) para una detección selectiva. En este proyecto se propone la implementación de una metodología basada en el principio de un biosensor óptico para el desarrollo de dos biosensores para la identificación de biomoléculas como la proteína PapG y anticuerpo anti-PapG en muestras biológicas. Para la construcción de los biosensores se obtuvo la proteína recombinante PapG así como los anticuerpos policlonales anti-PapG. Estos biosensores se construyeron en silicio mediante autoensamble en monocapas este proceso consistió en las etapas de funcionalización, inmovilización y detección, las cuales se evaluaron mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). El espectro FTIR de la detección de la proteína PapG mostro bandas correspondientes a los grupos funcionales C=O en 1730 cm^{-1} , una banda en 1571 cm^{-1} de la amida II y una banda en 1660 cm^{-1} de la amida I además mostro un ajuste lineal en un rango de concentración de 0.05 a $0.2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ obteniendo una $R^2=0.97$. El espectro FTIR de la detección de anticuerpos Anti-PapG mostro una banda correspondiente a la amida II en 1450 cm^{-1} y un ajuste lineal utilizando concentraciones en un rango de 0.05 a $0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($R^2=0.91$). El biosensor fue capaz de detectar los anticuerpos anti-PapG en la muestra de orina, sin embargo se debe trabajar más con respecto a la detección de la proteína PapG en muestra de orina, lo cual es esencial para su uso potencial para el diagnóstico clínico.

Introducción

La detección rápida temprana y accesible de bacterias patógenas es un requisito importante de atención médica y una meta del milenio no cumplida. Esta demanda solo está creciendo rápidamente, ya que bacterias aparentemente inofensivas como *Escherichia coli* se están convirtiendo en patógenos resistentes a múltiples fármacos y se distribuyen ampliamente en humanos (Hema Gayathri C. , Mayuri, Krishnan, & Annamalai, 2016). Anualmente 150 millones de personas se ven seriamente afectadas por infecciones del tracto urinario (ITU), principalmente recién nacidos, las niñas en edad preescolar, las mujeres con actividad sexual y ambos sexos en la edad avanzada (Luna Pineda, y otros, 2018). Estas ITU son clasificadas de acuerdo con el sitio de infección: orina (bacteriuria asintomática), vejiga (cistitis), riñón (pielonefritis) y sangre (bacteriemia). La pielonefritis o infección urinaria alta involucra el parénquima renal, la pelvis renal y los cálices renales. Esta es causada principalmente por la colonización por UPEC debido a la expresión de pili (P). La adhesina P pilus, integrada por la proteína PapG, modula la respuesta inmune de los anticuerpos secretores locales, evitando la opsonización y el aclaramiento de la UPEC (Flores Mireles , Walke , Caparon , & Hultgren , 2015).

Para la identificación de estos patógenos existen métodos convencionales que implican cultivo selectivo y aislamiento de células seguido de métodos bioquímicos y serológicos para detección e identificación. Aunque estos métodos son confiablemente precisos, los procedimientos de varios pasos que consumen tiempo (2-3 días) y las necesidades de personal calificado son desventajas importantes.

Técnicas modernas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), citometría de flujo y espectrometría de masas proporcionan una solución tecnológica para la detección temprana y sensible. Sin embargo, aparte de la instrumentación prohibitivamente costosa, estos requieren técnicos experimentados y reactivos costosos y, por lo tanto, no se usan ampliamente en la práctica clínica (Hema Gayathri C. , Mayuri, Krishnan, & Annamalai, 2016). Los biosensores con instrumentación accesible parecen ser la mejor alternativa en este momento. Recientemente se han desarrollado inmunosensores (basados en la interacción específica antígeno-anticuerpo) para la detección selectiva de una bacteria (Hema Gayathri C. , Mayuri, Sankaran, & Senthil Kumar , 2016). Es por ello que el

siguiente trabajo propone una alternativa para la identificación de biomoléculas como la proteína PapG y anticuerpos anti-PapG en muestras biológicas, implementando una metodología basada en el principio de biosensor óptico que beneficiara a pacientes con ITU, logrando otorgarles un diagnóstico rápido y eficiente. Generando un tratamiento oportuno para erradicar la infección, prevenir daño renal y resolver los síntomas agudos.

Capítulo 1

Marco teórico

En este capítulo se explican los fundamentos teóricos y metodológicos así como las técnicas y los instrumentos que se emplearon para la recopilación y el análisis de la información para la investigación.

1.1 Infecciones del tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se definen como un crecimiento puro de bacterias (10^4 - 10^5 unidades formadoras de colonias / ml) en una muestra de orina recogida adecuadamente de un paciente con síntomas clínicos compatibles con una ITU (Prajapati, 2018). La ITU consiste en la colonización y multiplicación microbiana, habitualmente bacteriana, a lo largo del trayecto del tracto urinario. Las ITU son causadas por una amplia gama de patógenos, incluidas las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, así como los hongos (Flores Mireles , Walke , Caparon , & Hultgren , 2015).

Las poblaciones con alto riesgo de contraer ITU son los recién nacidos, las niñas en edad preescolar, las mujeres con actividad sexual y ambos sexos en la edad avanzada. Las ITU en la edad reproductiva representan la segunda causa de morbilidad en las mujeres, y en el embarazo son la causa más frecuente de complicaciones perinatales (Luna Pineda, y otros, 2018).

Estas ITU son clasificadas de acuerdo con el sitio de infección: orina (bacteriuria asintomática), vejiga (cistitis), riñón (pielonefritis) y sangre (bacteriemia). Las ITU también son caracterizadas con signos y síntomas generales, tales como hematuria, piuria, disuria, frecuencia urinaria, urgencia, fiebre y dolor en la espalda baja y suprapúbico (Luna Pineda, y otros, 2018). Las complicaciones de la infección del tracto urinario incluyen pielonefritis requieren hospitalización y pueden dar lugar a daño renal permanente.

Clínicamente, las ITU se clasifican como simples o complicadas. Las infecciones urinarias (IU) no complicadas generalmente afectan a individuos que de otra manera están sanos y no tienen anormalidades estructurales o neurológicas del tracto urinario; estas infecciones se diferencian en una infección urinaria inferior (cistitis) y

una infección urinaria superior (pielonefritis). Las IU complicadas se definen como IU asociadas a factores que comprometen la defensa del tracto urinario o del huésped, incluida la obstrucción urinaria, retención urinaria causada por enfermedad neurológica, inmunosupresión, insuficiencia renal, trasplante renal, embarazo y la presencia de cuerpos extraños como cálculos, catéteres permanentes u otros dispositivos de drenaje (Flores Mireles , Walke , Caparon , & Hultgren , 2015).

Los mecanismos de defensa normales contra las ITU incluyen la micción completa, que elimina las bacterias de la vejiga; acidificación urinaria a partir de urea concentrada y otros ácidos orgánicos excretados; válvulas vesicoureterales, que evitan el reflujo de las bacterias al tracto urinario superior; fagocitosis leucocitaria; y producción de IgA (Chu & Lowder, 2018).

1.2 Microorganismos patógenos

Se ha implicado una variedad de patógenos en las infecciones urinarias, incluidas las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, tales como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Enterococcus faecalis*. Sin embargo, la enfermedad es causada predominantemente por *E. coli* uropatogénica que representa hasta el 80% de todos los casos (Mann, Mediati, Duggin, Harry , & Bottomley , 2017). Las ITU con organismos Gram positivos son menos comunes y, a menudo, se asocian con el cateterismo. Los organismos patológicos observados en la ITU se encuentran comúnmente en el tracto gastrointestinal y esto respalda la hipótesis de que la ITU resulta que estas bacterias asciendan a la vejiga y al tracto urinario. Una vez que las bacterias están dentro de la vejiga, parecen ser capaces de adherirse al epitelio de la vejiga (urotelio), lo que finalmente causa una respuesta inflamatoria e infección (Prajapati, 2018).

1.2.1 *Escherichia Coli* Uropatogénica (UPEC).

Los UPEC son un patotipo de *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) y se originan en la microbiota intestinal. Son bacilos gramnegativos, con un tamaño promedio de 1,1-1,5 μm de ancho y 2,0-6,0 μm de largo. De acuerdo a sus requerimientos de oxígeno son anaerobios facultativos y pueden ser móviles por la presencia de flagelos peritricos o no móviles. Dentro del intestino, la UPEC rara vez causa complicaciones y existe una

relación simbiótica beneficiosa con la microflora intestinal. Sin embargo, la UPEC ha adaptado la capacidad de diseminar y colonizar otros entornos de huéspedes, como el tracto urinario. Los factores de virulencia, como las toxinas, modifican y dañan al huésped para promover la infección. Además, los factores fisiológicos que no dañan directamente al huésped pero que son esenciales para el crecimiento de UPEC y la supervivencia en el tracto urinario ahora se aprecian por su papel en la patogénesis. La capacidad de la UPEC para utilizar entornos nutricionalmente diversos, como los intestinos, la orina, la vejiga, los riñones y el torrente sanguíneo, juega claramente un papel importante en su patogénesis. El metabolismo de UPEC está estrechamente regulado y responde muy bien a la disponibilidad de nutrientes, lo que permite la supervivencia con una amplia gama de nutrientes en entornos competitivos y fluctuantes (Mann, Mediati, Duggin, Harry , & Bottomley , 2017).

1.2.2 Patogénesis de infecciones del tracto urinario.

La adherencia es un evento clave que inicia cada paso en la patogénesis de las ITU. Una ITU generalmente comienza con la contaminación periuretral por un patógeno que reside en el intestino, seguido de la colonización de la uretra y la posterior migración del patógeno a la vejiga, un evento que requiere apéndices tales como flagelos y pili como se muestra en la Figura 1 (Flores Mireles , Walke , Caparon , & Hultgren , 2015).

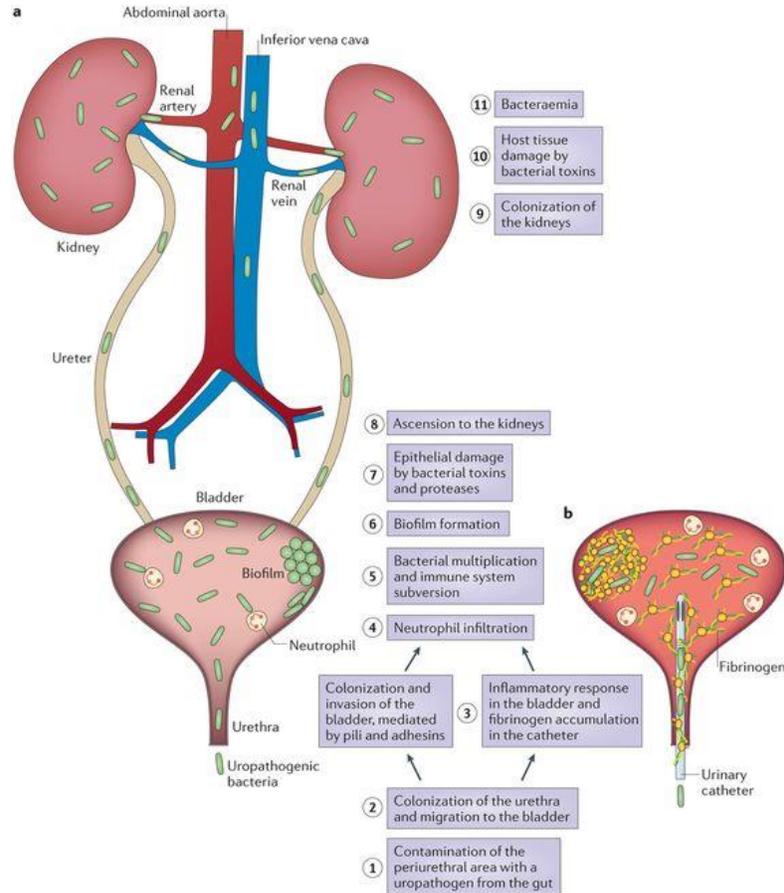


Figura 1 Patogénesis de infecciones del tracto urinaria: a) Infección urinaria no complicada e b) Infección urinaria complicada. Flores Mireles Ana L., Walke Jennifer N. r, Caparon Michael, y Hultgren Scott J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015 May; 13(5): 269–284.

Las infecciones del tracto urinario (IU) no complicadas comienzan cuando los patógenos urinarios que residen en el intestino contaminan el área periuretral (paso 1) y pueden colonizar la uretra. La posterior migración a la vejiga (paso 2) y la expresión de pili y adhesinas da como resultado la colonización e invasión de las células superficiales (paso 3). Las respuestas inflamatorias del huésped, que incluyen la infiltración de neutrófilos (paso 4), comienzan a eliminar las bacterias extracelulares. Algunas bacterias evaden el sistema inmune, ya sea a través de la invasión de células hospedadoras o mediante cambios morfológicos que resultan en resistencia a los

neutrófilos, y estas bacterias experimentan multiplicación (paso 5) y formación de biopelícula (paso 6). Estas bacterias producen toxinas y proteasas que inducen el daño de la célula huésped (paso 7), liberando nutrientes esenciales que promueven la supervivencia bacteriana y la ascensión a los riñones (paso 8). La colonización renal (etapa 9) da como resultado la producción de toxinas bacterianas y el daño del tejido del huésped (etapa 10). Si no se tratan, las ITU pueden progresar a bacteriemia si el patógeno cruza la barrera epitelial tubular en los riñones (paso 11).

Los uropatógenos que causan infecciones urinarias complicadas siguen los mismos pasos iniciales que los descritos para las infecciones no complicadas, incluida la colonización periuretral (paso 1), la progresión a la uretra y la migración a la vejiga (paso 2). Sin embargo, para que los patógenos causen infección, la vejiga debe estar comprometida. La causa más común de una vejiga comprometida es la cateterización. Debido a la respuesta inmune robusta inducida por el cateterismo (paso 3), el fibrinógeno se acumula en el catéter, proporcionando un entorno ideal para la unión de uropatógenos que expresan proteínas de unión a fibrinógeno. La infección induce la infiltración de neutrófilos (paso 4), pero después de su unión inicial a los catéteres recubiertos de fibrinógeno, las bacterias se multiplican (paso 5), forman biopelículas (paso 6), promueve el daño epitelial (paso 7) y puede sembrar la infección de los riñones (pasos 8 y 9), donde la producción de toxinas induce daño tisular (paso 10) (Flores Mireles , Walke , Caparon , & Hultgren , 2015).

1.2.3 Adherencia y colonización.

Las ITU generalmente se inician cuando UPEC contamina y coloniza la uretra y migra a la vejiga. La mayoría de las cepas caracterizadas de UPEC invaden el epitelio de la vejiga y experimentan un ciclo de infección. El ciclo de infección es una vía compleja que implica la unión epitelial, la invasión de células hospedadoras y la proliferación intracelular, que conduce a la ruptura final de la célula epitelial vesical, diseminación y reinfección de las células epiteliales circundantes (Mann, Mediati, Duggin, Harry , & Bottomley , 2017).

La transición a un ciclo de vida patogénico de UPEC en el tracto urinario consiste en ganar una fortaleza dentro del tracto urinario, UPEC expresa numerosos sistemas de pili

para facilitar la unión a la capa superficial de células epiteliales de la vejiga. La invasión en la célula huésped inicia la replicación de forma inmediata y una subpoblación sufre elongación celular (filamentación). Finalmente, la célula epitelial está sobrecargada y la UPEC escapa como se muestra en la Figura 2 (Mann, Mediati, Duggin, Harry , & Bottomley , 2017).

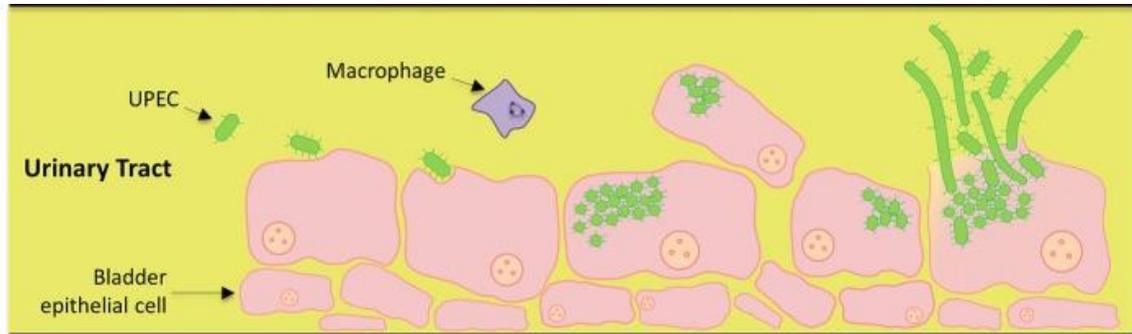


Figura 2 Adherencia y colonización de Escherichia coli uropatógena. Riti Mann, Daniel G. Mediati, Iain G. Duggin, Elizabeth J. Harry and Amy L. Bottomley (2017). Metabolic Adaptations of Uropathogenic E. coli in the Urinary Tract. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7:241. doi: 10.3389/fcimb.2017.00241.

1.2.4 Factores de virulencia.

Los factores de virulencia intervienen en la mediación de la colonización de la vejiga por la UPEC, en particular la fijación inicial de las estructuras adhesivas bacterianas a la superficie luminal del epitelio vesical (Mann, Mediati, Duggin, Harry , & Bottomley , 2017). Estos factores de virulencia están localizados en la superficie bacteriana, y algunos de ellos son exportados para anclarse en la membrana externa, para colonizar el tracto urinario (TU) y para generar patología clínica. El mecanismo de patogenicidad de UPEC inicia con la adherencia a través de la participación de adhesinas fimbriales (FimH, PapG, SfaS, FocH, CsgA y DrA) localizadas en la parte distal de diferentes fimbrias (tipo 1, P, S, F1C, curli y Dr, respectivamente) (Luna Pineda, y otros, 2018). En la vejiga la expresión uropatógena de Escherichia coli (UPEC) de pili tipo 1 es esencial para la colonización, invasión y persistencia. La adhesina tipo pilus tipo 1, FimH, se une a las uroplaquinas y a las integrinas manosiladas que recubren la superficie de las células paraguas. La unión de uroplaquina por FimH induce la reordenación de actina y la

internalización bacteriana a través de mecanismos desconocidos. FimH- α 3 β 1 y las interacciones de integrina inducen la transposición de actina a través de la activación de GTPasas de la familia RHO (tales como las proteínas RAC), dando como resultado la invasión bacteriana (Flores Mireles , Walke , Caparon , & Hultgren , 2015).

Dentro de la célula huésped, UPEC puede subvertir las defensas del huésped y resistir el tratamiento con antibióticos. Sin embargo, el lipopolisacárido (LPS) liberado por UPEC es detectado por Toll-like receptor 4 (TLR4), que induce la producción de AMP cíclico (cAMP) mediante la activación de adenylyl cyclase 3 (AC3), provocando exocitosis de UPEC vesicular a través de la membrana plasmática apical. UPEC subvierte este mecanismo de defensa innato escapando al citoplasma, donde luego se multiplica para formar comunidades bacterianas intracelulares (IBC) (Flores Mireles , Walke , Caparon , & Hultgren , 2015).

La maduración de los GRG provoca la dispersión bacteriana y permite la invasión de otras células hospedadoras, lo que permite a la UPEC reingresar al ciclo de los CIB. Alternativamente, UPEC puede establecer depósitos intracelulares inactivos (QIR) en las células de transición subyacentes. Las QIR constan de 4-10 bacterias no replicantes dentro de compartimentos unidos a membrana encerrados en actina F y pueden permanecer viables durante meses. Además, UPEC sobrevive dentro del severo entorno de la vejiga secretando varios factores que son importantes para la adquisición de nutrientes. La toxina α -hemolisina (HlyA) promueve la lisis de la célula huésped a través de la formación de poros, lo que facilita la liberación de hierro y la adquisición de nutrientes. Los sideróforos expresados por la UPEC permiten que la bacteria elimine el hierro y así promueva la supervivencia durante una infección del tracto urinario (ITU).

La HlyA también desencadena exfoliación epitelial para promover la propagación de UPEC a otros huéspedes después de la expulsión de orina o para exponer las capas más profundas del uroepitelio para QIR. El factor citotóxico necrotizante 1 (CNF1) también es importante para la remodelación de células hospedadoras y funciona uniéndose a la molécula de adhesión de células basales del receptor (BCAM) en las células huésped para inducir la activación constitutiva de RHO, GTPasas, RAC1, RHOA

y control de división celular 42 (CDC42), lo que resulta en reordenamientos del citoesqueleto de actina y fruncimiento de la membrana (Flores Mireles , Walke , Caparon , & Hultgren , 2015).

La activación de RAC1 también induce las vías de la célula huésped anti-apoptótica y pro-supervivencia, previniendo la apoptosis de células epiteliales colonizadas y permitiendo que la población de UPEC se expanda. La supervivencia extracelular de UPEC también requiere la evasión del sistema inmune innato mediante la adopción de una morfología filamentosa, lo que hace que la bacteria sea más resistente a la muerte de neutrófilos que su forma bacilar (Flores Mireles , Walke , Caparon , & Hultgren , 2015). Lo que resulta en reordenamientos del citoesqueleto de actina y fruncimiento de la membrana (Figura 3).

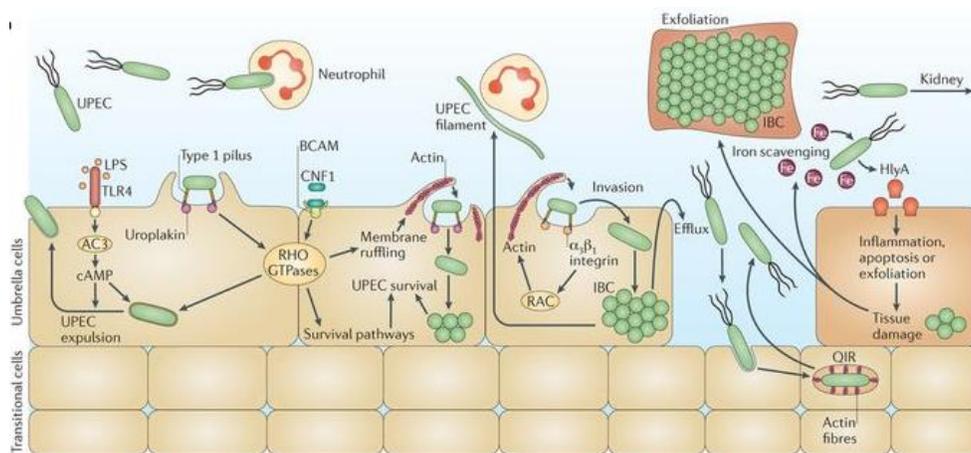


Figura 3 Mecanismo de patogenicidad de UPEC. Flores Mireles Ana L., Walke Jennifer N. r, Caparon Michael, y Hultgren Scott J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015 May; 13(5): 269–284.

La colonización por UPEC de los riñones (Figura 4) depende de la expresión de pili asociado a pielonefritis (P), que se une a glicolípidos que contienen globósidos que recubren el tejido renal. La adhesina P pilus, PapG, también interactúa con TLR4, reduciendo la expresión del receptor de inmunoglobulina polimérica (PIGR). Esto da como resultado una alteración del transporte de inmunoglobulina A (IgA) a través del epitelio, modulando así la respuesta inmune de los anticuerpos secretores locales y

evitando la opsonización y el aclaramiento de la UPEC (Flores Mireles , Walke , Caparon , & Hultgren , 2015).

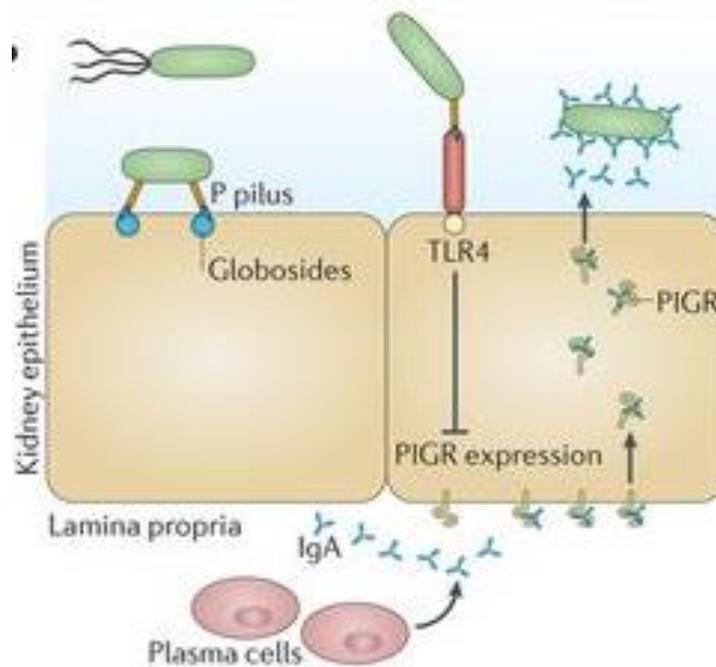


Figura 4 Colonización por UPEC en los riñones. Flores Mireles Ana L., Walke Jennifer N. r, Caparon Michael, y Hultgren Scott J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015 May; 13(5): 269-284.

1.2.5 Fimbria Tipo P.

La fimbria P son apéndices rectos y cortos que emergen períticamente de la superficie bacteriana esta se encuentra codificado por el operón pap. Los pili P consisten en seis tipos de subunidades diferentes organizados en dos subconjuntos distintos, la fibrilla de la punta y la varilla del pilus. El fibrillum flexible de la punta distal tiene un diámetro de ~ 2 nm y está compuesto por una copia de la adhesina PapG en el extremo distal, seguida de una copia de la subunidad PapF del adaptador y de 5 a 10 copias de la subunidad PapE. La varilla pilus larga y rígida de 6,8 nm de ancho está compuesta por más de 1,000 copias de la subunidad PapA, que están conectadas al fibrillo de la punta por una copia de la subunidad PapK del adaptador y terminadas en el extremo proximal (en la pared celular) por una copia de la subunidad de terminación PapH. La varilla PapA adopta

una estructura superhélica de un comienzo para diestros con un paso de 2.5 nm y 3.3 subunidades por turno (Waksman & Hultgren, 2009).

1.2.6 Proteína PapG

En la parte distal de la fimbria Tipo P se encuentra ensamblada la proteína PapG (codificada por el gen *papG*) como se muestra en la Figura 5. La fimbria P se caracteriza por presentar 3 alelos en la adhesina PapG (codificados por los genes: *papGI*, *papGII* y *papGIII*), relacionados con la severidad de las ITU.

La adhesina PapG, se une a los glucósidos que contienen globosides que están presentes en los riñones humanos. Además, PapG modula la respuesta inmune secretoria-anticuerpo local interactuando con TLR4 para reducir la expresión del receptor de inmunoglobulina polimérica (PIGR), alterando así el transporte de inmunoglobulina A a través de la lámina propia y las células epiteliales al lumen del riñón. Al inhibir el transporte de inmunoglobulina A al espacio urinario, la UPEC elude un mecanismo de protección clave del huésped, lo que permite el establecimiento de una infección ascendente (Flores Mireles , Walke , Caparon , & Hultgren , 2015).

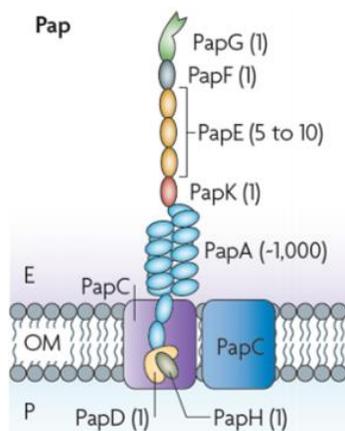


Figura 5 Fimbria Tipo P. Waksman Gabriel and Hultgren Scott J. Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogénesis. Nature Reviews Microbiology 7, 765-774, 2009.

1.3 Métodos convencionales de detección de bacterias patógenas causantes de infecciones urinarias

El análisis de laboratorio para las ITU incluye 3 pruebas principales: análisis de orina con tira reactiva, análisis de orina microscópico y cultivo de orina. La orina y los

resultados microscópicos de análisis de orina pueden aumentar o disminuir la probabilidad de prueba previa de IU, lo que permite a los médicos diagnosticar con mayor precisión las ITU (Chu & Lowder, 2018).

1.3.1 Análisis de orina con tira reactiva.

El análisis de orina con tira reactiva permite el análisis de múltiples componentes de la orina, siendo los más importantes los leucocitos (esterasas), nitritos y glóbulos rojos.

Las esterazas se expresa en glóbulos blancos, que se elevan en la orina durante infección, se da como resultado positivo en la presencia de 5 a 15 glóbulos blancos por campo de alta potencia.

Los nitritos son indicativo de presencia de bacterias, ya que algunos uropatógenos contienen enzimas bacterianas que convierten nitratos en nitritos. Las tiras para orina son capaces de detectar nitritos en presencia de bacterias mayor que 105 ufc / ml.

Las tiras para orina pueden detectar niveles bajos de sangre en la orina (se correlaciona con 1-4 glóbulos rojos por campo de alta potencia). Aunque la sangre puede estar asociada con otra patología, en presencia de síntomas o pruebas positivas de nitritos y esterazas, su presencia puede aumentar la probabilidad de ITU (Chu & Lowder, 2018).

1.3.2 Análisis de orina microscópico

El análisis de orina microscópico se realiza con microscopía de luz manual o automática. La presencia de leucocitos (piuria, está definida como más de 5-10 leucocitos / por campo de alta potencia) o bacterias (bacteriuria, ≥ 15 bacterias / por campo de alta potencia) en la orina puede ser útil para diagnosticar la ITU (Chu & Lowder, 2018).

Ocasionalmente, la hematuria en presencia de bacteriuria o piuria también puede indicar ITU. La presencia de células epiteliales escamosas puede ocasionalmente indicar contaminación, y cilindros de glóbulos blancos pueden indicar inflamación o infección del tracto urinario superior.

1.3.3 Cultivo de orina

El cultivo de orina es el estándar de oro para el diagnóstico de ITU (Chu & Lowder, 2018). Permite realizar una relación cuantitativa detectando el número de bacterias por mililitro de orina, pudiéndose interpretar los resultados según los criterios de Kass:

– Con más de 100.000 UFC/ml existe una probabilidad de bacteriuria significativa del 80%.

- De 10.000 a 100.000 UFC/ml la probabilidad de bacteriuria es dudosa o excepcional.
- Con menos de 10.000 UFC/ml se trata de una contaminación.

Además, permite la realización de una valoración cualitativa detectando el germen responsable de la infección urinaria. Su uso también es útil para la obtención de un antibiograma, determinando la sensibilidad de los gérmenes a los antimicrobianos. Es importante tener en cuenta que la realización del cultivo es también útil tras la administración de los antimicrobianos a la hora de valorar su eficacia. Con su uso se evita el riesgo de bacteriurias asintomáticas y confiere tranquilidad sobre el estado del enfermo.

Posteriormente a los análisis ya mencionados se realizan pruebas de localización de la infección como los estudios de adherencia, estudios de receptores inmunológicos o estudios de excreción enzimática. Dentro de los que destaca la radiografía simple de abdomen, cistouretrografía miccional, urografía intravenosa, ecografía renal, etc.

1.4 Biosensor

Un biosensor es un dispositivo de análisis conformado por un elemento biológico de reconocimiento (célula, tejido, receptor, ácido nucleico, enzima, ribozima o anticuerpo, entre otros), ó nanomateriales (nanopartículas, nanocompuestos), materiales inteligentes ó compuestos biomiméticos (aptámeros, polímeros de microporosidad intrínseca, sondas de ácidos nucleicos), asociado a un mecanismo que garantiza la detección e interpretación de la variación de propiedades ópticas, fisicoquímicas, eléctricas, entre otras, obtenida de la interacción entre el analito y el dispositivo analítico (Pineda, 2003).

El principio de detección se basa en la interacción específica del compuesto o microorganismo de interés y el elemento biológico de reconocimiento, como resultado de esta unión, se produce la variación de una o varias propiedades físico químicas (pH, transferencia de electrones, calor, cambio de potencial, cambio de masa, variación de propiedades ópticas, etc), las cuales son detectadas por el transductor (Figura 6).

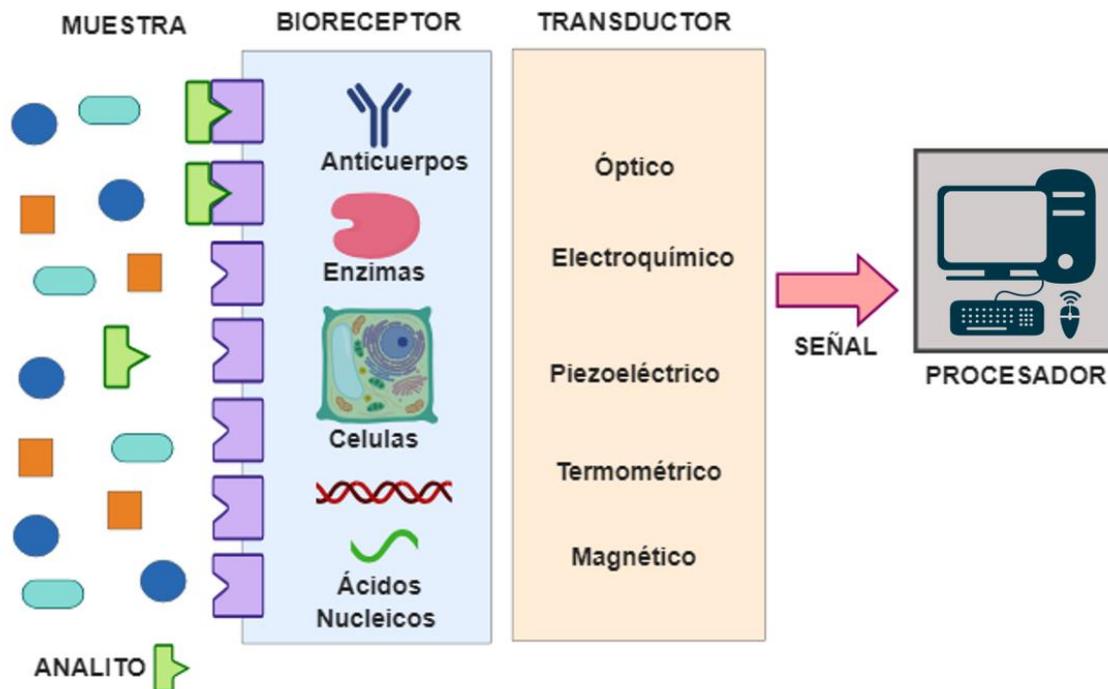


Figura 6 Esquema funcional de un biosensor.

Los biosensores pueden ser clasificados de acuerdo con la heterogeneidad de materiales, las variables de sus componentes estructurales, los mecanismos químicos, físicos ó fisiológicos de su funcionalidad, y también de acuerdo a los mecanismos de detección de la señal (Mello & Kubota, 2002). Esta clasificación puede ser en función de: el tipo de interacción que se establece entre el elemento biológico de reconocimiento y el analito; el método utilizado para detectar dicha interacción; la naturaleza del elemento biológico de reconocimiento; o del sistema de transducción como se muestra en la Tabla 1 (Gonzales , Garcia, Ruiz, & Gago, 2005).

Tabla 1 Clasificación de biosensores. Gonzales, V., Garcia, E., Ruiz, O., & Gago, L. (2005). *Aplicaciones de Biosensores en la Industria Agroalimentaria*. CEIM Dirección General de Universidades e Investigación, M-2213-2005.

Criterios de clasificación de los biosensores			
Tipo de interacción	Detección de la interacción	Elemento biológico de reconocimiento	Sistema de transducción
Biocatalítica Bioafinidad	Directa Indirecta	Enzima Organulo, Tejido o célula completa Anticuerpo Ácidos nucleicos Aptámero	Electroquímico Óptico Termométrico Nanomecánico

1.4.1 Sistema de transducción empleados en biosensores

La naturaleza de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito constituye el factor determinante para la selección del sistema de transducción, sin el cual no es posible obtener, amplificar, registrar, sistematizar, almacenar e interpretar las señales producto de la interacción entre estos (Jimenez C. & León P. , 2008). Existen diferentes sistemas de transducción: nanomecánico, piezoeléctrico, electroquímico, termoelectrónico u óptico. Entre los sistemas de transducción más referenciados están los electroquímicos u ópticos.

❖ Transductor electroquímico

Caracterizados por su capacidad de convertir la señal obtenida en una señal eléctrica, son utilizados en sistemas de reconocimiento biocatalíticos (Jimenez C. & León P. , 2008). La medición de las propiedades eléctricas para extraer información de sistemas biológicos es normalmente de naturaleza electroquímica, por lo que un componente bioelectroquímico sirve como elemento de transducción principal. Típicamente en (bio) electroquímica, la reacción bajo investigación generaría una corriente mensurable (*amperométrica*), un potencial medible o acumulación de carga (*potenciométrica*) o alteraría de forma medible las propiedades conductivas de un medio (*conductométrico*) entre electrodos. También se hacen referencias a otros tipos de técnicas de detección

electroquímica, como la *impedimétrica*, que mide la impedancia (resistencia y reactancia) y *el efecto de campo*, que utiliza tecnología de transistor para medir la corriente como resultado de un efecto potenciométrico en un electrodo de puerta (Grieshaber, MacKenzie, Vörös, & Reimhult, 2008).

❖ Transductor óptico

Los transductores ópticos se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de la luz como consecuencia de la interacción física o química entre el analito a detectar y el elemento biológico de reconocimiento del biosensor. Las bases físicas de este tipo de sensores son los cambios que ocurren en la absorción, fluorescencia, luminiscencia, dispersión o índice de refracción, cuando la luz interacciona en las superficies de reconocimiento (Perez Coyotl, 2016).

Los biosensores ópticos ofrecen grandes ventajas sobre las técnicas analíticas convencionales porque permiten la detección directa, en tiempo real y sin etiquetas de muchas sustancias biológicas y químicas. Sus ventajas incluyen alta especificidad, sensibilidad, tamaño pequeño y rentabilidad (Damborský, Švitel, & Katrlík, 2016).

1.4.2 Elementos biológicos de reconocimiento utilizados en biosensores

Se basa en el receptor biológico que detecta específicamente una sustancia aprovechando la especificidad de las interacciones biomoleculares.

Anticuerpos

Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas (Ig), son glucoproteínas especializadas que hacen parte de la inmunidad humoral; son producidas por las células del sistema inmune llamadas células B, que tienen la capacidad de reconocer otras moléculas específicas llamadas antígenos (Machado, Téllez, & Castaño, 2006).

La respuesta inmunológica específica se desarrolla cuando un organismo ha sido expuesto a uno o varios antígenos, originando una respuesta policlonal, es decir, la producción de anticuerpos contra un rango amplio de estructuras presentes en los antígenos. Por el contrario, la respuesta monoclonal se da por la selección de un solo clon

activado de células B que produce un anticuerpo para un determinante antigénico único (Rojas *et al.*, 2001).

Los anticuerpos son proteínas que envuelven una estructura bioquímica compleja demarcada por dos tipos de cadenas de polipéptidos, las cadenas pesadas de mayor tamaño (peso molecular de 50 000 a 70 000 daltons) y las cadenas ligeras más pequeñas (peso molecular de 23 000 daltons o 23 kD). Los dos tipos de cadenas se reúnen entre sí para formar pares mediante enlaces disulfuro (Karp 2011).

Hay dos tipos de cadenas ligeras: cadenas kappa (κ) y cadenas lambda (λ), ambas presentes en las cinco clases de inmunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM). Por lo contrario, cada tipo de inmunoglobulina tiene su propia cadena pesada única que define dicho tipo. Funcionalmente, los anticuerpos se dividen en una fracción que involucra el reconocimiento antigénico, denominada Fab, y una fracción cristalizable (Fc) que media funciones efectoras como la citotoxicidad celular que depende del anticuerpo (antibody dependant cellular cytotoxicity, ADCC) y la citotoxicidad que depende del complemento (CD) como se muestra en la Figura 7.

Las regiones Fab están conformadas por una región variable y otra conservada. La región variable tiene una diversidad casi infinita para el reconocimiento de antígenos, gracias a las regiones determinantes de complementariedad (CDR), o regiones hipervariables; la región conservada ayuda a la estabilización de la reacción entre los segmentos CDR con el antígeno (Machado *et al.*, 2006).

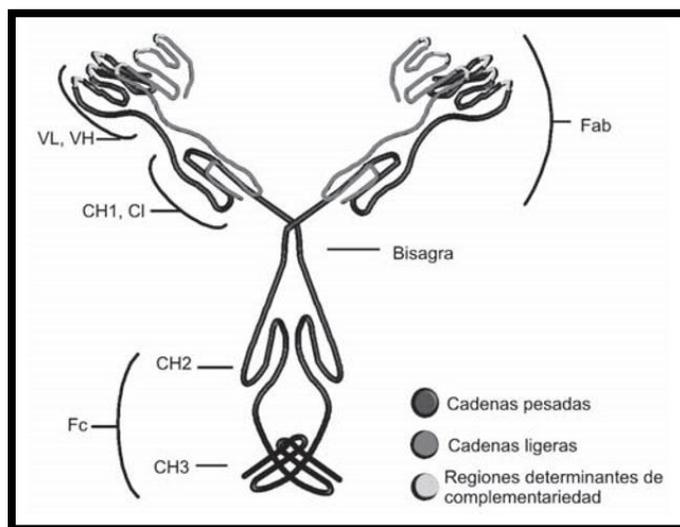


Figura 7 Estructura de un anticuerpo VL: fracción variable de la cadena ligera; VH: fracción variable de la cadena pesada; CH1, CH2: dominios de la cadena pesada en los que se concentran las funciones de reconocimiento antigénico; Fab: fracción de unión antigénica; Fc: fracción cristalizante conformada por CH2, CH3 de ambas cadenas pesadas y la bisagra. Machado Nina Patricia, Téllez German Alberto y Castaño Jhon Carlos (2006). Monoclonal antibodies: physical development and therapeutic perspectives. Asociación Colombiana de Infectología 10(3): 186-197.

Las cadenas ligeras de cualquier anticuerpo pueden ser clasificadas como tipo kappa (k) o lambda, basadas en pequeñas diferencias estructurales polipeptídicas en sus regiones constantes; sin embargo, las regiones constantes de las cadenas pesadas determinan las subclase de cada anticuerpo. Las subclases de anticuerpos difieren en el número de puentes disulfuro y la longitud de la región “bisagra”. Las diferentes inmunoglobulinas aparecen en distintos momentos luego de la exposición a una sustancia extraña o en diferentes líquidos corporales (Machado , Téllez , & Castaño , 2006).

Proteínas

Las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. El número de aminoácidos presentes en una proteína varía de una a otra. La unión de dos aminoácidos forma un dipéptido, la de tres un tripéptido, y así sucesivamente. Cuando se unen muchos aminoácidos por enlace peptídico forman un polipéptido y las

proteínas constan de uno o varios polipéptidos. Las hay que contienen sólo 15 y otras que contienen 10.000 aminoácidos. Como difieren en su composición, secuencia y número de aminoácidos, es fácil deducir que existe una gran variación en cuanto a la estructura y la función de las proteínas (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2011).

Proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes (PR) también llamadas proteínas quiméricas o proteínas heterólogas, son aquellas cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo nativo. La bacteria *Escherichia coli* (E. coli) es ampliamente utilizada en la industria biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes con fines diagnósticos, terapéuticos o vacúnales, por procedimientos relativamente baratos, ya que ha sido muy bien caracterizada desde el punto de vista genético y fisiológico. Presenta una serie de ventajas importantes: i) su genoma es conocido desde hace varios años, lo que amplía considerablemente las posibilidades de su manipulación genética, ii) existe una gran cantidad de conocimiento acumulado sobre su fisiología y metabolismo, iii) se tienen varios vectores bien establecidos para la producción de PR, iv) puede crecer rápido en medios muy simples, con altos niveles de producción de PR (Lara, 2011). Los aspectos involucrados en la producción de proteína recombinante por bacterias se muestra en la Figura 8.



Figura 8 Principales pasos involucrados en la producción de proteína recombinante. Alvaro R. Lara (2011). Producción de Proteínas Recombinantes en Escherichia coli. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 10, No. 2 (2011) 209-223.

1.5 Métodos de inmovilización del elemento biológico de reconocimiento

Los métodos de inmovilización del elemento biológico de reconocimiento comprenden métodos físicos, como la adsorción o atrapamiento, y los métodos químicos, como la unión covalente o entrecruzamiento.

1.5.1 Inmovilización física del elemento biológico de reconocimiento

Adsorción

La adsorción física del elemento biológico de reconocimiento al soporte se origina por una serie de interacciones físicas de distinta naturaleza: iónicas, hidrofóbicas o de Van der Waals. Estas interacciones dependen en gran medida de las propiedades químicas del soporte y las características de la superficie del elemento biológico de reconocimiento. Un inconveniente derivado de este método es la posible desorción de los elementos biológicos de reconocimiento inmovilizados al someterlos a cambios de temperatura, de sustrato o de

fuerzas iónicas. Esto es principalmente crítico en el paso correspondiente a la elución del analito a detectar.

Atrapamiento

Consiste en la retención física del receptor biológico de reconocimiento en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por polímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión del elemento biológico de reconocimiento en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles (Arrollo, 1998).

1.5.2 Inmovilización química del receptor biológico de reconocimiento

Unión covalente

La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con el receptor biológico de reconocimiento. Este método presenta ventajas: la manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla; la carga de biomolécula permanece constante después de la inmovilización; una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura de los disolventes orgánicos o del pH (Arrollo, 1998).

La estrategia de unión covalente más utilizada es la reticulación heterobifuncional de los grupos amino o carboxilo del receptor biológico contra los grupos carboxilo o amino libres en plataformas bioanalíticas utilizando EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) junto con NHS(N-hidroxi succinimida) o sulfoNHS (Vashist, 2012; Wolfbeis & Homola, 2006). La reticulación de anticuerpos por sus grupos amino afecta su detección de antígeno debido a su orientación incorrecta porque los grupos amino están presentes en diferentes sitios del anticuerpo, incluida la región cercana al sitio de unión al antígeno. Por lo tanto, la reticulación de los anticuerpos por sus grupos carboxilo, proporciona una orientación favorable ya que los grupos carboxilo se encuentran en la

región del fragmento cristalizante de los anticuerpos lejos de su sitio de unión al antígeno (Vashist, 2012; Wolfbeis & Homola, 2006).

El EDC es un agente de reticulación de longitud cero, reactivo con carboxilo y aminas, que reacciona inicialmente con el grupo carboxilo y forma un intermedio O-acilisourea. Este intermedio reacciona rápidamente con un grupo amino para formar un enlace amida y libera un subproducto de isourea (Figura 9). El intermedio O-acilisourea es inestable en soluciones acuosas y se hidroliza si no reacciona con una amina. La hidrólisis del intermedio regenera el grupo carboxilo y libera urea N-sustituida. Por lo tanto, se requiere NHS (N-hidroxi succinimida) o sulfoNHS para la estabilización ya que reaccionan con el reactivo inestable éster O-acilisourea intermedio para formar un éster NHS reactivo con la amina semi-estable que es estable durante algunas horas a pH 7,4 (Vashist, 2012). Normalmente se prefiere el NHS debido a su solubilidad en agua, su toxicidad relativamente baja y reactividad óptima para acoplamientos de dos etapas.

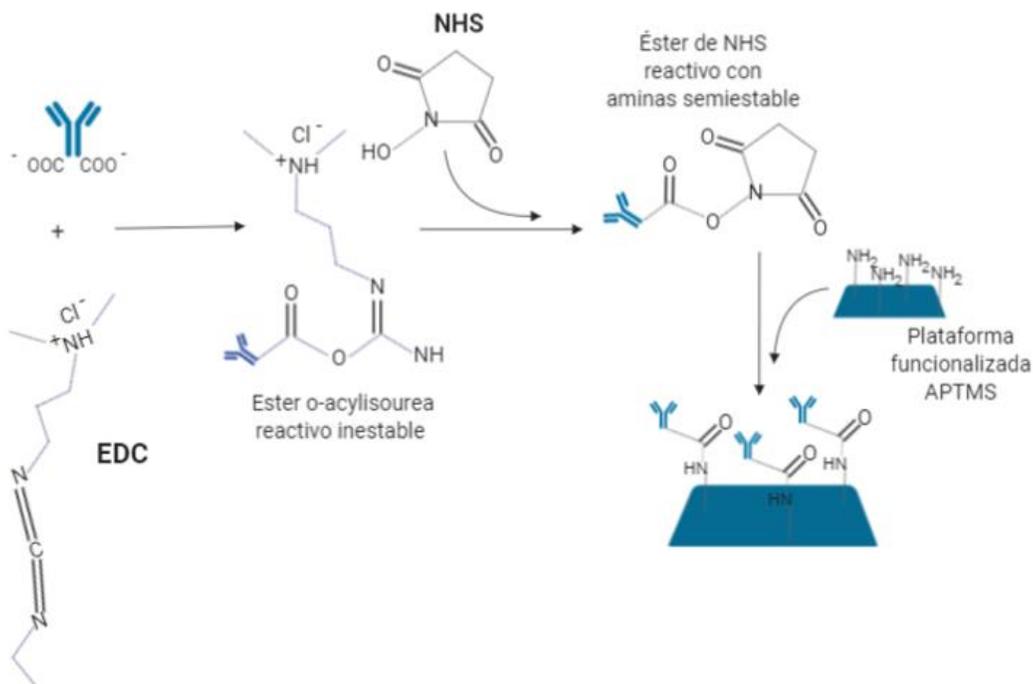


Figura 9 Reacción química de EDC/NHS para la inmovilización de anticuerpos en plataformas modificadas con APTMS (3 aminopropiltrimetoxisilano). Modificado de (Vashist, 2012).

Reticulado

También denominado entrecruzamiento o cross-linking. El método del reticulado consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas del receptor biológico de reconocimiento y el soporte utilizado para la inmovilización. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida. El resultado del reticulado son biomoléculas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura (Arrollo, 1998).

1.5.3 Inmovilización por bioafinidad del receptor biológico de reconocimiento

Este método requiere la inmovilización previa del agente de captura mediante la inmovilización física o covalente a la superficie. Los agentes de captura utilizados para llevar a cabo la inmovilización del receptor biológico son: proteína A, G y la unión avidina/biotina o estreptavidina/biotina.

Unión mediante proteína A y proteína G

La proteína A se encuentra en la pared celular de *Staphylococcus aureus*, reconoce y une específicamente la región Fc del anticuerpo, de forma que la región Fab queda accesible para que se produzca la unión antígeno-anticuerpo. Esta proteína presenta 5 subunidades, cada una de las cuales tiene su propio receptor Fc. La proteína A puede unirse al soporte siguiendo distintas metodologías, ejerciendo como un brazo espaciador para los anticuerpos. Su extrema especificidad por la región Fc del anticuerpo, de forma que asegura que éste se inmovilice de forma dirigida, ha convertido a la proteína A en una herramienta muy utilizada para unir anticuerpos. La proteína A sólo reacciona con ciertas clases de inmunoglobulinas (por ejemplo, no reacciona con IgG3 o IgD humanas o IgM, IgA o IgE de ratón), mientras que la proteína G de *Streptococcus sp.* reacciona con más tipos (como más isotipos de IgG humanas). La reacción entre el anticuerpo y la proteína G sería similar a la de la proteína A, por lo que su uso puede ser de interés en ciertos casos en los que la proteína A no nos sería útil (Batalla , y otros, 2008).

Unión avidina-biotina

La vitamina biotina se une con gran fuerza a la proteína avidina, o a la estreptavidina. Esta interacción ha generado una metodología basada en la avidina-biotina, donde la avidina o la estreptavidina son capaces de reconocer la biotina unida a diferentes tipos de moléculas. Así, anticuerpos biotinilados, son capaces de unirse a superficies donde se ha inmovilizado previamente avidina o estreptavidina. Si la biotinilación se produce de forma aleatoria, se obtienen también orientaciones aleatorias de los anticuerpos sobre la superficie, pero si la biotinilación se produce en una región determinada del anticuerpo (por ejemplo en los grupos sulfhidrilos originados después de la reducción del anticuerpo) el anticuerpo se une a la superficie de forma orientada (Batalla , y otros, 2008).

1.6 Ensamblado del biosensor

Para el ensamblado del biosensor un paso fundamental es la modificación química de la superficie con el fin de crear enlaces que permitan fijar las biomoléculas en la superficie del sensor. El buen funcionamiento de un biosensor depende en gran medida, de la inmovilización del elemento biológico de reconocimiento sobre el transductor.

1.6.1 Monocapas autoensambladas (SAMs)

Las monocapas autoensambladas (SAMs por sus siglas en inglés) son películas moleculares bidimensionales organizadas por una capa de moléculas anfílicas ensambladas en el sustrato por una afinidad especial. El grosor de las SAMs es generalmente entre 3 y 10 nm y depende de la dimensión de la estructura molecular y el ángulo de orientación de la cadena de la molécula a la superficie del sustrato. Las monocapas autoensambladas se pueden preparar utilizando diferentes tipos de moléculas y diferentes sustratos (Wang & Chung, 2013).

Las monocapas autoensambladas son una técnica muy útil para cubrir una superficie con una capa de cierta funcionalidad química. Es posible adsorber (atraer o retener) más de un tipo de molécula formadora de monocapas a una superficie, es decir, adsorber moléculas con diferentes grupos principales con el fin de tener más control sobre la funcionalidad expuesta. La modificación de una superficie puede lograrse mediante procesos físicos o químicos. Estos procesos han dado origen al muy extendido término

funcionalizar, que hace referencia a poner grupos funcionales, pero esta palabra no existe en español y es un anglicismo de *functionalization*. La manera correcta es modificación química de superficies (Ortiz Dosal & Kolosovas Machuca , 2017).

Las moléculas con los grupos funcionales se acomodan en capas sobre la superficie sin que sea necesaria la intervención de una fuerza externa. Los componentes esenciales de estas capas de moléculas son los grupos de anclaje, funcional principal y enlazante (Figura 10). El de anclaje une las moléculas con la superficie, el principal define el estado de funcionalización la nueva superficie externa después de la modificación y el enlazante, mediante interacciones electrostáticas de los átomos que forman la estructura de la molécula, provee una fuerza adicional para la reacción de adsorción y puede crear un cierto grado de ordenamiento en el sistema (Ortiz Dosal & Kolosovas Machuca , 2017).

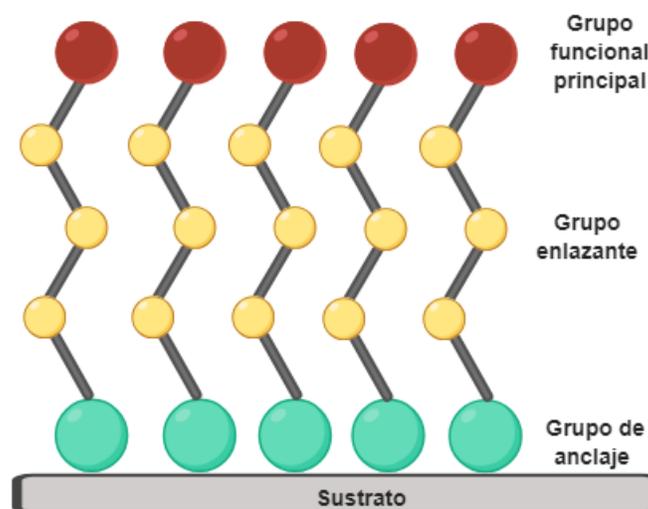


Figura 10 Monocapa autoensamblada conformado por los grupos de anclaje, enlazante y funcional principal. Modificado de Ortiz Dosal Luis Carlos y Kolosovas Machuca Eleazar Samuel (2017). Ingeniería De Superficies y Monocapas Autoensambladas. Doctorado Institucional en Ingeniería y Ciencia de Materiales, UASLP.

1.6.2 Preparación de SAMs

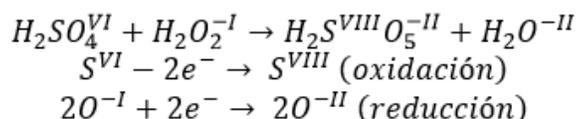
En la actualidad se han descrito diferentes protocolos prácticos para preparar SAMs teniendo en cuenta la concentración, el tiempo de inmersión, el disolvente, la temperatura y algunos detalles sobre la termodinámica y cinética que gobiernan el proceso de ensamblado. Así como la utilización de diferentes tipos de sustratos para soportar las SAMs

y, en algún grado, otros tipos de moléculas. Los criterios que se tienen en cuenta para seleccionar el tipo de sustrato y el método de preparación dependen de la aplicación para la cual se usará la SAMs. Para este estudio se describirán dos pasos fundamentales para la SAMs la oxidación y la silanización.

Oxidación

El objetivo de esta etapa es la formación de grupos de anclaje mediante una reacción de oxidación por adsorción en fase líquida. La cual consiste en una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) también conocida como solución piraña. Esta solución añade grupos hidroxilos (-OH) activos al sustrato además de que también elimina la contaminación de origen orgánico. Químicamente al reaccionar el ácido sulfúrico y el peróxido de hidrógeno inicialmente el azufre pierde dos electrones (oxidación) posteriormente el oxígeno gana dos electrones (reducción), finalmente como productos se obtienen ácido peroxosulfúrico y agua (Ecuación 1).

Ecuación 1 Reacción de oxidación



Silanización

El objetivo de esta etapa es la formación de grupos enlazantes mediante un agente de acoplamiento (organosilano) para finalmente obtener grupos funcionales (grupos amino) sobre nuestro sustrato. En esta etapa se ocupan agentes de acoplamiento como lo son los organosilanos que son compuestos de estructura $R-Si(X)_3$ donde R representa una cadena orgánica funcional diseñada para permitir una mayor compatibilidad entre el agente biológico a inmovilizar y la superficie, y X, es un grupo hidrolizable. La silanización en medio acuoso se describe a continuación:

La primera etapa consiste en la hidrólisis de los grupos metoxi de las moléculas del silano dando lugar así a grupos silanol. En la segunda etapa, las moléculas de silanol

reaccionan entre sí mediante condensación de sus grupos silanol (formado por Si-OH), dando lugar a un proceso de polimerización de las mismas en el disolvente orgánico, el grado de polimerización va a depender en gran medida de la cantidad de agua presente, si la cantidad de agua es muy elevada resultara una excesiva polimerización, mientras que una deficiencia de agua ocasionara la formación de una monocapa incompleta. Otros factores que también se deben tomar en cuenta son el tipo de disolvente orgánico, la concentración de silano, el tiempo de reacción y la temperatura (Hermanson, 2013).

La tercera etapa consiste en la unión por puentes de hidrogeno de los grupos silanol de las moléculas de silanos con los grupos silanol presentes en la superficie. Finalmente en la etapa cuatro se produce la unión covalente de las moléculas de silano a la superficie mediante la formación de enlaces siloxano (Figura 11).

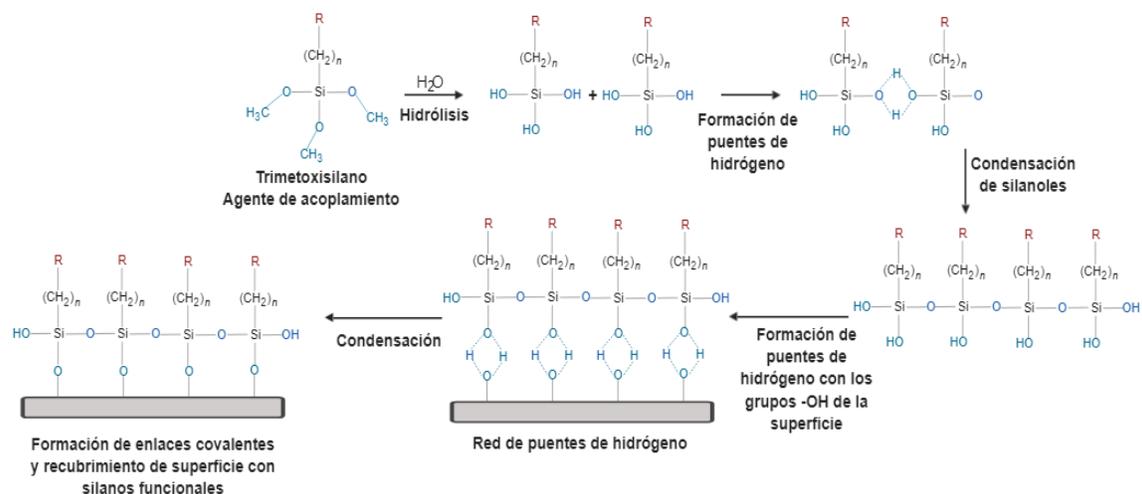


Figura 11 Silanización en medio acuoso. Modificado de Hermanson, G. T. (2013). *Bioconjugate Techniques (Third edition) Elsevier*.

1.7 Materiales utilizados como soporte para la inmovilización de receptor biológico de reconocimiento para el desarrollo de biosensores

El soporte sobre el que se une el receptor biológico de reconocimiento suele ser de distinta naturaleza, dependiendo de la utilidad que se les pretenda dar. Estos soportes, pueden dividirse en;

-polímeros orgánicos sintéticos (hidrofóbicos): poliestireno, membranas de teflón

-polímeros orgánicos naturales (principalmente hidrofílicos): celulosa, agarosa, polidextranos, almidón

-materiales inorgánicos: vidrio, silicio, sílica, carbón, acero inoxidable, óxidos metálicos, arena, caolinita y yeso (Batalla , y otros, 2008).

1.7.1 Silicio

El silicio es uno de los elementos químicos cuyo símbolo es "Si" y que se encuentra en la tabla periódica en el grupo 14 o IVA. Por su abundancia ($2,57 \times 10^5$ p.p.m.) es el segundo elemento que más se encuentra en la corteza terrestre después del oxígeno ($4,95 \times 10^5$ p.p.m.). Este material compone alrededor del 20% de la corteza terrestre. Forma parte, en la tabla periódica, de la familia del carbono pero, a diferencia de éste, no se lo encuentra en la naturaleza en estado puro sino, generalmente, combinado con oxígeno en su mayoría formando óxidos de Si (SiO_2 , dióxido de silicio) y silicatos. El SiO_2 abunda en distintas formas como el cuarzo, ágata, jaspe, carnelia, ópalo y pedernal. La arena es en gran parte dióxido de silicio y la mayoría de las rocas corrientes, salvo calizas o dolomitas, contienen silicio: por ejemplo, el feldespato $\text{Si}_3\text{O}_8\text{KAl}$; el asbesto $(\text{SiO}_3)_4\text{Mg}_3\text{Ca}$; la mica $(\text{SiO}_4)_3\text{H}_2\text{KAl}_3$; etc.

El silicio cristalino es el material base de la industria microelectrónica y fotovoltaica. Posee un aspecto metalizado y es de difícil dilución, es atacado por ácidos como el fluorhídrico, nítrico y combinaciones de ellos. Es un material muy duro, al punto que puede utilizarse para rayar o cortar vidrio (Martínez Bogado , 2011).

El silicio cristalino es el material utilizado en celdas solares y microelectrónica. Tiene sus átomos ordenados en forma muy particular: cada átomo intenta unirse con cuatro átomos vecinos. Lo que los mantiene unidos son 2 electrones que comparten uno de cada átomo. Como cada átomo de Si tiene cuatro electrones que no están fuertemente unidos al núcleo, todo funciona perfectamente si cada átomo está rodeado de otros cuatro átomos iguales.

En cuanto a sus propiedades químicas el Si en su forma cristalina es un material muy duro (6,5 en la escala de Moss) y su punto de fusión es 1687 K y el de ebullición es 3173 K (Martínez Bogado , 2011).

1.8 Técnicas de caracterización

Para el análisis y caracterización de cada una de las etapas dentro del desarrollo del biosensor óptico se hace uso de las técnicas de Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia UV-visible y microscopia de fuerza atómica.

1.8.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Es una de las técnicas no destructivas más empleada actualmente en la caracterización estructural y composicional de materiales. Los modos vibracionales de los compuestos moleculares tienen frecuencias que caen dentro del rango infrarrojo, y que a grandes rasgos se utiliza para la identificación de compuestos y materiales, así como para la determinación de la composición, detección y cuantificación de impurezas. La mayoría de los materiales orgánicos e inorgánicos demuestran absorción y el espectro es originado principalmente por el alargamiento vibracional y flexión dentro de la molécula (Douglas Skoog , James Holler , & Timothy Nieman, 2001).

La región del infrarrojo (IR) del espectro electromagnético se encuentra entre $12800-10\text{ cm}^{-1}$. Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los aparatos se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR): $12800-4000\text{ cm}^{-1}$, IR medio o fundamental: $4000-400\text{ cm}^{-1}$; IR lejano: $400-10\text{ cm}^{-1}$, siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales.

Dentro de la región del IR fundamental existen dos regiones, una de ellas es la llamada de los grupos funcionales de 4000cm^{-1} a 1300 cm^{-1} , y la región dactilar de 1300 cm^{-1} a 670 cm^{-1} (Douglas Skoog , James Holler , & Timothy Nieman, 2001). Dos son los tipos principales de espectrómetros de infrarrojo, los dispersivos y los multiplex o de transformada de Fourier. Los primeros son espectrofotómetros de doble haz que utilizan redes de reflexión para la dispersión cuyo diseño y construcción son parecidos a los espectrofotómetros ultravioleta/visible. Los de transformada de Fourier, comúnmente llamados FTIR son espectrómetros basados en el fenómeno de la interferencia, que funcionan con señales en el dominio del tiempo y que presentan grandes ventajas sobre los dispersivos. Para aplicaciones de índole general en las que se necesita una elevada sensibilidad y rapidez, los espectrómetros de infrarrojo más utilizados actualmente son los FTIR.

En este trabajo utilizamos esta técnica como un procedimiento de análisis en el que a partir de los espectros de absorción infrarroja se puede deducir, en el caso de una capa depositada sobre un sustrato, una información tanto de la intensidad como de la frecuencia de los modos vibraciones.

El equipo utilizado en este trabajo es un espectrofotómetro FTIR Bruker modelo vertex 70 del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional (CIBA-IPN). El intervalo de frecuencias utilizado fue de 400-4000 cm^{-1} .

1.8.2 Espectroscopia UV-Visible

La luz UV-visible es sólo una pequeña parte del espectro electromagnético, visible (780-380nm); UV (380-200nm). La base de la espectroscopia visible y ultravioleta consiste en medir la intensidad del color (o de la radiación absorbida en UV) a una longitud de onda específica comparándola con otras soluciones de concentración conocida (soluciones estándar) que contengan la misma especie absorbente. Para tener esta relación se emplea la Ley de Beer, que establece que para una misma especie absorbente en una celda de espesor constante, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración (Douglas Skoog , James Holler , & Timothy Nieman, 2001).

Esta radiación puede ser emitida por sustancias bajo condiciones de gran excitación, como por ejemplo, altas temperaturas o descargas eléctricas. La radiación electromagnética al incidir sobre la materia puede sufrir los siguientes procesos: absorción, transmisión, reflexión, refracción y dispersión.

Capítulo 2

Problema de estudio

En este capítulo se describe la importancia del estudio realizado, basado en el desarrollo de un biosensor óptico para la detección de la proteína PapG utilizando como elemento de reconocimiento anticuerpos anti-PapG y un biosensor óptico para la detección de anticuerpos Anti-PapG utilizando como elemento de reconocimiento la proteína PapG para su posterior aplicación en la detección en muestras biológicas, como una alternativa más viable para la detección de UPEC, para lograr una mayor reducción en costo y tiempo, ya que ambas son vitales para su pronto diagnóstico y tratamiento.

2.1 Planteamiento del problema

En México, las ITU son un problema de salud pública por su alta morbilidad. Cada año se registran aproximadamente cuatro millones de casos. Las poblaciones con alto riesgo de contraer ITU son los recién nacidos, las niñas en edad preescolar, las mujeres con actividad sexual y ambos sexos en la edad avanzada (Luna Pineda, y otros, 2018). En el primer año de vida es más frecuente en niños (3.7%) que en niñas (2%). Se incrementa más en los lactantes menores a los 2 meses de edad, con una incidencia de 5% en niñas y 20.3% en niños no circuncidados (Lombardo Aburto , 2018). En niños, uno de cada tres presentará una ITU antes de un año de edad y ~18% mostrará recaídas a la infección entre 3-4 meses (Nuutinen & Uhari , 2001). La incidencia se invierte en la etapa prepuberal con un 3% en niñas y 1% en niños (Lombardo Aburto , 2018). La mayoría de las infecciones son causadas por *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) en un 80-90%. Su mecanismo de patogenicidad inicia a través de la participación de adhesinas fimbriales (FimH, PapG, SfaS, FocH, CsgA y DrA) localizadas en la parte distal de diferentes fimbrias (tipo 1, P, S, F1C, curli y Dr, respectivamente) (Luna Pineda, y otros, 2018). Sin embargo las fimbrias P de UPEC se han asociado con la colonización e inflamación en los riñones (pielonefritis) mediante la unión de la adhesión de PapG a los glucolípidos Gal (α 1-4) Gal y al receptor Toll-like (TLR) 4 en células renales (Luna Pineda , y otros, 2016). Adicionalmente en estudios realizados se sabe que, PapG modula la respuesta inmune local secretoria-anticuerpo logrando inhibir el transporte de inmunoglobulina A, al espacio urinario, lo que permite el

establecimiento de una infección ascendente (Flores Mireles , Walke , Caparon , & Hultgren , 2015).

2.2 Justificación

Los síntomas asociados a ITU incluyen: aumento en la frecuencia urinaria, sensación de ardor y/o dolor durante la micción (disuria), dolor suprapúbico o en el abdomen bajo, la orina se presenta turbia con leucocitos polimorfonucleares abundantes (piuria), eritrocitos (hematuria), bacterias (bacteriuria) y en ocasiones orina con olor fétido (O'Brien , Hannan , Nielsen , & Hultgren , 2016). La fiebre es un signo frecuente asociado a un cuadro de pielonefritis con diseminación a tracto urinario superior (O'Brien , Hannan , Nielsen , & Hultgren , 2016). El daño renal y la pérdida de la función son complicaciones severas que están asociadas a la mayoría de las ITU, principalmente en lactantes, en donde el diagnóstico rápido es difícil (O'Brien , Hannan , Nielsen , & Hultgren , 2016). Para establecer el diagnóstico de ITU se debe tomar en consideración el cuadro clínico y algunos parámetros de laboratorio, como son el examen general de orina, la interpretación de las tiras reactivas y el *urocultivo*, considerado como el “estándar de oro” para establecer el diagnóstico (Lombardo Aburto , 2018). Para la identificación de estos patógenos existen métodos convencionales que implican cultivo selectivo y aislamiento de células seguido de métodos bioquímicos y serológicos para detección e identificación. Aunque estos métodos son confiablemente precisos, los procedimientos son de varios pasos que consumen tiempo (2-3 días) y las necesidades de personal calificado son desventajas importantes.

Técnicas modernas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), citometría de flujo y espectrometría de masas proporcionan una solución tecnológica para la detección temprana y sensible. Sin embargo, aparte de la instrumentación prohibitivamente costosa, estos requieren técnicos experimentados y reactivos costosos y, por lo tanto, no se usan ampliamente en la práctica clínica (Chandran Hema, Pinapeddavari , Krishnan, & Annamalai Senthil, 2016). Los biosensores con instrumentación accesible parecen ser una alternativa en este momento. Recientemente se han desarrollado inmunosensores (basados en la interacción específica antígeno-anticuerpo) para la detección selectiva de una bacteria (Chandran Hema, Pinapeddavari , Krishnan, & Annamalai Senthil, 2016). En este estudio

se propone el desarrollo de un biosensor óptico para la detección de la proteína PapG y anticuerpos Anti-PapG para la detección rápida, confiable y selectiva para esta bacteria invasiva. Logrando un tratamiento oportuno para erradicar la infección, prevenir daño renal y resolver los síntomas agudos. Ya que los análisis clínicos convencionales son tardados y generalmente no se puede realizar rutinariamente.

2.3 Objetivos de la investigación

2.3.1 Objetivo general

Establecer una metodología basada en un biosensor óptico para identificar proteína PapG y anticuerpo Anti-PapG en muestras biológicas.

2.3.2 Objetivos específicos

- ❖ Modificación química de superficies de sustratos (silicio) y su análisis por métodos espectroscópicos y microscópicos.
- ❖ Obtención de la proteína PapG recombinante.
- ❖ Obtención de anticuerpos policlonales Anti-PapG.
- ❖ Inmovilización de biomoléculas (proteína PapG y Anti-PapG) sobre los sustratos (vidrio y silicio) y análisis por métodos espectroscópicos y microscópicos.
- ❖ Detección de biomoléculas (proteína PapG y Anti-PapG) en muestras biológicas.

2.4 Hipótesis

La inmovilización de biomoléculas en sustratos silicio empleando una metodología basada en un biosensor óptico nos permitirá reconocer la proteína PapG y anticuerpo Anti-PapG en muestras biológicas.

Capítulo 3

Materiales y métodos

En este capítulo se describe el estudio experimental, el proceso, los materiales y las técnicas que se implementaron como estrategia para obtener el cumplimiento del objetivo general de este trabajo (Figura 12).

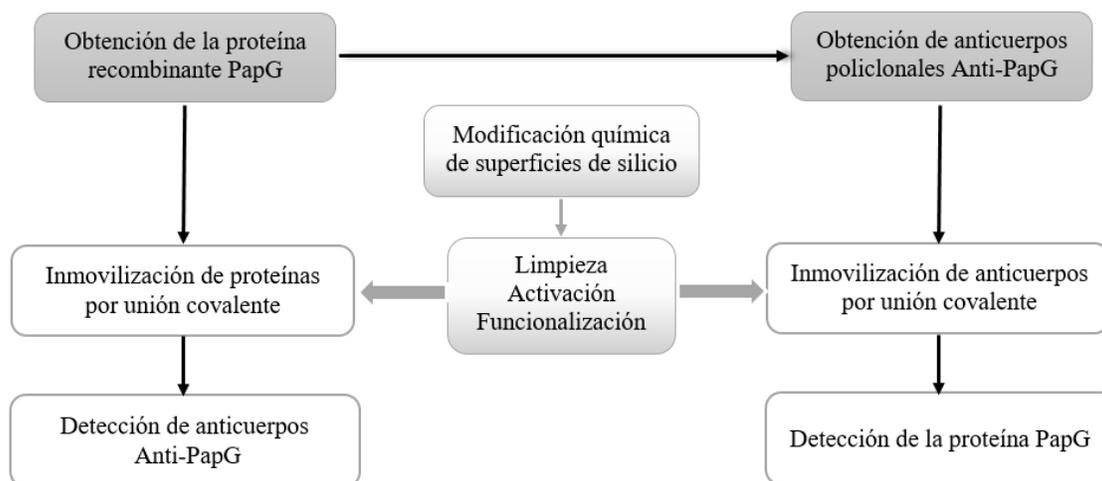


Figura 12 Diagrama general de trabajo.

3.1 Obtención de la proteína recombinante PapG

3.1.1 Clonación del gen en el vector de expresión pLATE31

El diseño de oligonucleótidos para el gen, fue generado manualmente siguiendo el protocolo de “aLICator LIC Cloning and Expression handbook” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y sintetizado por la casa comercial IDT Technologies (Coralville, Iowa, USA) (Tabla 2). La amplificación del gen fue generada a partir de “Polymerase Chain Reaction” (PCR, por sus siglas en inglés) usando la ADN polimerasa Pfu de Thermo Fisher Scientific. Las condiciones de amplificación y clonación fueron determinadas a partir de protocolos del sistema aLICator. El vector de expresión pLATE31 fue usado para la clonación del gen antes amplificado y se transformó por electroporación de la cepa de *E.coli* BL21 (DE3). Los genes en el vector de expresión fueron verificados por “next-generation sequencing” en un sistema NexSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA) en la Unidad de secuenciación del INMEGEN. Oligonucleótidos específicos de secuenciación

fueron obtenidos del “aLICator LIC Cloning and Expression Kit” y las secuencias resultantes fueron analizadas por BLAST (Luna Pineda , y otros, 2016).

Tabla 2 Oligonucleótidos usados en este estudio

	Secuencia (5'-3')	Aplicación
PapG F	AGAAGGAGATATAACTATGTCTCTGGGT AACGTAACTCTTACCAGGGTGGTAA	Amplificación y clonación de proteínas
PapG R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCGGCAGG ATCATCAGCAGGGTCGCAGAACCAG	Amplificación y clonación de proteínas

3.1.2 Expresión y purificación de las proteínas

La cepa de *E. coli* BL21 transformada con su respectivo vector de expresión pLATE31 fueron plaqueadas en agar Luria Bertani (LB; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) e incubadas por 16 h a 30°C. Las probables colonias transformantes fueron seleccionadas por el método de “colony-blotting” usando una anticuerpo anti-6XHis (C-Term) HRP (Abcam; Cambridge, MA, USA). La solubilidad fue realizada siguiendo los protocolos establecidos por el manual de “The QIAexpressionist” de Qiagen (Jacques-Schiesser-Str, Stockach, Germany). La expresión de las proteínas fue realizada en 500 mL de medio LB suplementado con 1mM IPTG e incubada por 5 h a 37°C. Posterior a la centrifugación a 5000 rpm por 10 min, el paquete celular fue resuspendido en amortiguador A (10mM K₂HPO₄, pH7.4, 150mM NaCl y 1mM etilendiaminotetra acético [EDTA]) suministrado con fenil-metil-sulfonil fluoridina (PMSF; Sigma-AldrichCorp., St.Louis, MO, USA), lisado por sonicación y ultracentrifugado a 20, 000 rpm por 20 min. El sobrenadante fue eliminado y el paquete resuspendido en amortiguador B (8M hidroxiclورو de guanidina, 100mM NaCl y 100mM K₂HPO₄, pH8). Posterior a tres días de incubación a temperatura ambiente, los lisados fueron ultracentrifugados a 30, 000 rpm. El sobrenadante fue incubado en una columna que contiene agarosa de ácido nitrilo triacetil-nickel (Qiagen) a 4°C por 1 h, lavada con amortiguador C (8.5M urea, 20mM Tris, pH7.5, 160mM NaCl y 20mM imidazol) y eluido con amortiguador D (0.1M C₆H₈O₇*H₂O y 0.1M C₆H₅O₇Na₃*2H₂O). Las proteínas colectadas fueron replegadas usando diálisis contra un gradiente de 7 a 1M de urea en

amortiguador E (25mM Tris, pH7.5, 100mM NaCl, 0.5mM EDTA y 3.3 Mm CHAPS); la incubación fue generada a 4°C por 24 h. Las proteínas replegadas fueron guardadas en amortiguador D a -70°C para su posterior uso (Luna Pineda , y otros, 2016).

3.1.3 Caracterización de la proteína

La proteína fue cuantificada siguiendo el protocolo del kit 2D-Quant (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Björkgatan, Uppsala, Sweden), separados por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS al 14% (SDS-PAGE), visualizado por tinción de Coomassie (Luna Pineda , y otros, 2016). Se realizó la caracterización de la proteína mediante espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier. Finalmente se realizó una comparación de la estructura secundaria mediante la base de datos PROTEIN DATA BANK RCSB PDB (<http://www.rcsb.org>).

3.2 Obtención de Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales presentan una mayor afinidad contra el antígeno debido al reconocimiento de múltiples epítomos, poseen una alta sensibilidad para detectar proteínas que se encuentran en bajas concentraciones, su coste es bajo y son relativamente rápidos de producir (+/- 3 meses). Los anticuerpos monoclonales presentan una alta especificidad para un solo epítomo, son más sensibles en los ensayos que requieren la cuantificación de los niveles de proteína, se requiere más tiempo para producir y desarrollar el clon hibridado (+/- 6 meses) son utilizados para el desarrollo de fármacos terapéuticos que requieren grandes volúmenes de anticuerpos idénticos específicos para un solo epítomo. En este estudio se obtuvieron anticuerpos policlonales puesto que para aplicaciones de investigación general, las ventajas de los anticuerpos policlonales generalmente superan las pocas ventajas que proporcionan los anticuerpos monoclonales. La obtención de anticuerpos fue generada en un Conejo *New Zeland* de 3 meses de edad. Inicialmente, el conejo fue inmunizado vía subcutánea con 200 µg de la proteína PapG (día 0) que contenía adyuvante completo de Freund en una concentración según fabricante. Posteriormente, el conejo fue inmunizado tres veces (días 14, 28 y 37) con 100 µg de cada proteína en adyuvante incompleto de Freund. Se tomó una muestra de sangre el día 0 (suero preinmune) y el día 28 para determinar los niveles de anticuerpos contra PapG. En el día 40 el conejo fue sacrificado y la sangre fue obtenida por punción cardiaca. La sangre

obtenida fue centrifugada a 8000 rpm durante 5 min y se separó el suero para su resguardo a -70°C hasta su uso. El suero fue absorbido usando una cepa de UPEC que no contenía el gen *PapG*. La expresión del gen *PapG* fue confirmada por RT-PCR. Adicionalmente, los sueros fueron titulados por ELISA usando una dilución de 1:100 contra la proteína específica (Luna Pineda , y otros, 2016).

3.3 Modificación química de superficies

La modificación química de los soportes de silicio (Figura 13) se realizó mediante el método de monocapas autoensambladas (SAMs) en medio acuoso, para el cual se utilizaron soportes de silicio cristalino tipo P/Boro orientación $\langle 100 \rangle$ de 0.5 cm^2 (Pure wafer). Inicialmente los soportes fueron limpiados con acetona (Química Meyer), posteriormente en metanol (Química Meyer) y finalmente en agua desionizada por 10 minutos cada uno. Después se llevaron a un horno de secado a 100°C por 30 minutos para eliminar los restos de los disolventes utilizados en los lavados. Para la activación de la superficie los soportes previamente limpios fueron sumergidos en una solución de ácido sulfúrico (Química Meyer) y peróxido de hidrogeno (Química Meyer) a una concentración 3:1 por 30 minutos al finalizar este tiempo fueron lavados con agua desionizada hasta eliminar los restos de la solución. Por último, se llevaron a un horno de secado a 100°C por 1 hora. Para generar grupos amino en la superficie los soportes previamente activados fueron sumergidos en una solución de acetona con 3-Aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) de sigma aldrich al 5% (v/v) por 45 minutos, a continuación, fueron lavados con agua desionizada y alcohol etílico (Química Meyer) por 10 minutos cada uno. Se secaron con flujo de nitrógeno y finalmente se colocaron en un horno de secado a 100°C por 90 minutos.

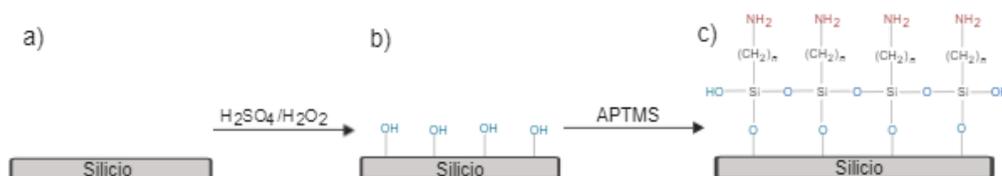


Figura 13 Modificación química de la superficie a) limpieza, b) activación y c) funcionalización del soporte de silicio.

3.4 Inmovilización de las biomoléculas sobre el soporte de silicio

En este apartado se describe la metodología utilizada para la inmovilización del elemento de reconocimiento (biomoléculas) en los soportes de silicio. Cabe destacar que se desarrollaron dos biosensores uno que corresponde a la inmovilización de la proteína recombinante PapG y otro correspondiente a la inmovilización de los anticuerpos anti-PapG.

3.4.1 Inmovilización de la proteína recombinante PapG

La inmovilización de la proteína recombinante PapG se realizó mediante adsorción en fase líquida para la cual se preparó una solución de proteína a una concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en buffer de citratos, los sustratos previamente modificados se colocaron en dicha solución durante 24 horas a 4°C, transcurrido ese tiempo los sustratos se lavaron y se almacenaron en buffer de citratos a 4°C para su análisis y continuar con la siguiente etapa del proceso (Figura 14).

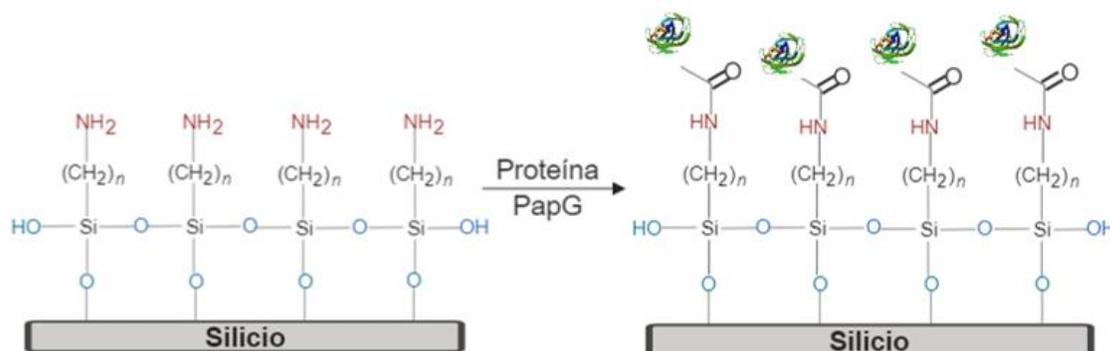


Figura 14 Inmovilización de la proteína PapG mediante la unión covalente del grupo carboxilo de la proteína con el grupo amino de la superficie modificada químicamente, formando un enlace amida.

3.4.2 Inmovilización de anticuerpos policlonales

La inmovilización de anticuerpos (Figura 15) se realizó mediante adsorción en fase líquida mediante unión covalente para lo cual se preparó una solución de anticuerpos anti-PapG (0.01 $\mu\text{g}/\text{m}\mu$) en buffer de ácido 4- (2-hidroxietyl) -1-piperazineetanosulfónico (HEPES) con EDC (8 mg) y NHS (22 mg), se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, esto condujo a la activación de grupos carboxilo en anticuerpos anti-PapG. Transcurrido ese tiempo se colocaron los soportes previamente modificados químicamente

por 1 hora a 300 rpm, después se lavaron y se almacenaron en buffer HEPES a 4°C para su análisis y la siguiente etapa del proceso.

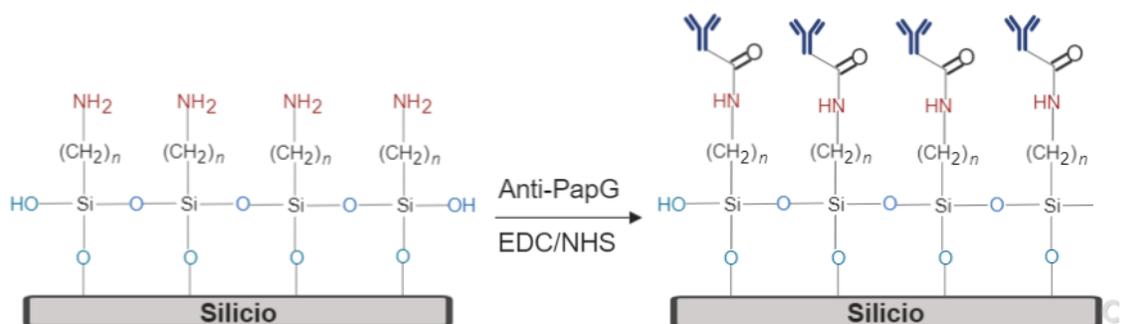


Figura 15 Inmovilización de anticuerpos policlonales anti-PapG mediante la unión covalente del grupo carboxilo del anticuerpo con el grupo amino de la superficie modificada químicamente formando un enlace amida.

3.5 Detección de biomoléculas

En este apartado se describe la metodología utilizada para la detección de nuestro analito que para el biosensor donde se inmovilizo la proteína PapG como elemento de reconocimiento el analito a detectar serán los anticuerpos anti-PapG y en el biosensor donde se inmovilizaron los anticuerpos anti-PapG como elemento de reconocimiento, el analito a detectar será la proteína PapG.

3.5.1 Detección de anticuerpos anti-PapG

Se colocaron los soportes con la proteína previamente inmovilizada en una solución de anticuerpos al 0.01 µg/µl con buffer de fosfatos a 37°C en agitación (300 rpm) por 1 hora (figura 16). Transcurrido este tiempo se realizó un lavado y se almaceno en buffer de fosfatos hasta su análisis.

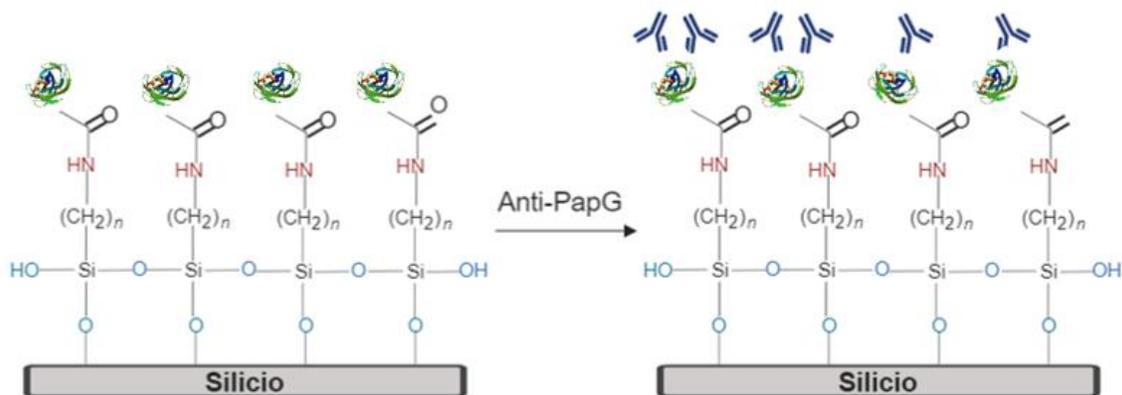


Figura 16 Detección de anticuerpos anti-PapG mediante la interacción del antígeno (epítipo) - anticuerpo (parátipo).

3.5.2 Detección de proteína PapG

En detección de la proteína PapG (Figura 17) se colocaron los soportes con anticuerpos previamente inmovilizados en una solución de proteína al $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en buffer de fosfatos a 37°C en agitación (300 rpm) por 1 hora. Transcurrido este tiempo se realizó un lavado y se almaceno en buffer de fosfatos hasta su análisis.

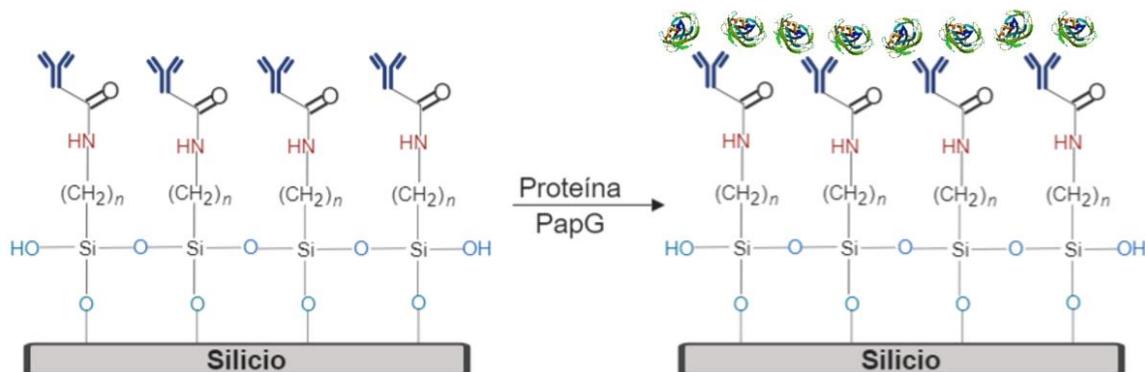


Figura 17 Detección de la proteína recombinante PapG mediante la interacción del antígeno (epítipo) - anticuerpo (parátipo).

3.6 Detección de biomoléculas en muestra de orina

La detección de biomoléculas en muestra de orina mediante FTIR se usó una muestra de orina de un paciente sano, con la finalidad de descartar falsos positivos o negativos en los resultados que se pueden obtener debido a los diferentes elementos que componen la muestra de orina.

3.6.1 Detección de anticuerpos anti-PapG en muestra de orina

Se colocaron los soportes con la proteína previamente inmovilizada en una en una muestra de orina con anticuerpos al 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 37°C en agitación (300 rpm) por 1 hora. Transcurrido este tiempo se realizó un lavado con buffer de fosfatos, posteriormente se secaron con flujo de nitrógeno y se continuó a su medición en FTIR.

3.6.2 Detección de la proteína recombinante PapG en muestra de orina

Se colocaron los soportes con los anticuerpos previamente inmovilizados en una en una muestra de orina con la proteína PapG al 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 37°C en agitación (300 rpm) por 1 hora (figura 16). Transcurrido este tiempo se realizó un lavado con buffer de fosfatos, posteriormente se secaron con flujo de nitrógeno y se continuó a su medición en FTIR.

Capítulo 4

Resultados y discusión

En este apartado se explicarán de manera detallada los resultados que se obtuvieron durante el desarrollo experimental para lograr el objetivo planteado.

4.1 Obtención de la proteína recombinante PapG

4.1.1 Caracterización de la proteína

La proteína separada por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS al 14% (SDS-PAGE), visualizado por tinción de Coomassie mostró una banda de 33.9 kDa, la cual corresponden a la proteína PapG como se puede observar en la Figura 18.

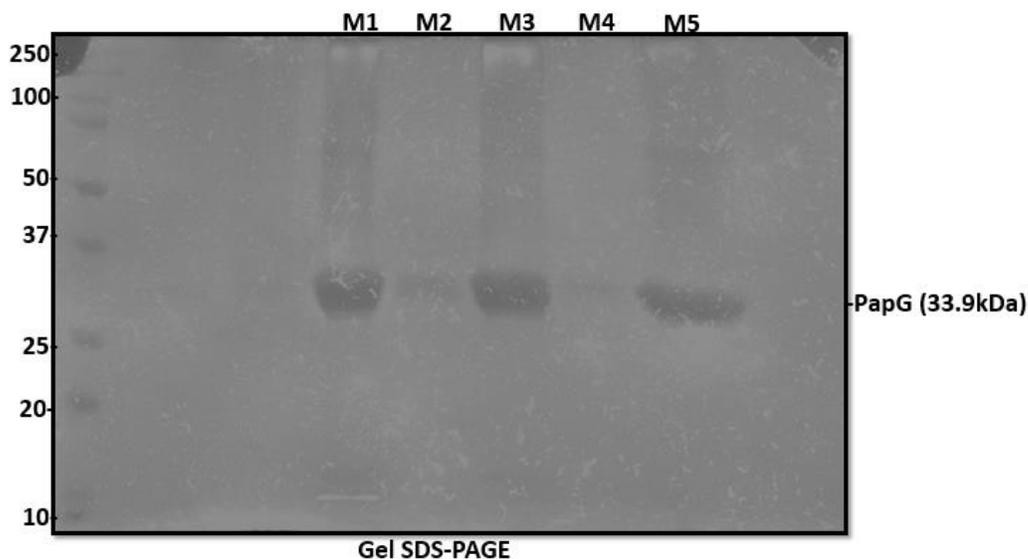


Figura 18 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la proteína recombinante PapG.

4.1.2 Cuantificación de la proteína PapG

La proteína fue cuantificada siguiendo el protocolo del kit 2D-Quant (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Björkgatan, Uppsala, Sweden) de los cuales se obtuvieron aproximaciones de las concentraciones de la proteína de los cuales fueron PapG 1 = 0.2652 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y PapG 2 = 0.418 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, obteniendo una R^2 de 0.979 usando una solución estándar de 2 mg / ml de BSA para la curva estándar (Figura 19).

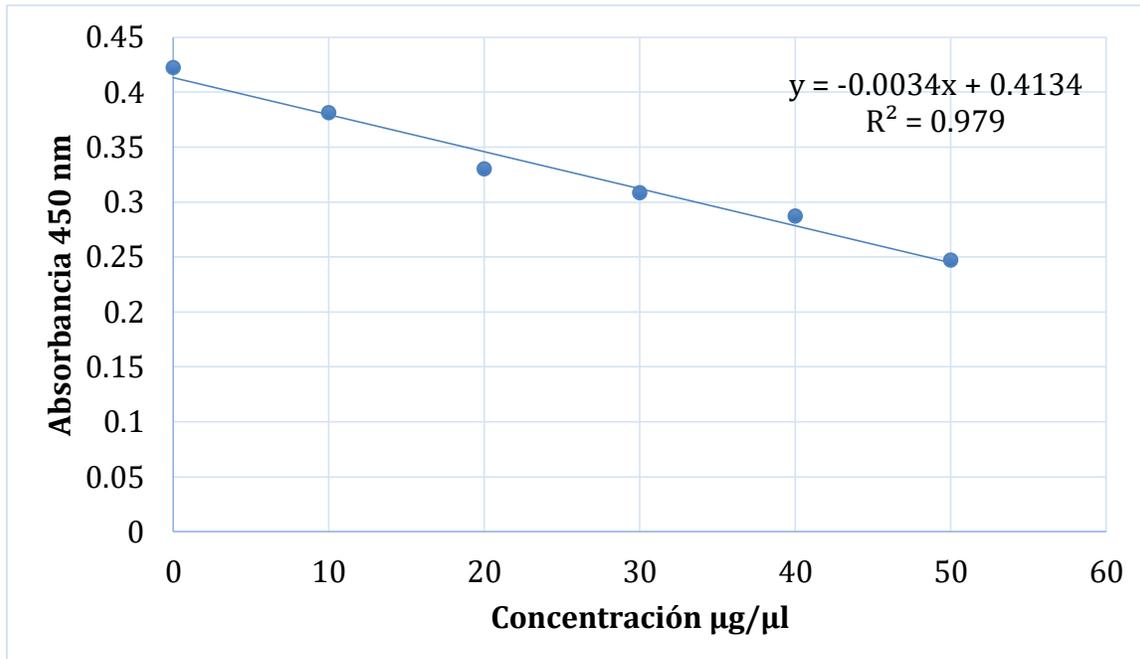


Figura 19 Curva de calibración para la cuantificación de la proteína recombinante PapG

4.1.3 Caracterización de la proteína PapG mediante espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier.

La proteína recombinante PapG se analizó mediante FTIR en modo de reflectancia total atenuada (ATR), esto con la finalidad de conocer su composición química. En el espectro se observaron bandas características de las proteínas correspondientes a los modos vibracionales de flexión de enlace de N-H de la Amida II en 1571 cm^{-1} , un hombro de la amida I en 1660 cm^{-1} de los modos vibracionales de tensión de enlace C=O, una banda correspondiente a los modos vibracionales de extensión del C-N y de flexión del N-H de la Amida III en $1229\text{-}1301\text{ cm}^{-1}$, los modos vibracionales de flexión del O-C-N de la amida IV en $625\text{-}767\text{ cm}^{-1}$, los modos vibracionales de flexión en el plano del N-H de la amida V en $640\text{-}800\text{ cm}^{-1}$, los modos de flexión en el plano C=O en $537\text{-}606\text{ cm}^{-1}$ de la amida VI, los modos vibracionales de los enlaces C-H en $1300\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$, una banda en 1730 cm^{-1} correspondientes a los modos vibracionales de tensión de enlace del C=O y los modos

vibracionales de los enlaces S-H en $810-920\text{ cm}^{-1}$ tal como se muestra en la Figura 20 (Barraza *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2007; Haris *et al.*, 1999).

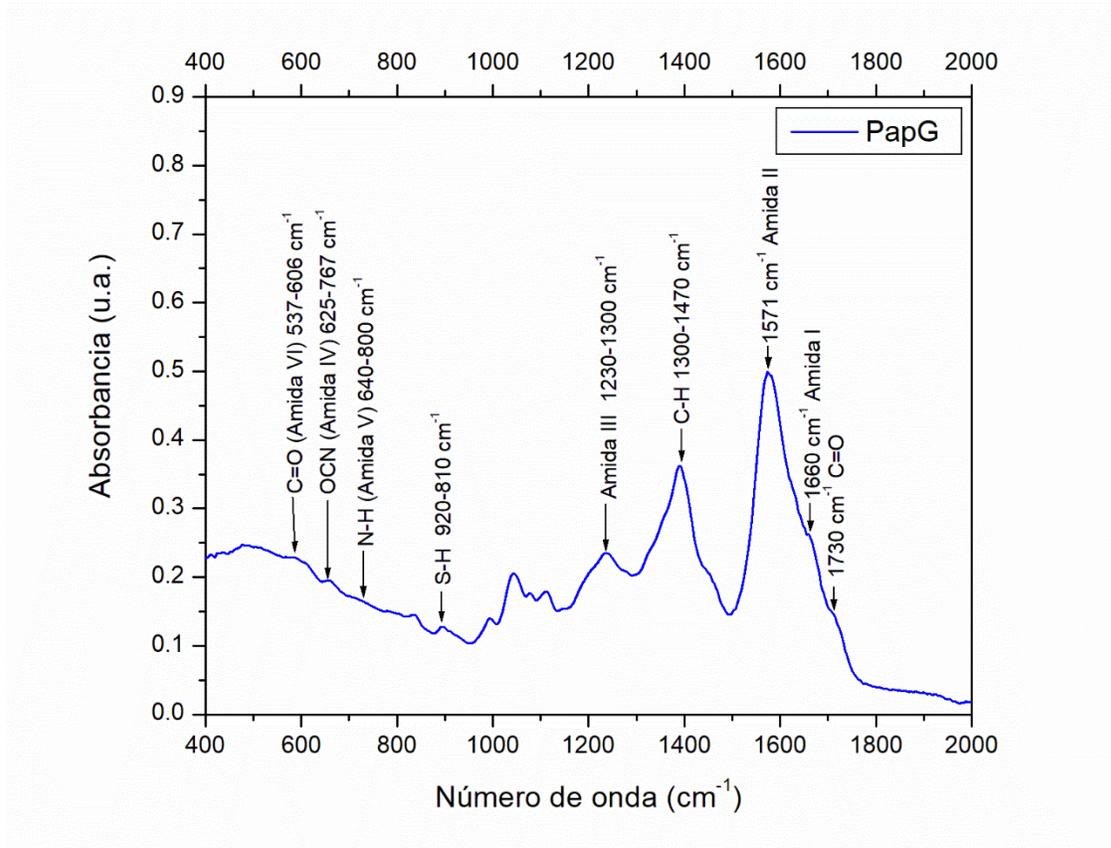


Figura 20 Espectro en FTIR de 400 a 4000 cm^{-1} de la proteína recombinante PapG

4.1.3.1 Segunda derivada del espectro FTIR de la proteína recombinante PapG en la región de la Amida I

Subsecuentemente, se obtuvo la segunda derivada de los espectros FTIR de la proteína PapG en la región de la amida I de proteínas ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$). Esto para obtener un análisis de la estructura secundaria de la proteína puesto que la región de las proteínas amida I es la región más sensible, ya que representa el 80 % de las vibraciones del enlace C-O; consiste en el sobre-posicionamiento de diversas bandas que corresponden a la estructura secundaria, como α -helices, hojas β , giros β y estructura desordenada. En la Figura 21 correspondiente a la región amida I de proteínas, se observan bandas relacionadas con los componentes de la estructura secundaria de proteínas como giros β

(1676 cm^{-1}), 3₁₀ hélices (1663 cm^{-1}) (Ioannou, Donald, & Tromp, 2015; Andreas , 2007), láminas β (1634 cm^{-1}), hojas β (1608 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} y 1693 cm^{-1}), (Ioannou, Donald, & Tromp, 2015) los cuales son específicos y sensibles a cambios estructurales y conformacionales de las proteínas (Parvez I. H., 2013; Jilie & Shaoning, 2007) .

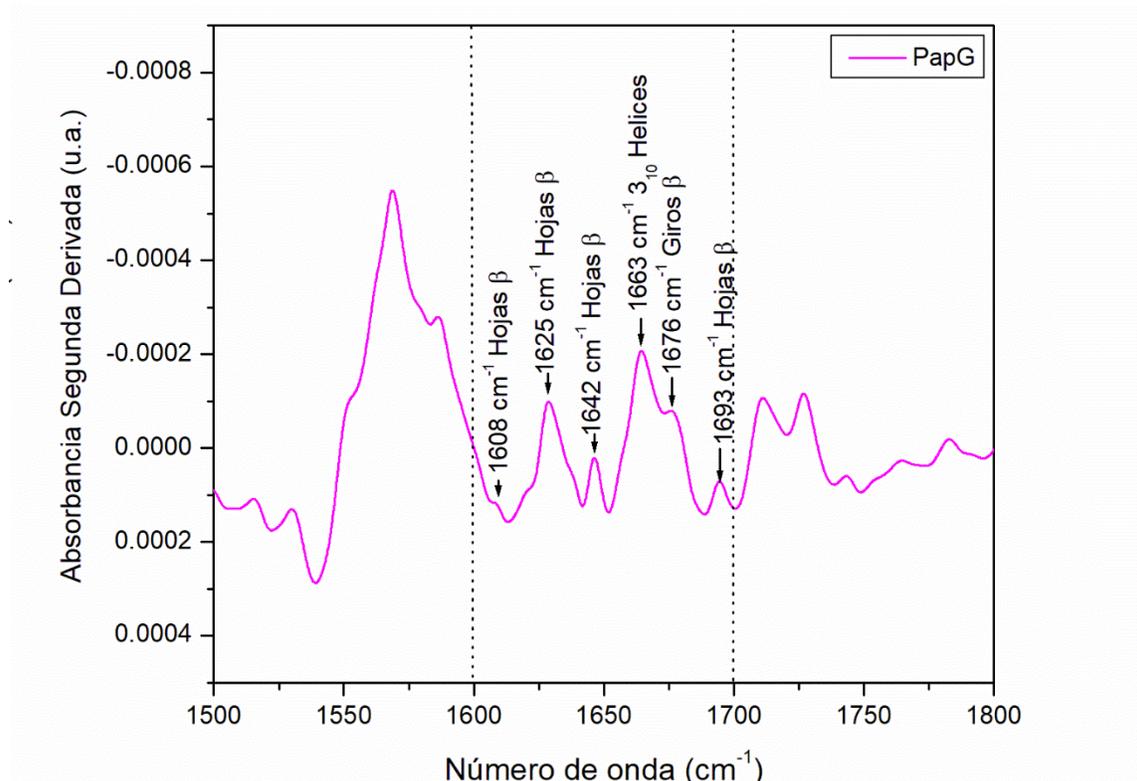


Figura 21 Segunda derivada del espectro FTIR de la proteína recombinante PapG en la región de la Amida I de proteínas.

4.2 Obtención de anticuerpos policlonales anti-PapG

4.2.1 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Después de obtener el suero sanguíneo y ser absorbido se realizó el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto, mediante el cual se analizó el suero pre-inmune (SP), el suero post-inmune (SPO) y el blanco. Para SP y SPO utilizamos una dilución de 1:1000 de los cuales obtuvimos las siguientes absorbancias SP-PapG1 0.352, SP-PapG2 de 0.352, SPO-PapG1 1.73, SPO-PapG2 1.68, blanco-PapG1 0.157 y blanco-PapG2 0.154. En base a los datos obtenidos se confirma la presencia de anticuerpos anti-

PapG, se debe mencionar que este estudio se realizó exclusivamente para corroborar la existencia de anticuerpos (Figura 22).

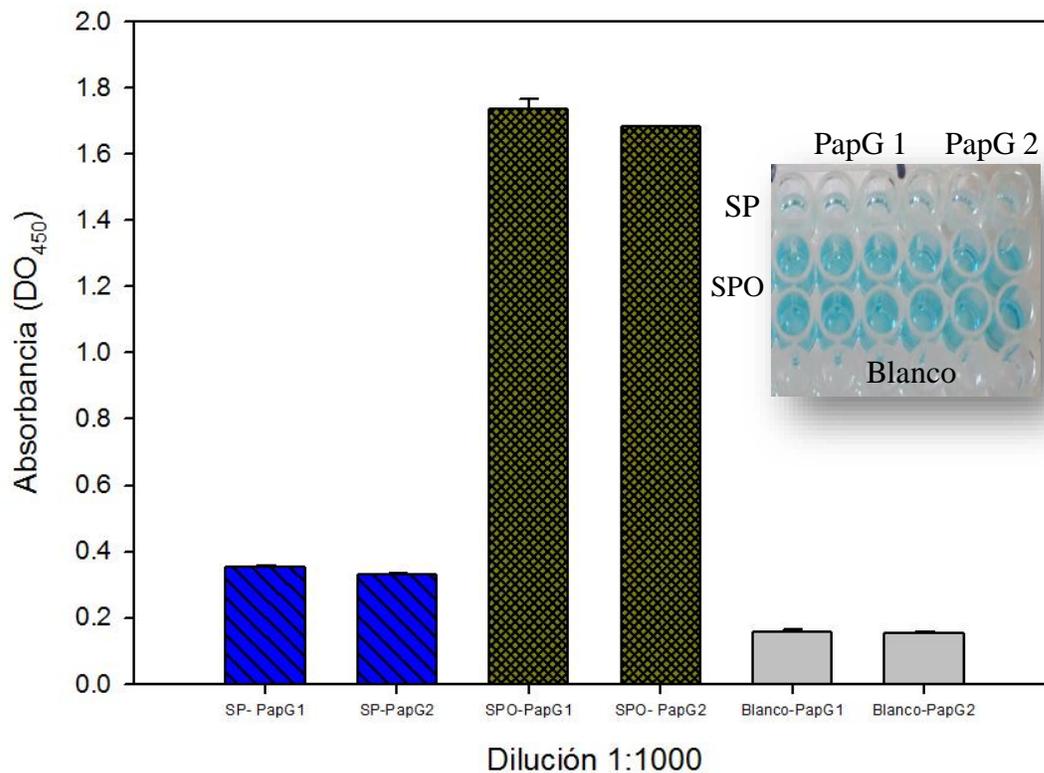


Figura 22 Absorbancias obtenidas del Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto.

4.2.2 Prueba de Western Blot para la detección de anticuerpos

En esta técnica analítica se tomó un gel de poliacrilamida con SDS que incluía la proteína, la cual fue transferida en una membrana de nitrocelulosa para permitirnos reconocer los anticuerpos, por el antígeno que se absorbe en la membrana. La unión antígeno-anticuerpo se detectó mediante la adición de un anticuerpo secundario IgG de cabra que reconoció la fracción constante de la inmunoglobulina de conejo, el cual está acoplado a la enzima peroxidasa de rábano. La unión se reveló con la adición de un sustrato-cromogénico soluble el cual se precipitó en el sitio en donde se encuentra el complejo antígeno-anticuerpo evidenciándose en forma de bandas coloreadas como se observa en la Figura 23.



Figura 23 Patrón de reactividad de la prueba de Western Blot para la detección de anticuerpos en el suero sanguíneo del conejo.

4.2.3 Cuantificación de anticuerpos policlonales anti-PapG

La concentración de anticuerpos se determinó por el método de Bradford, la muestra se aplicó en celdas, a la dilución establecida. Inmediatamente se añadió el reactivo de Coomassie y se incubó a temperatura ambiente, durante 10 minutos, para que ocurriera la unión de este con los anticuerpos. Luego, se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. La concentración de anticuerpos se calibró contra albúmina de suero bovino, usada como material de referencia. El coeficiente de regresión (r^2) de la curva de calibración fue de 0.98 (Figura 24), obteniendo una concentración de anticuerpos de 2.6561mg/ml.

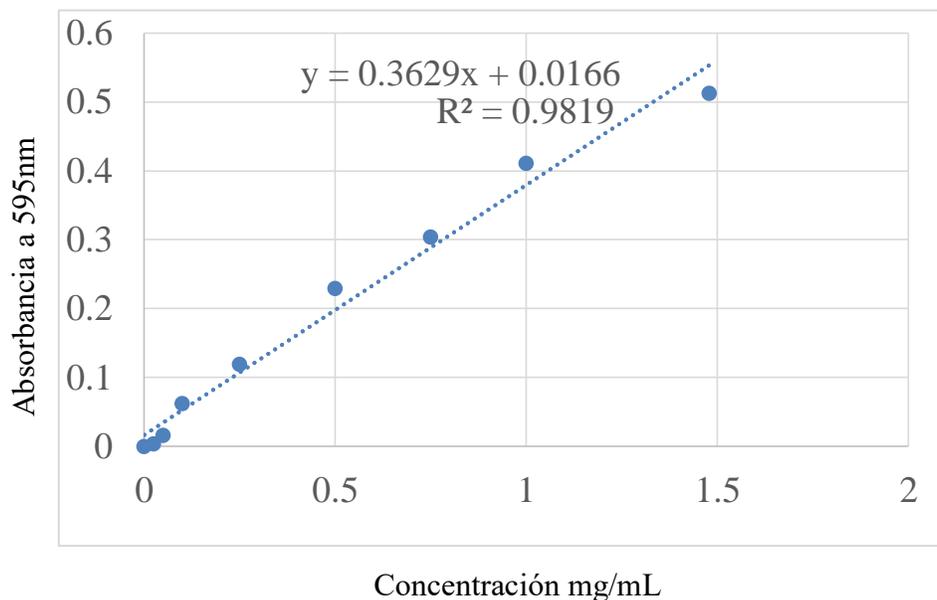


Figura 24 Curva de calibración para la determinación de concentración de anticuerpos anti-PapG

4.2.4 Caracterización de anticuerpos policlonales por espectroscopia FTIR

Los anticuerpos policlonales anti-PapG se analizaron por espectroscopia FTIR con la finalidad de conocer su composición química (Figura 25). El espectro nos mostró bandas de los modos de vibracionales de tensión de enlace C=O de la amida I en 1630-1695 cm^{-1} y una banda de la amida II en 1549-1503 cm^{-1} correspondiente a los modos vibracionales de extensión de C-N (Boulet, Kazarian , & Byrne , 2016; Boulet, Byrne , & Kazarian , 2014) Los modos de vibración de deformación de los enlaces C-H en 1332 cm^{-1} , los modos de vibración de aleteo del enlace CH_2 en 1301 cm^{-1} , la banda en 1388 cm^{-1} de los enlaces CH_3 de los modos vibracionales de deformación simétricos y la banda en 1439 cm^{-1} de los enlaces de CH_3 de los modos vibracionales de deformación asimétricos; todos estos correspondientes a los modos de vibración de la cadena lateral del anticuerpo (Boulet Audet, Byme, & G. Kazarian, 2014).

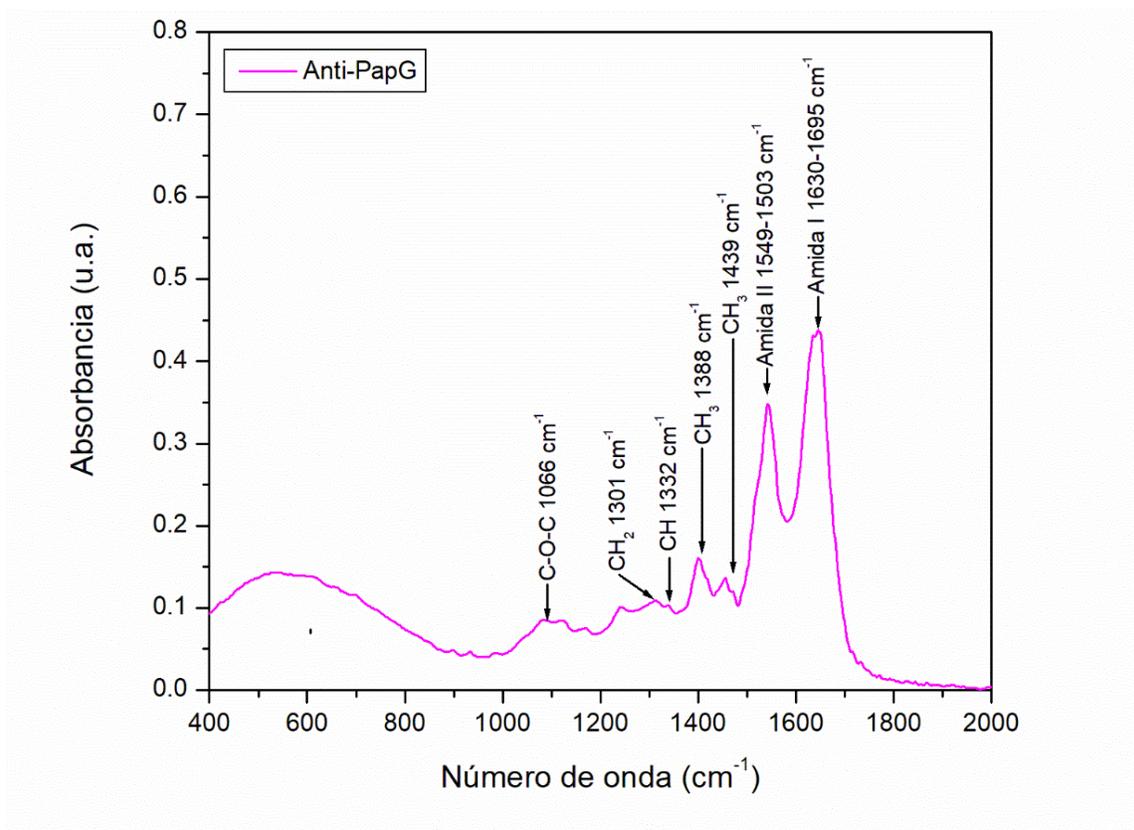


Figura 25 Espectro FTIR de 400 a 4000 cm^{-1} del anti-PapG

4.2.4.1 Segunda derivada del espectro FTIR de los anticuerpos anti-PapG en la región de la Amida I

Subsecuentemente, se obtuvo la segunda derivada de los espectros FTIR de los anticuerpos anti-PapG en la región de la amida I de proteínas ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$). En la Figura 26 podemos observar una banda relacionada con los componentes de la estructura secundaria de proteínas como hojas β en 1631 cm^{-1} , así como la banda en 1682 cm^{-1} de los giros β y una banda en 1653 cm^{-1} correspondiente a las hélices α (Schüle, FrieB, Bechtold-Peters, & Patrick, 2007; Boulet Audet, Byrne, & G. Kazarian, 2014; Boulet Audet, Kazarian, & Byrne, 2016).

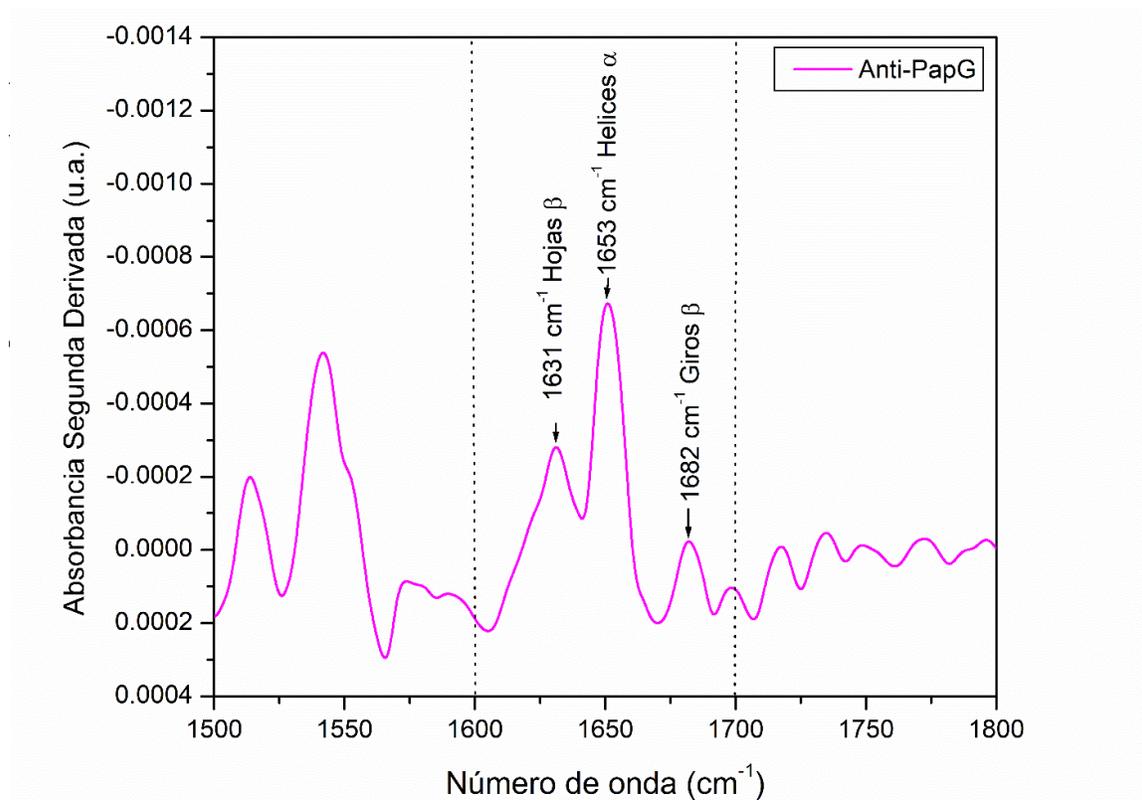


Figura 26 Segunda derivada del espectro FTIR de los anticuerpos Anti-PapG en la región de la Amida I de proteínas.

4.3 Modificación química de superficies

El espectro de infrarrojo con transformada de Fourier se registró antes y después de la funcionalización del silicio lo que permitió monitorear la formación de los enlaces generados. En la Figura 27 se muestra el espectro de IR tomado desde 400-2000 cm^{-1} , en él se observan bandas en 1068 y 1100 cm^{-1} que corresponden al modo óptico transversal (TO) que indican la formación del enlace covalente en los grupos silanol (OH) del APTMS, y al modo óptico longitudinal (LO) de los enlaces Si-O-Si que corresponde a la formación de enlaces siloxano entre los grupos silanol del APTMS, respectivamente; estas bandas se generan debido al proceso de oxidación térmica (Herrera Celis, Reyes Betanzo, Itzmoyotl Toxqui, Orduña Díaz, & Pérez Coyotl, 2015; Soberanis Monforte, Gordillo Rubio, & González Chi, 2015; Balderas Valadez & Agarwal, 2017). En 1024 cm^{-1} una banda correspondiente a los modos vibracionales de tensión de los enlaces Si-O (Mejia, Bolaños, & Rodríguez, 2012). Una banda en 1466 de los modos vibracionales de deformación de los enlaces C-H (Soberanis Monforte, Gordillo Rubio, & González Chi, 2015). La banda en 805 cm^{-1} es asignada a los modos vibracionales de doblamiento de los enlaces Si-O (Balderas Valadez & Agarwal, 2017). Una banda en 889 cm^{-1} correspondiente a los modos vibracionales de deformación de los enlaces Si-H₂ (Li, Wu, Li, Jiang, & Liao, 2008). Se observa una banda en 1410 cm^{-1} de los modos vibracionales de deformación de los enlaces CH₂ (Balderas Valadez & Agarwal, 2017). Una banda en 503 cm^{-1} que corresponde al modo de vibración de balanceo de los enlaces de Si-O (Morales Acevedo & Pérez Sánchez, 2003). Una banda en 665 cm^{-1} correspondiente al modo vibracional de flexión de los enlaces Si-H₂ (Rivera, Torres, & Pisso, 2002). La banda en 612 cm^{-1} correspondiente a los modos vibracionales de estiramiento de los enlaces Si-Si (Herrera Celis, Reyes Betanzo, Itzmoyotl Toxqui, Orduña Díaz, & Pérez Coyotl, 2015). La amina primaria en 1590 cm^{-1} debida a los modos vibracionales de extensión de los enlaces N-H (Majoul, Aouida, & Bessaïs, 2015). Una banda en 1450 cm^{-1} correspondiente a los modos vibracionales de estiramiento asimétrico de los enlaces CH₃ (Davies & Ghabbour, 1999).

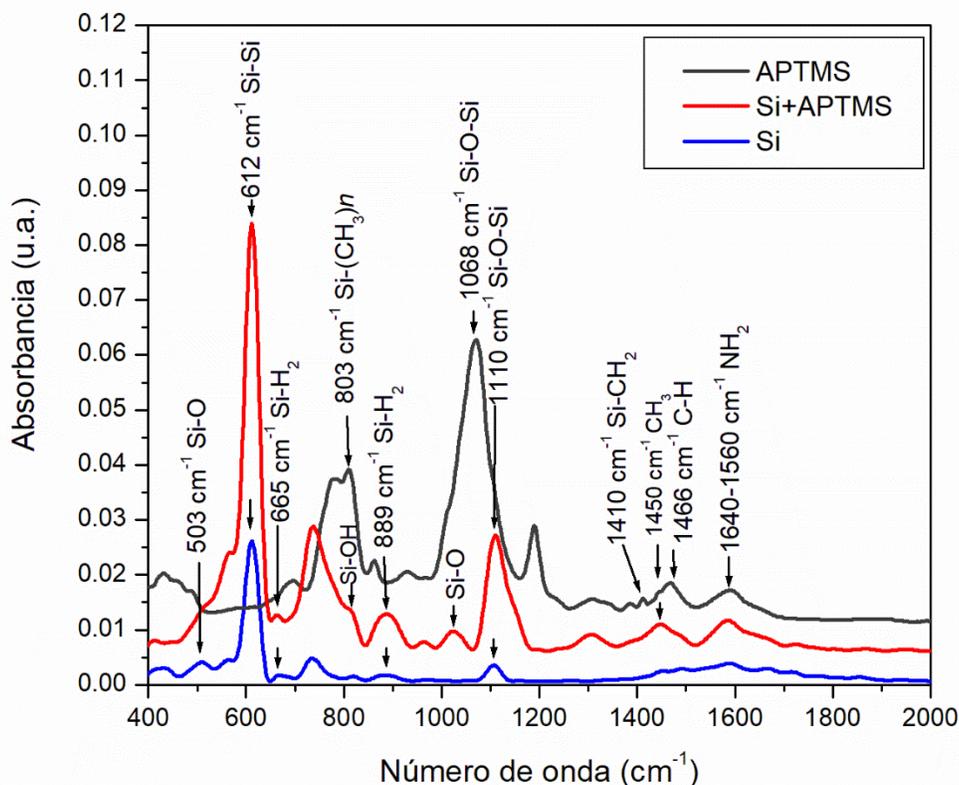


Figura 27 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} de la modificación química de la superficie de silicio: silicio (azul), silicio funcionalizado (rojo) y APTMS puro (negro).

4.4 Inmovilización de biomoléculas

4.4.1 Inmovilización de la proteína PapG

El espectro de infrarrojo se registró antes y después de la inmovilización de la proteína en los soportes de silicio así como el espectro de infrarrojo de la proteína PapG sin ningún tratamiento. En la Figura 28 podemos observar bandas correspondientes a la funcionalización del soporte de silicio, así como las bandas que nos indican la inmovilización de la proteína que a continuación se describen. Una banda en 1040 cm^{-1} correspondiente a los modos vibracionales de tensión de enlace de C-H (Barraza Garza, y otros, 2013). Una banda en 1230 cm^{-1} correspondiente a los modos vibracionales de extensión del C-N y de flexión del N-H de la Amida III (Barraza Garza, y otros, 2013; Kong & Yu, 2007). Una banda en 1571 cm^{-1} de los modos vibracionales de flexión de

enlace de N-H de la Amida II (Haris & Severcan, 1999; Miller, Bourassa, & Smith, 2013; Barth, 2007) y una banda en 1660 cm^{-1} correspondientes a los modos vibracionales de tensión de enlace de los grupos C=O de la Amida I y una banda en 1730 cm^{-1} correspondientes a los modos vibracionales de tensión de enlace del C=O (Barth, 2007; Kong & Yu, 2007).

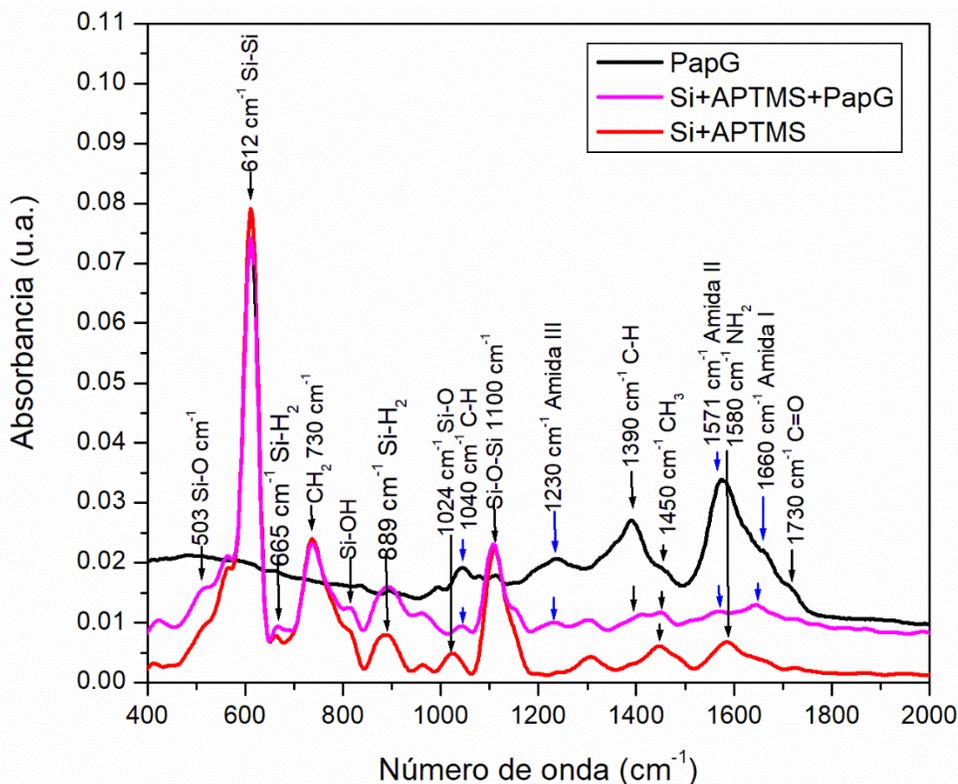


Figura 28 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} de la inmovilización de la proteína PapG, silicio funcionalizado (rojo), inmovilización de la proteína PapG en el soporte de silicio funcionalizado (rosa) y proteína PapG sin ningún tratamiento (negro).

4.4.2 Inmovilización de anticuerpos anti-PapG

El espectro de infrarrojo se registró antes y después de la inmovilización de los anticuerpos Anti-PapG así como el espectro de infrarrojo de los anticuerpos Anti-PapG sin ningún tratamiento. En la Figura 29 se observan bandas correspondientes a la funcionalización del soporte de silicio y bandas correspondientes a la inmovilización de los anticuerpos Anti-PapG que a continuación se describen. Una banda en 1540 cm^{-1}

correspondiente a los modos vibracionales de tensión de C-N y de deformación de N-H de la Amida II. La banda en 1640 cm^{-1} correspondientes a la amida I de los modos vibracionales de estiramiento (Kong & Yu, 2007; Barraza Garza, y otros, 2013).

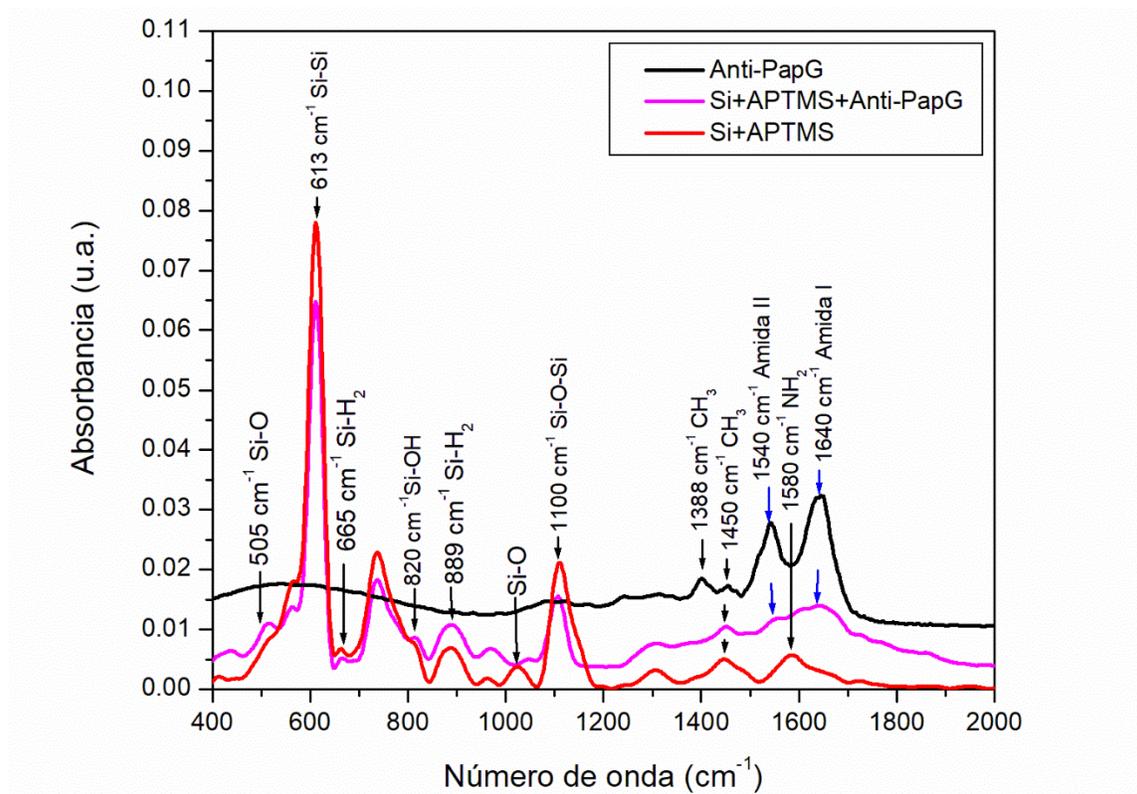


Figura 29 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} de la inmovilización de los anticuerpos anti-PapG, silicio funcionalizado (rojo), inmovilización de los anticuerpos anti-PapG en el soporte de silicio modificado previamente (rosa) y anticuerpos anti-PapG sin ningún tratamiento (negro).

4.5 Detección de biomoléculas

En este estudio se comparó el espectro de la proteína y el espectro del anticuerpo, puesto que la información estructural sobre los complejos de proteína-proteína no se puede abatir fácilmente, esto para determinar bandas específicas de cada biomolécula y lograr detectarlas. En la Figura 30 podemos observar bandas correspondientes a los anticuerpos y a la proteína, cabe señalar que la posición de cada banda se debe a los diferentes modos vibracionales de cada grupo funcional y que las diferentes estructuras químicas (moléculas) producen diferentes huellas espectrales, como se puede observar en el espectro de la

proteína recombinante y de los anticuerpos, una variación en la posición de las bandas de la amida I y la amida II.

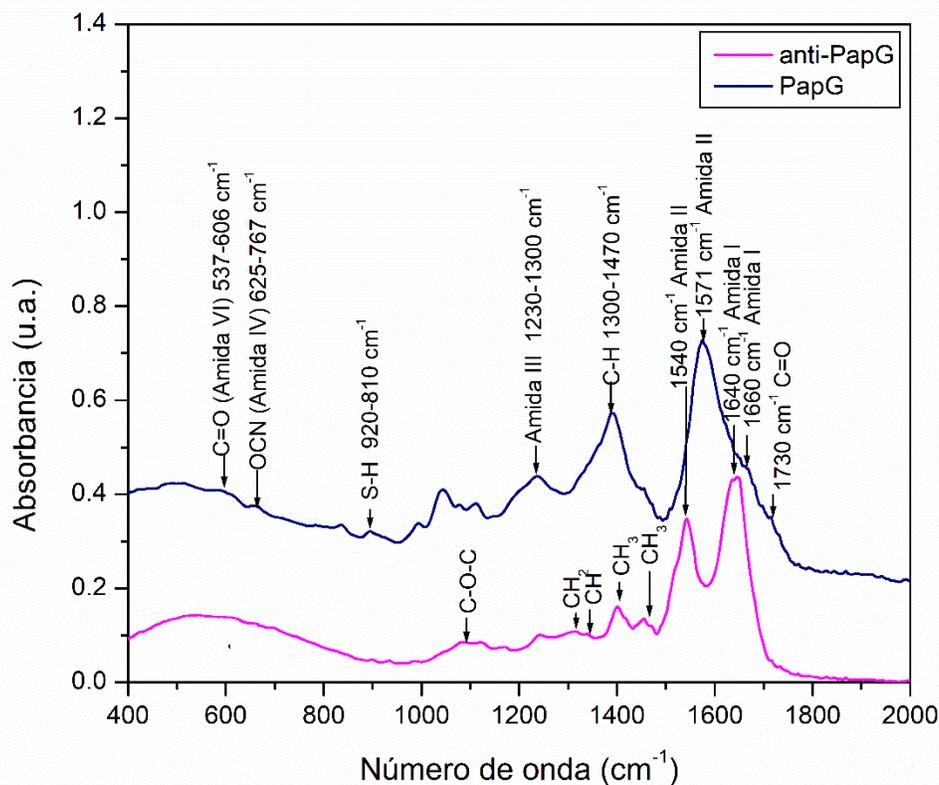


Figura 30 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} de los anticuerpos anti-PapG (rosa) y de la proteína recombinante PapG (azul).

4.5.1 Análisis de la detección de anticuerpos anti-PapG por FTIR

El espectro de infrarrojo se registró antes y después de la detección de los anticuerpos así como los anticuerpos sin ningún tratamiento. En la Figura 31 se pueden observar bandas correspondientes al soporte de silicio y bandas correspondientes a la inmovilización de la proteína. Referente a la detección de anticuerpos podemos destacar la presencia de la banda en 1571 cm^{-1} de la Amida II de los modos vibracionales de tensión de C-N y de deformación de N-H (Barraza Garza, y otros, 2013; Haris & Severcan, 1999; Kong & Yu, 2007). La banda en 1540 cm^{-1} de la amida II correspondiente a la presencia

de los anticuerpos (Boulet Audet, Byrne, & G. Kazarian, 2014; Boulet Audet, Kazarian, & Byrne, 2016), el corrimiento de esta banda surge principalmente de la interacción que existe entre nuestro elemento de reconocimiento (proteína) y el analito a detectar (anticuerpo) principalmente a los puentes de hidrogeno puesto que se ha reportado que esta banda es particularmente útil para monitorear el intercambio de hidrógeno-deuterio y los cambios en el enlace de hidrógeno (Parvez I. , 2013).

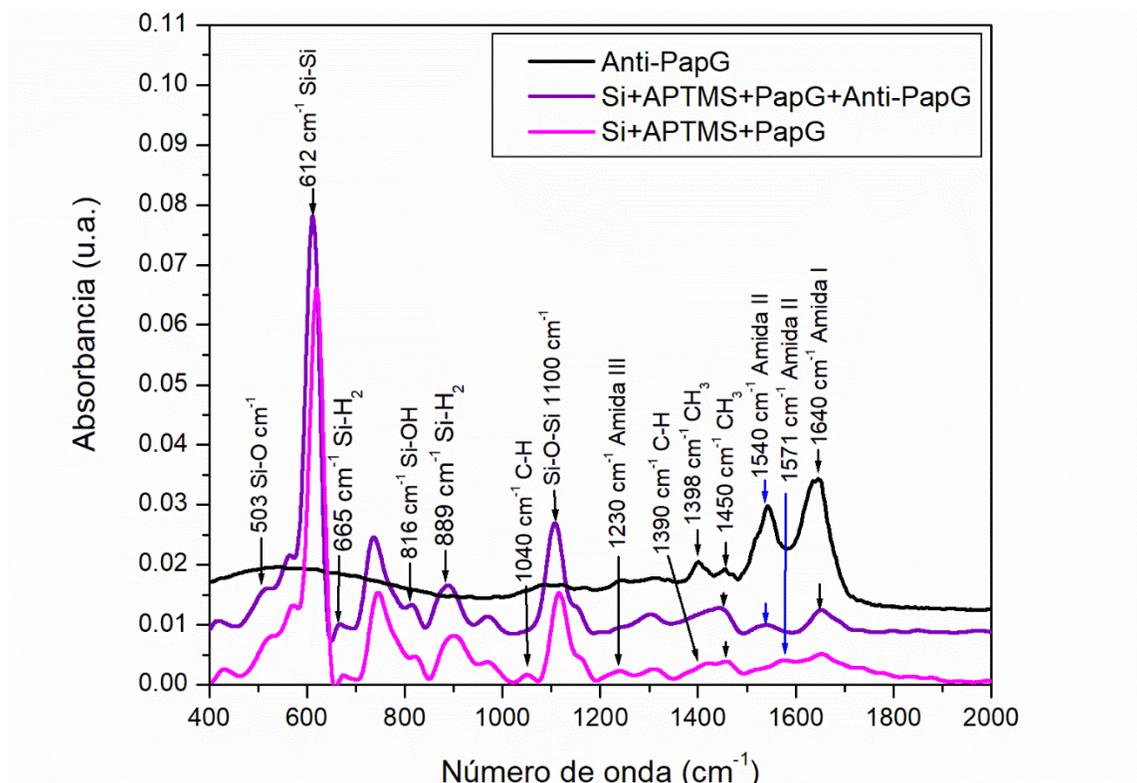


Figura 31 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} de la detección de anticuerpos anti-PapG. Se observa la inmovilización de la proteína PapG (rosa), detección de anticuerpos anti-PapG (violeta) y los anticuerpos anti-PapG sin ningún tratamiento (negro).

4.5.1.2 Análisis de la segunda derivada de la absorbancia FTIR para la detección de anticuerpos Anti-PapG.

Posteriormente se obtuvo la segunda derivada de los espectros FTIR de la detección de anticuerpos Anti-PapG en la región de la amida I de proteínas (1600-1700 cm^{-1}). En la Figura 32 podemos observar bandas relacionadas con los componentes de la estructura secundaria de proteínas como laminas β en 1631 cm^{-1} , así como la banda en 1682 cm^{-1} de los giros β (Boulet Audet, Kazarian, & Byrne, 2016). La banda correspondiente a los hélices α en 1653 cm^{-1} se puede observar en la detección de anticuerpos misma que se encuentra relacionada con la medición de los anticuerpos sin ningún tratamiento, corroborando la detección de los mismos.

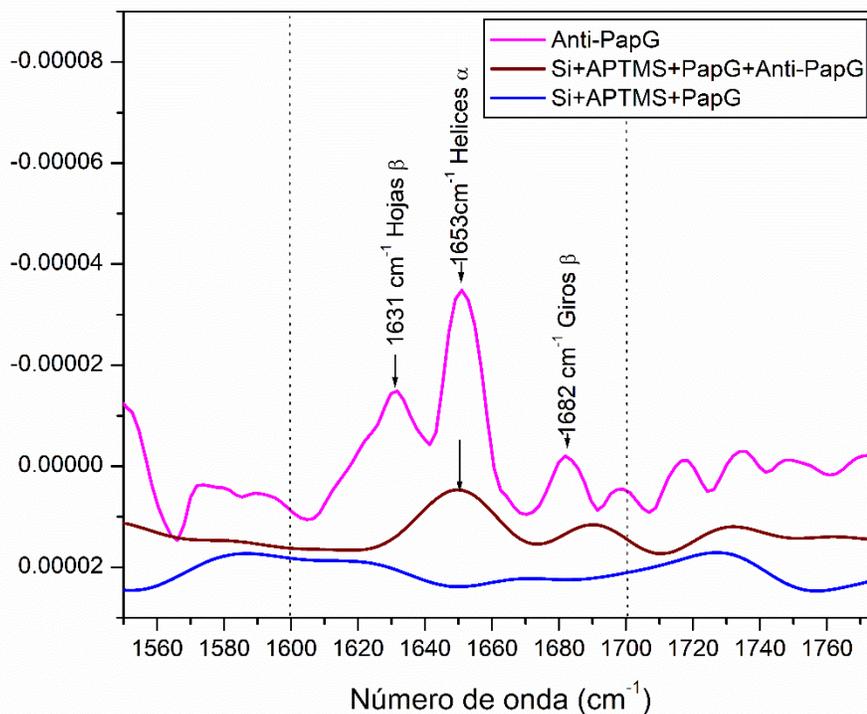


Figura 32 Segunda derivada del espectro FTIR de la detección de anticuerpos Anti-PapG en la región de la Amida I de proteínas

4.5.2 Análisis de la detección de la proteína PapG

El espectro de IR se registró antes y después de la detección de la proteína PapG así como el espectro de la proteína sin ningún tratamiento. En la Figura 33 podemos observar bandas relacionadas al soporte de silicio, bandas correspondientes a la inmovilización de anticuerpos. Las bandas correspondientes a la detección de la proteína son la de la amida II en 1571 cm^{-1} la cual presenta una mayor absorbancia, la banda en 1390 cm^{-1} correspondiente a los modos vibracionales del C-H, la banda en 1730 cm^{-1} correspondientes a los modos vibracionales de tensión de enlace del C=O (Barraza Garza, y otros, 2013).

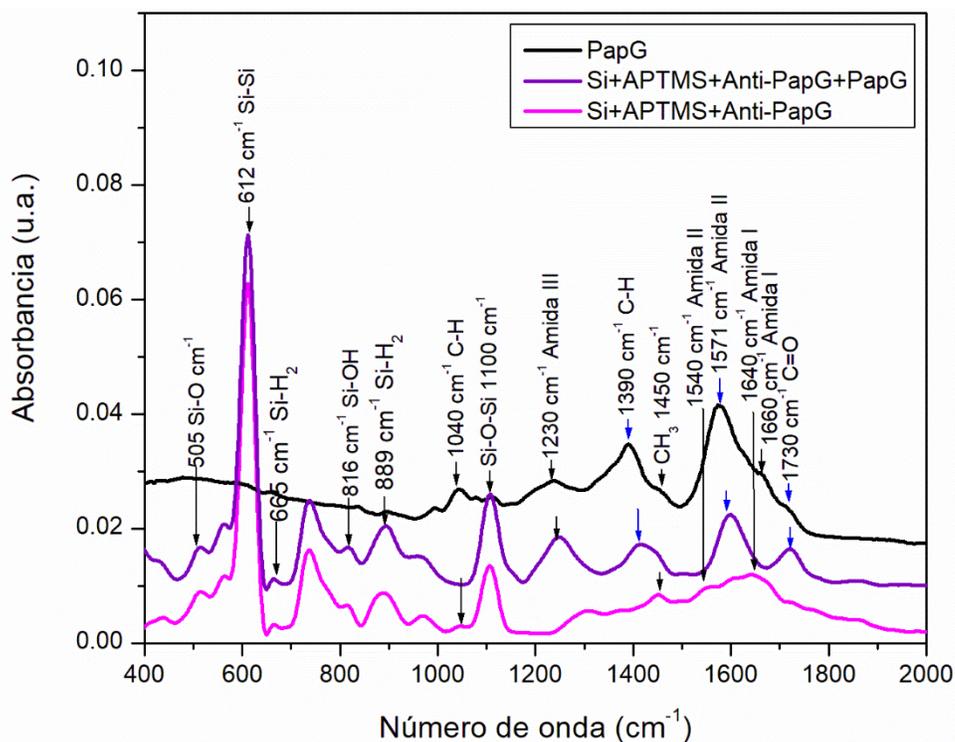


Figura 33 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} de la detección de la proteína PapG. Se observa la inmovilización de anticuerpos anti-PapG (rosa), detección de la proteína PapG (violeta) y la proteína PapG sin ningún tratamiento (negro).

4.5.2.1 Análisis de la segunda derivada de la absorbancia FTIR para la detección de la proteína PapG.

Posteriormente se obtuvo la segunda derivada de los espectros FTIR de la detección de la proteína PapG en la región de la amida I de proteínas ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$). En la Figura 34 podemos observar bandas relacionadas con los componentes de la estructura secundaria de proteínas como las hojas β en 1608 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} y 1693 cm^{-1} , así como la banda en 1676 cm^{-1} de los giros β y en 1663 cm^{-1} de 3_{10} hélices (Jackson & Mantsch, 2008). La banda en 1625 cm^{-1} de las hojas β corresponde a la detección de la proteína PapG puesto que en la inmovilización no aparece dicha banda (Barraza Garza, y otros, 2013; Kong & Yu, 2007).

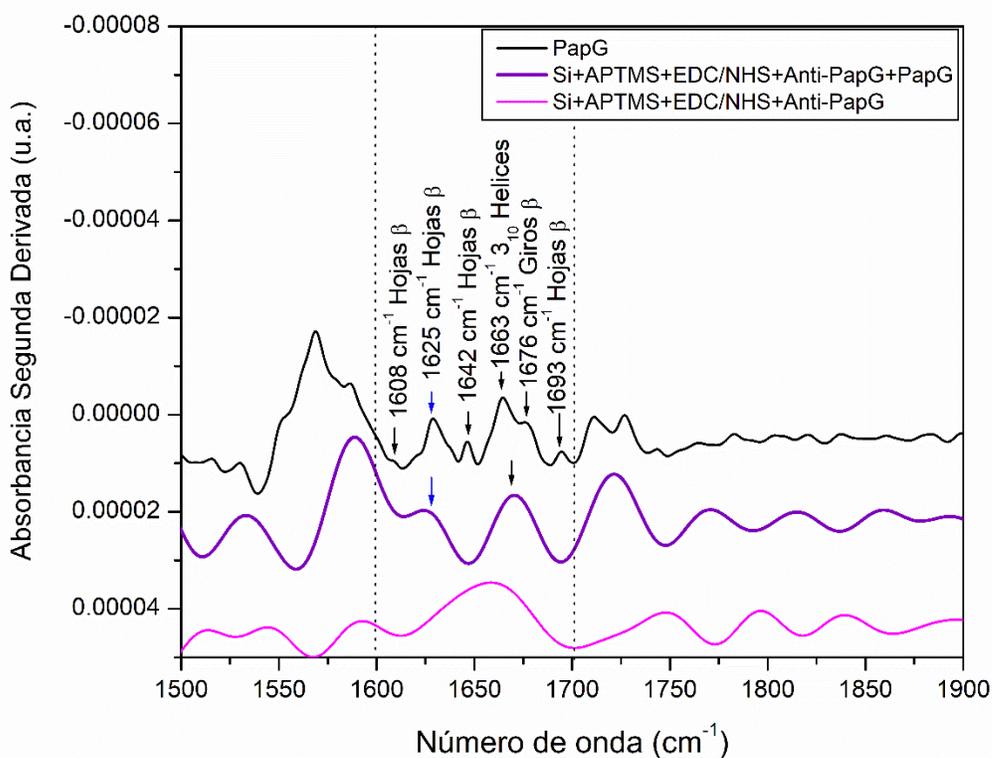


Figura 34 Segunda derivada de los espectros FTIR de la detección de la proteína PapG en la región de la Amida I de proteínas.

4.6 Análisis de detección a diferentes concentraciones

4.6.1 Detección de anti-PapG

Los espectros de IR de la detección de anticuerpos anti-PapG utilizando concentraciones de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fueron analizados, obtuvimos bandas relacionadas al soporte de silicio funcionalizado, bandas correspondientes a la inmovilización de la proteína y finalmente una banda correspondiente a la detección de la proteína PapG en 1540 cm^{-1} de la amida II correspondiente a la presencia de los anticuerpos (Haris & Severcan, 1999; Barraza Garza, y otros, 2013). El corrimiento de esta banda surge principalmente de la interacción que existe entre nuestro elemento de reconocimiento (proteína) y el analito a detectar (anticuerpo) principalmente a los puentes de hidrogeno puesto que se ha reportado que esta banda es particularmente útil para monitorear el intercambio de hidrógeno-deuterio y los cambios en el enlace de hidrógeno como se muestra en la Figura 35 (Parvez I. , 2013).

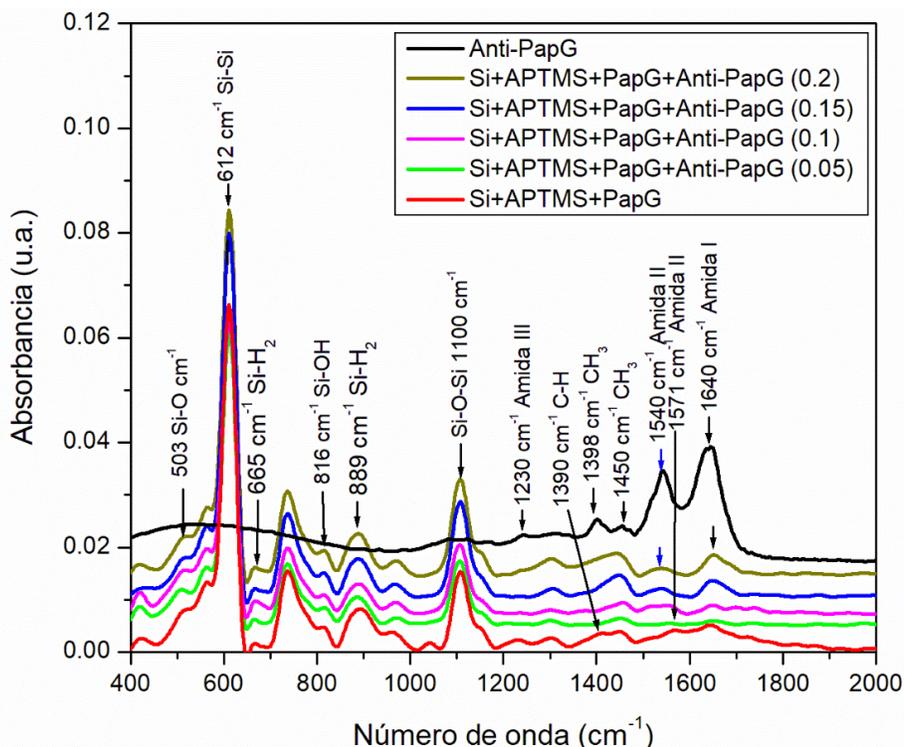


Figura 35 Espectros FTIR de la detección de anticuerpos anti-PapG a diferentes concentraciones

4.6.1.1 Análisis cuantitativo de la detección de anticuerpos Anti-PapG

Los datos obtenidos de los espectros de la detección de anticuerpos anti-PapG fueron analizados para obtener las intensidades relativas de la banda asociada a la detección (Amida II 1540cm^{-1}) y las bandas asociadas al biosensor (Si-Si, Si-O-Si y Si-H₂) como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Intensidades relativas de la banda asociada a la detección (Amida II) y las bandas asociadas al biosensor (Si-Si, Si-O-Si y Si-H₂)

Concentración de la detección de anticuerpos anti-PapG	Amida II (1450 cm^{-1})	Si-Si (612 cm^{-1})	I_{1450}/I_{612}	Si-H ₂ (889 cm^{-1})	I_{1450}/I_{889}	Si-O-Si (1100 cm^{-1})	I_{1450}/I_{1100}
0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0	0	0	0	0	0	0
0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.0053	0.0611	0.0876	0.0104	0.5133	0.0168	0.317
0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.0087	0.0638	0.1377	0.0129	0.677	0.020	0.439
0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.0121	0.0798	0.152	0.0177	0.683	0.027	0.439
0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.0159	0.0843	0.1896	0.0225	0.708	0.032	0.499

El análisis cuantitativo de la detección de anticuerpos en relación con la Amida II/Si-Si mostro un ajuste lineal en un rango de concentración de 0.05 a 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ obteniendo una $R^2=0.97$ como se muestra en la Figura 36.

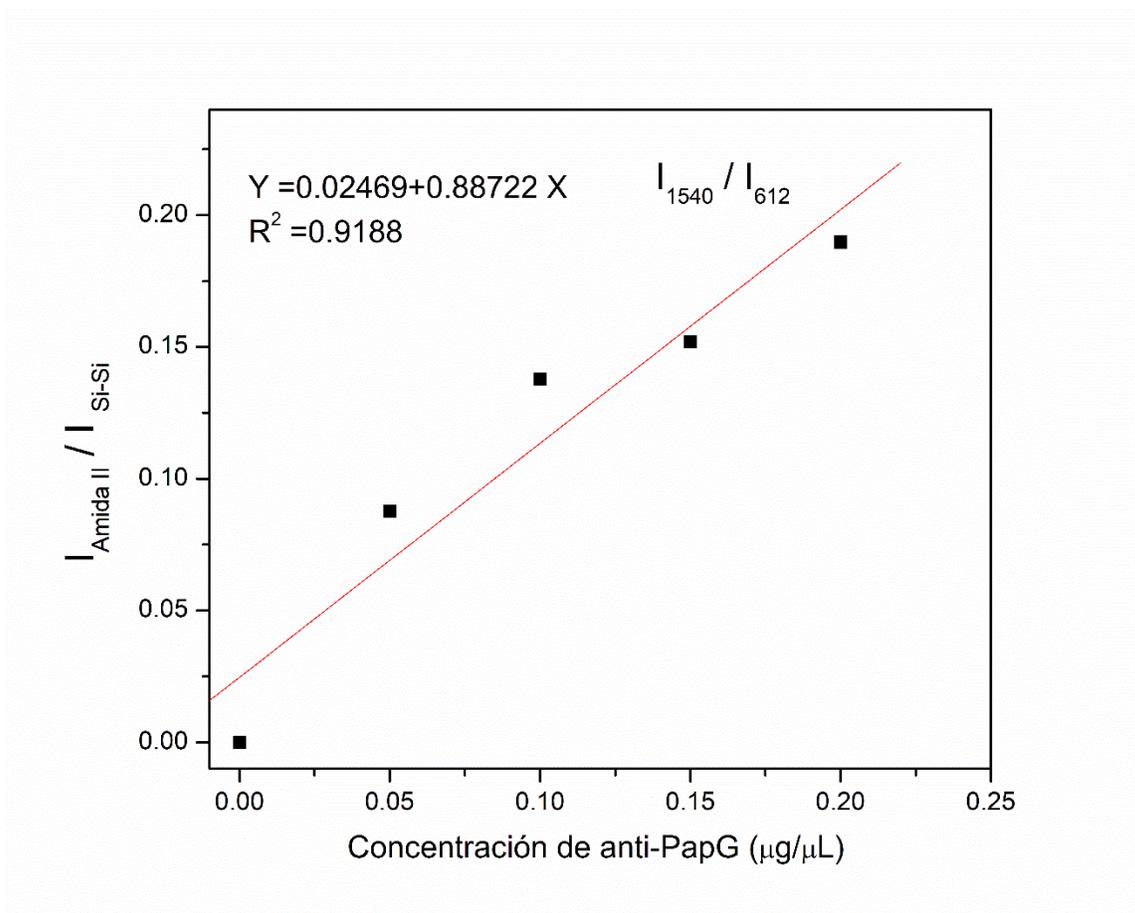


Figura 36 Análisis cuantitativo de la detección de anticuerpos en relación con la Amida II/Si-Si

El análisis cuantitativo de la detección de anticuerpos en relación con la Amida II/Si-H₂ mostro un ajuste sigmoidal en un rango de concentración de 0.05 a 0.2 μg/μl obteniendo una R²=0.99 como se muestra en la Figura 37.

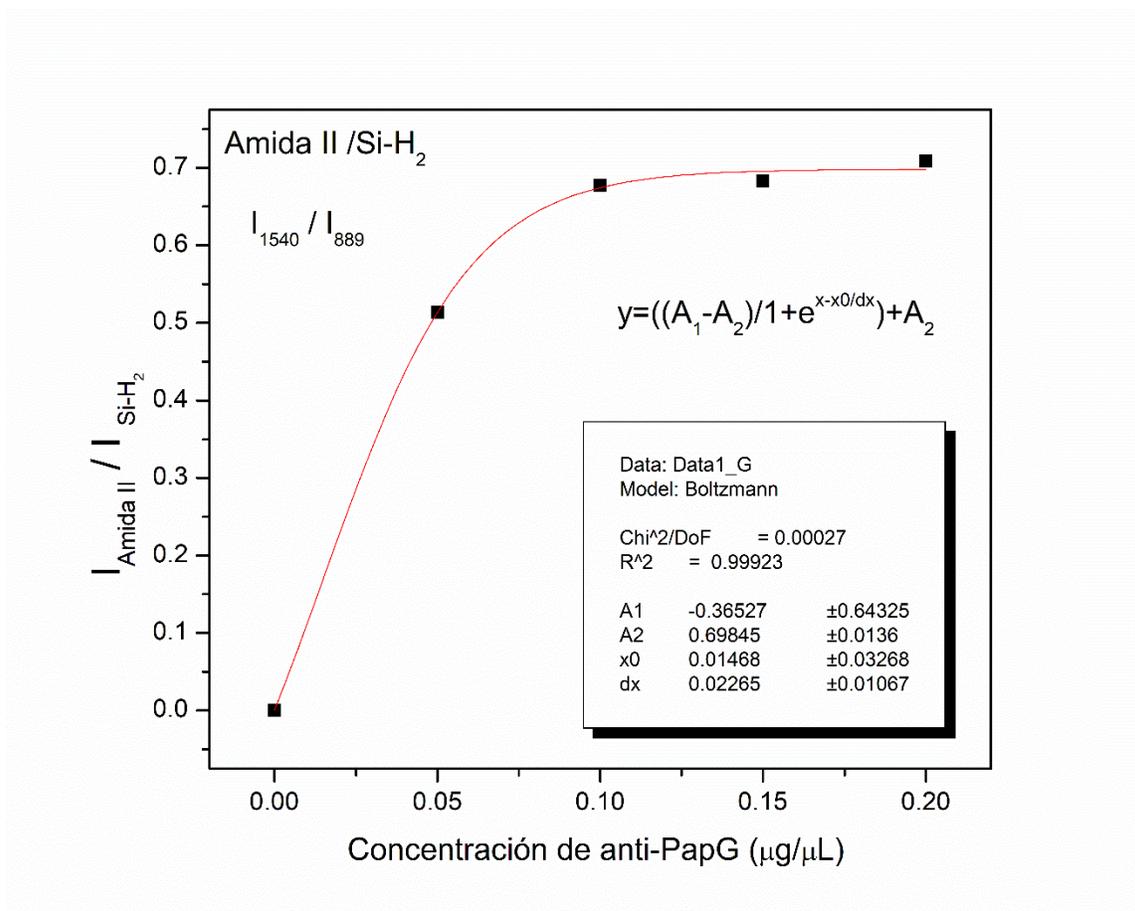


Figura 37 Análisis cuantitativo de la detección de anticuerpos en relación con la Amida II/Si-H₂

El análisis cuantitativo de la detección de anticuerpos en relación con la Amida II/Si-O-Si mostró un ajuste sigmoïdal en un rango de concentración de 0.05 a 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ obteniendo una $R^2=0.99$ como se muestra en la Figura 38.

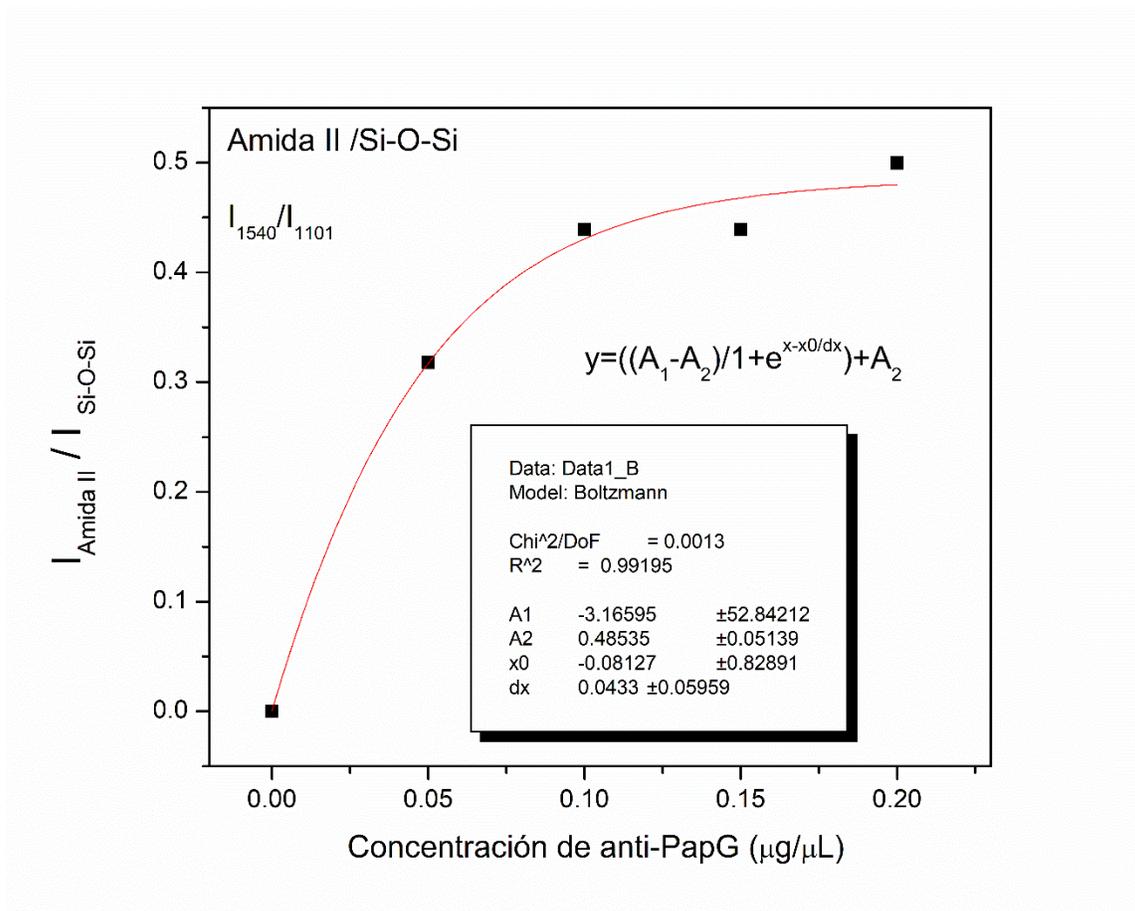


Figura 38 Análisis cuantitativo de la detección de anticuerpos en relación con la Amida II/Si-O-Si

4.6.2 Detección de la proteína PapG

Los espectros de IR de la detección de la proteína PapG utilizando concentraciones de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fueron analizados, obtuvimos bandas relacionadas al soporte de silicio funcionalizado, bandas correspondientes a la inmovilización de la proteína y finalmente bandas correspondientes a la detección de la proteína PapG de las cuales destacan las bandas en 1571 cm^{-1} correspondientes a los modos vibracionales de tensión de C-N y de deformación de N-H de la amida II, bandas en 1660 cm^{-1} correspondientes a los modos vibracionales de tensión de enlace de los grupos C=O de la Amida I y bandas en 1730 cm^{-1} correspondientes a los modos vibracionales de tensión de los enlaces C=O, como se observan en la Figura 39 (Barth, 2007; Barraza Garza, y otros, 2013).

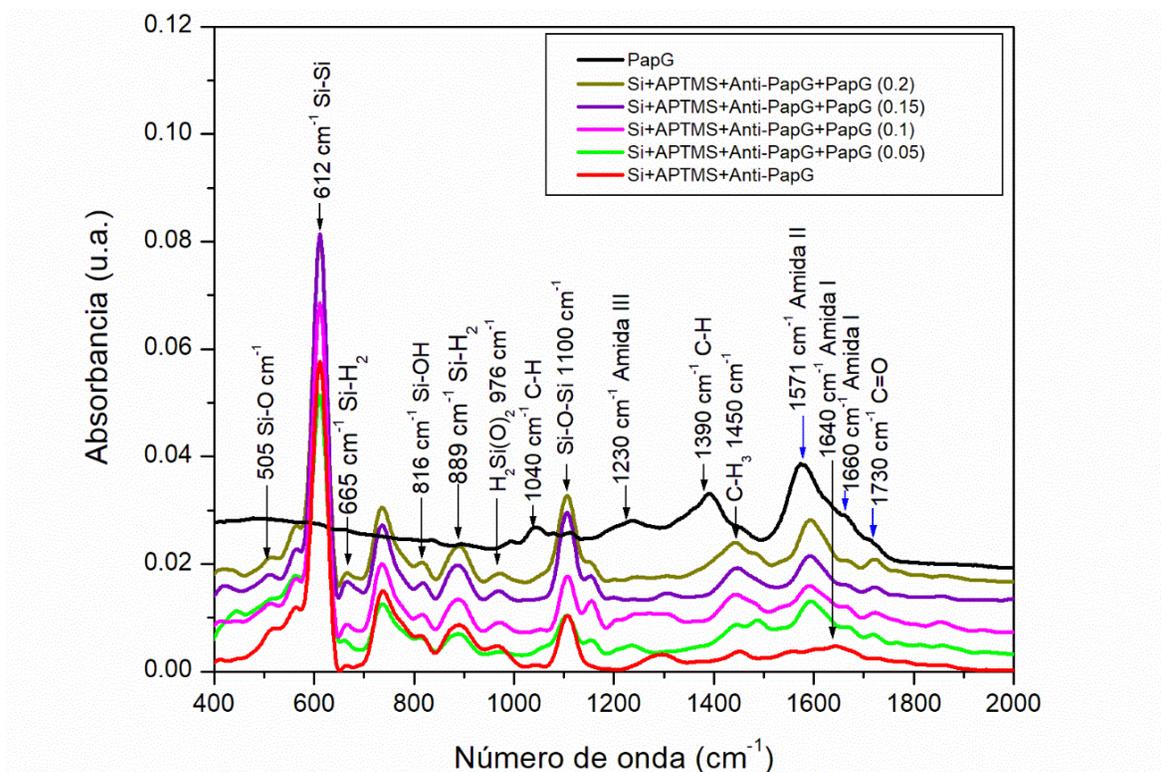


Figura 39 Espectros FTIR de la detección de la proteína PapG a diferentes concentraciones

4.6.2.1 Análisis cuantitativo de la detección de la proteína PapG

Los datos obtenidos de los espectros de la detección de la proteína PapG fueron analizados para obtener las intensidades relativas de la banda asociada a la detección (C=O) y la banda asociada al biosensor (Si-Si) como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4 Intensidades relativas de la banda asociada a la detección (C=O 1730) y la banda asociada al biosensor (Si-Si)

Concentración de la detección de la proteína PapG	C=O (1730 cm ⁻¹)	Si-Si (612 cm ⁻¹)	I ₁₇₃₀ /I ₆₁₂
0 µg/µL	0	0	0
0.05 µg/µL	0.0033	0.0483	0.0701
0.1 µg/µL	0.0062	0.0640	0.0974
0.15 µg/µL	0.0108	0.0708	0.1535
0.2 µg/µL	0.00879	0.0746	0.1178

El análisis cuantitativo de la detección de la proteína PapG en relación con C=O/Si-Si mostró un ajuste lineal en un rango de concentración de 0.05 a 0.2 µg/µl obteniendo una R²=0.97 como se muestra en la figura 41.

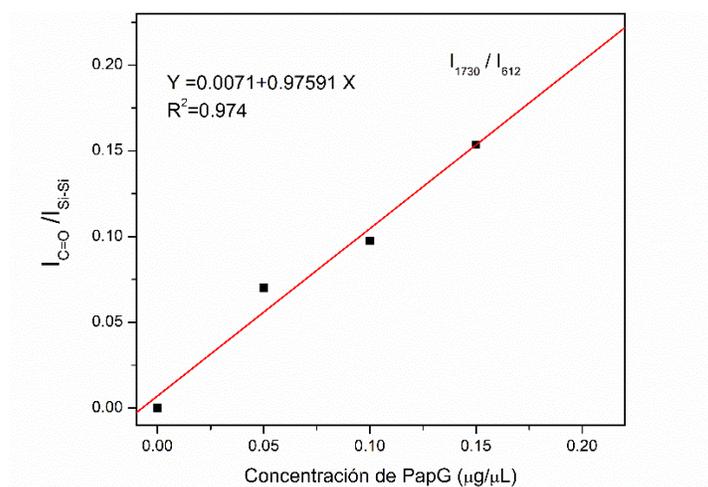


Figura 40 Análisis cuantitativo de la detección de la proteína PapG en relación con C=O/Si-Si

4.7 Análisis de detección en muestra real

La muestra de orina del paciente sano presento un color amarillo claro de aspecto transparente, olor suave y un pH de 7. El espectro FTIR (figura 42) mostro bandas correspondientes a los modos vibracionales de flexión de los grupos CH_2 , CH_3 , modos de vibración de deformación simétrica de enlace $\text{N}=\text{O}$ en 1450 cm^{-1} . Una banda en 587 cm^{-1} de los modos vibracionales deformación del enlace $\text{C}-\text{H}$ de los alquinos, una banda en 1158 cm^{-1} de los modos vibracionales de estiramiento del enlace $\text{C}-\text{O}$ de las proteínas (Ismail Ahmad , Ahmed Syed, Ravi Prasad, & Ahmad, 2014). Una banda en 782 correspondiente a los modos vibracionales de flexión de $\text{C}-\text{H}$, una banda de los modos vibracionales de flexión en el plano en 514 cm^{-1} de $\text{O}-\text{C}=\text{O}$ (Sekkoum, Cheriti, Taleb, & Belboukhari, 2016). Una banda en 1600 correspondiente a los modos vibracionales de deformación de los enlaces $\text{C}-\text{N}-\text{H}$ de la urea (Gregorio, Zapata, & García Ruiz, 2017).

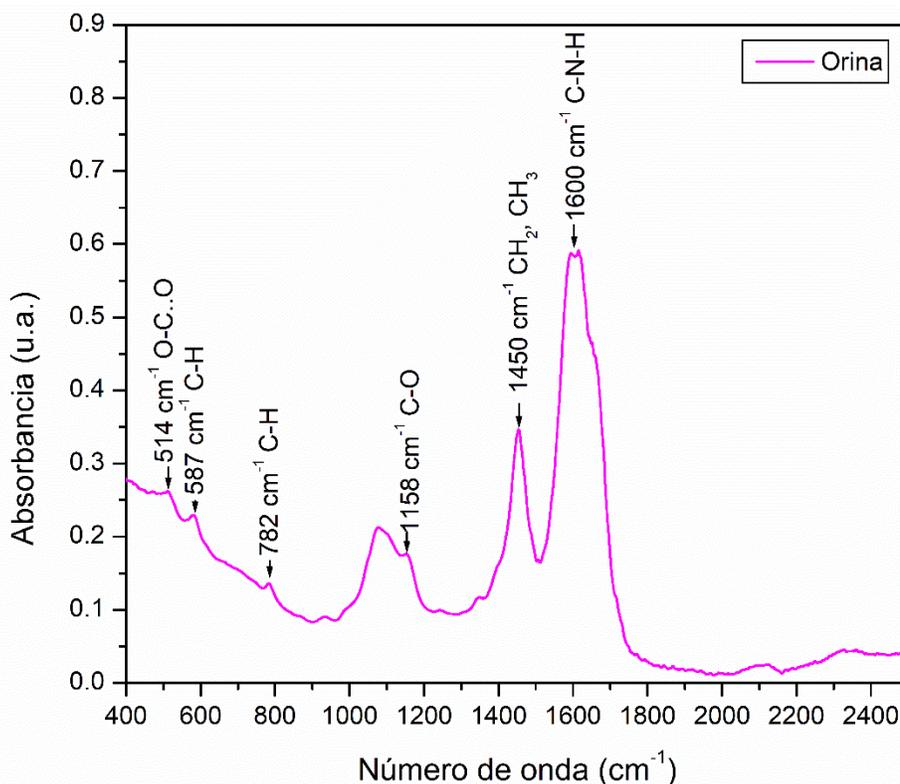


Figura 41 Espectro FTIR de la muestra de orina de paciente sano

4.7.1 Detección de anticuerpos anti-PapG en muestra de orina

Los espectros FTIR de la detección de anticuerpos en muestra de orina fueron analizados, en la figura 43 se pueden observar bandas relacionadas a la inmovilización de la proteína en el soporte de silicio y una banda relacionada a la detección de los anticuerpos. La banda en 1571cm^{-1} correspondiente a la Amida II de los modos vibracionales de tensión de C-N y de deformación de N-H de la inmovilización de la proteína y un corrimiento de esta banda en 1540cm^{-1} de la amida II correspondiente a la detección de los anticuerpos, que con anterioridad se describió (Barraza Garza, y otros, 2013; Haris & Severcan, 1999; Parvez I. , 2013). Se debe recalcar que no se observaron cambios significativos al utilizar una muestra de orina o utilizar buffer de fosfatos para la detección de anticuerpos anti-PapG, puesto que se observaron las mismas bandas en ambas detecciones.

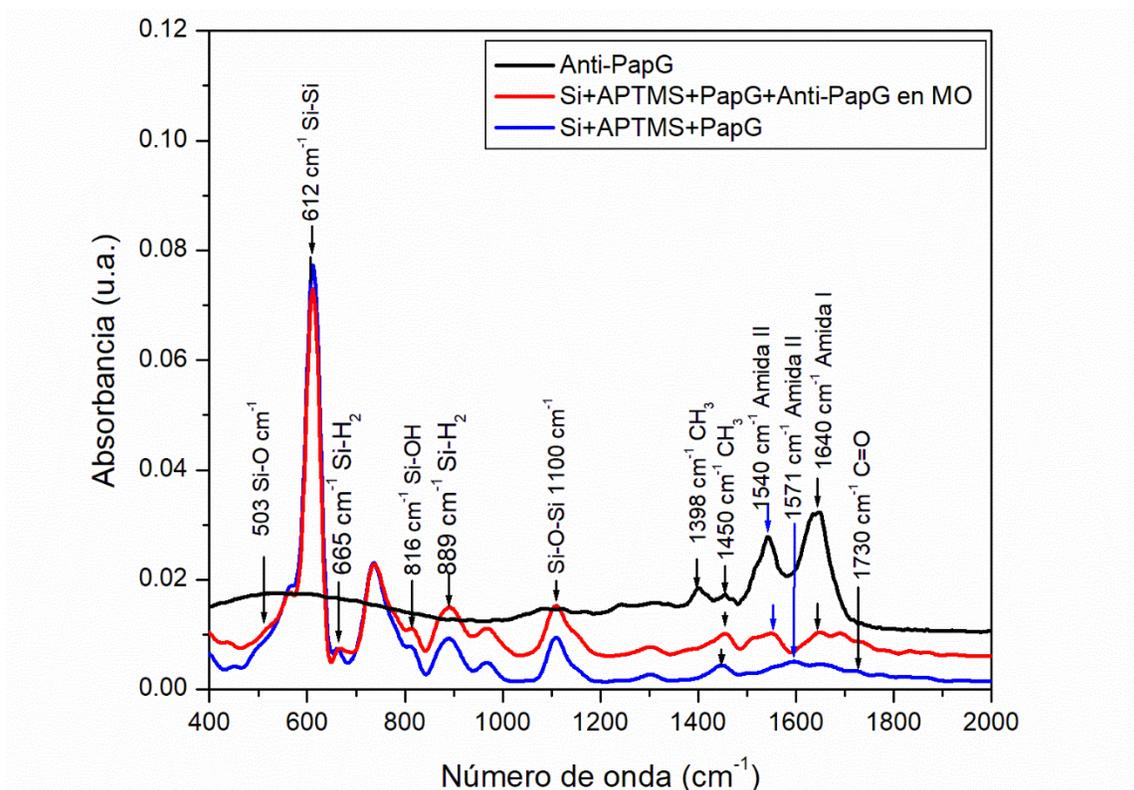


Figura 42 Detección de anticuerpos anti-PapG en muestra de orina.

4.7.1 Detección de la proteína PapG en muestra de orina

Los espectros FTIR de la detección de la proteína PapG en muestra de orina fueron analizados, en la figura 44 se pueden observar bandas relacionadas a la inmovilización de la proteína en el soporte de silicio, más sin embargo no se observaron cambios con respecto a la detección de la proteína PapG esto puede deberse principalmente al cambio de medio en el que se encontraba la proteína el cual era buffer de citratos, al colocarla en la muestra de orina por cambios de pH y de los componentes de la muestra de orina se desnaturalizo.

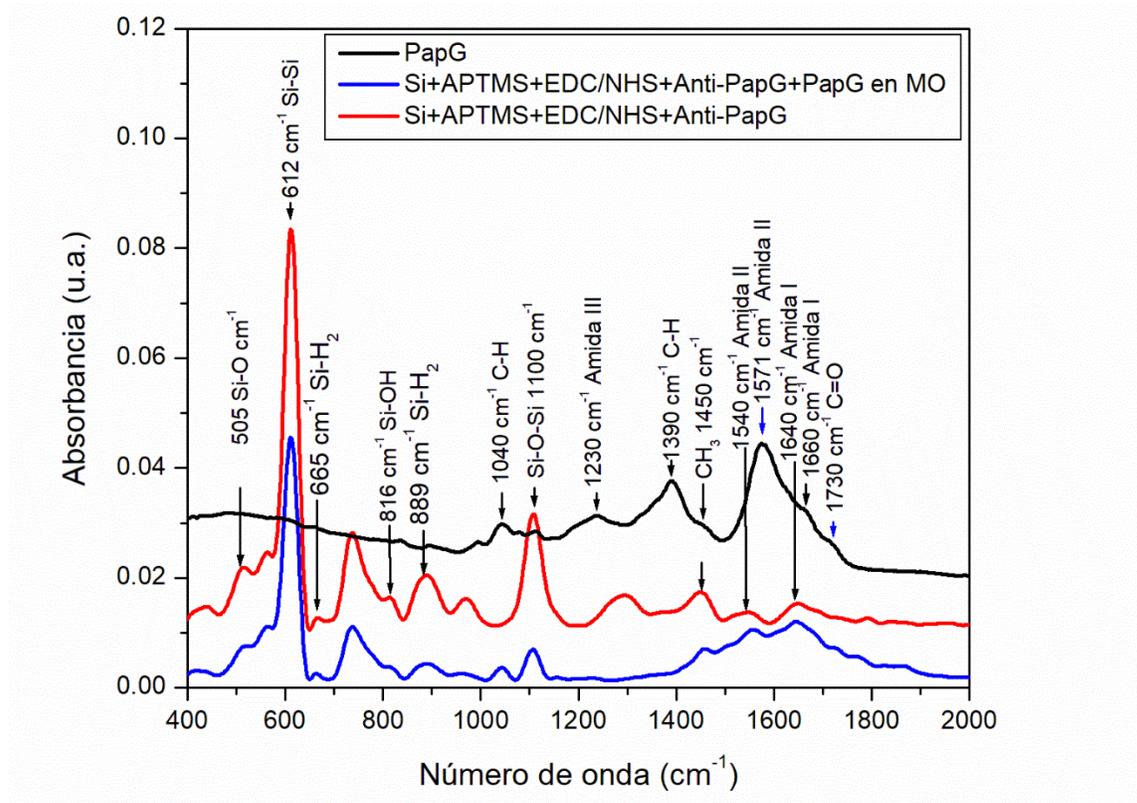


Figura 43 Detección de la proteína PapG en muestra de orina.

Conclusiones

- Se logró obtener la proteína recombinante mediante el sistema de clonación y expresión aLICator™ LIC , lo cual se corroboró mediante el gel SDS-PAGE.
- El análisis de Western blotting y el ELISA nos permitieron verificar la especificidad de los anticuerpos policlonales obtenidos.
- El análisis de FTIR nos permitió confirmar la detección de anticuerpos anti-PapG mediante la presencia de las bandas de los modos vibracionales de la Amida I y la Amida II.
- El análisis FTIR nos permitió confirmar la detección de la proteína PapG mediante la presencia de las bandas de los modos vibracionales de la amida I, el grupo C=O y la amida II.
- Para obtener un panorama más amplio respecto a la detección de la proteína PapG y no se desnaturalice, se propone realizar una detección en muestras de orina con UPEC, puesto que esto complementaría información para la detección de la proteína PapG.
- La información estructural sobre los complejos de proteína-proteína no se puede abatir fácilmente, es por ello que es necesario trabajar más en áreas experimentales y teóricas para mejorar aún más nuestra comprensión en los cambios en las posiciones de las bandas en función de la estructura de la proteína.

Referencias

- Boulet Audet, M., Kazarian, S. G., & Byrne, B. (2016). In-column ATR-FTIR spectroscopy to monitor affinity chromatography purification of monoclonal antibodies. *Scientific Reports*, 6:30526.
- Rivera, W., Torres, C., & Pisso, A. (2002). Estudio De Silicio Poroso Por Ftir. *Revista Colombiana De Física*.
- Andreas, B. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica*, 1073-1101.
- Arrollo, M. (1998). *Inmobilized enzymes: Theory, methods of study and applications*. Madrid.
- Balderas Valadez, R. F., & Agarwal, V. (2017). Use of porous silicon functionalized with acetylcholinesterase as detection platform for arsenic (III). *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 321-329.
- Barraza Garza, G., A. De La Rosa, L., Martínez Martínez, A., Castillo Michelb, H., Cotteb, M., & Alvarez Parrillaa, E. (2013). La Microespectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIRM) en el Estudio de sistemas biológicos. *Latinoamer. Quím*, 125-148.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica*, 1073-1101..
- Batalla, P., Fuentes, M., Grazu, V., Mateo, C., Fernandez Lafuente, R., & Gulsan, J. M. (2008). Oriented Covalent Immobilization of Antibodies on Physically Inert and Hydrophilic Surfaces through Their Glycosidic Chains. *Biomacromolecules*, 719-723.
- Boulet, M., Byrne, B., & Kazarian, S. (2014). High Throughput Thermal Stability analysis of a monoclonal antibody by attenuated total reflection FT-IR spectroscopic imaging. *Anal. Chem.*, 9786-9793.
- Boulet, M., Kazarian, S., & Byrne, B. (2016). In column ATR-FTIR spectroscopy to monitor affinity chromatography purification of monoclonal antibodies. *Scientific Reports*.
- Chandran Hema, G., Pinapeddavari, M., Krishnan, S., & Annamalai Senthil, K. (2016). Chandran HemaGayathri, PinapeddavariMayuri, KrishnAn electrochemical immunosensor for efficient detection of uropathogenic E. coli based on thioninedye immobilized chitosan/functionalized-MWCNT modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 71-77.
- Chu, C. M., & Lowder, J. L. (2018). Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*.
- Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Biosensores ópticos. *Ensayos en Bioquímica*, 91-100.
- Davies, G., & Ghabbour, E. A. (1999). *Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Applications*. Boston, USA: Royal Society of Chemistry

- Dodson, K. W., Pinkner, J. S., Rose, T., Magnusson, G., Hultgren, S. J., & Waksman, G. (2001). Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor. *Cell*, 733–743.
- Douglas Skoog, A., James Holler, F., & Timothy Nieman, A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. Madrid: Mc Graw Hill.
- Flores Mireles, A. L., Walke, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*, 269-284.
- Gonzales, V., Garcia, E., Ruiz, O., & Gago, L. (2005). Aplicaciones de Biosensores en la Industria Agroalimentaria. *CEIM Dirección General de Universidades e Investigación*, 2213-2005.
- Gregorio, I., Zapata, F., & García Ruiz, C. (2017). Analysis of human bodily fluids on superabsorbent pads by ATR-FTIR. *Talanta*, 634-640.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 1450-1458.
- Haris, P. I., & Severcan, F. (1999). FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 207-221.
- Hema Gayathri, C., Mayuri, P., Krishnan, S., & Annamalai, S. K. (2016). An electrochemical immunosensor for efficient detection of uropathogenic *E. coli* based on thionin dye immobilized chitosan functionalized MWCNT modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 71-77.
- Hermanson, G. (2013). *Bioconjugate Techniques*. Elsevier.
- Herrera Celis, J., Reyes Betanzo, C., Itzmoyotl Toxqui, A., Orduña Díaz, A., & Pérez Coyotl, A. (2015). a-SiC_{1-x}H thin films with subnanometer surface roughness for biological applications. *Journal of Vacuum Science & Technology A*, 05E108.
- Ioannou, J. C., Donald, A. M., & Tromp, R. H. (2015). Characterising the secondary structure changes occurring in high. *Food Hydrocolloids*, 216-225.
- Ismail Ahmad, S., Ahmed Syed, L., Ravi Prasad, P., & Ahmad, A. (2014). Quantitation of urea in urine by Fourier transforms infrared spectroscopy. *Der Pharma Chemica*, 90-96.
- Jackson, M., & Mantsch, H. H. (2008). The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 85-120.
- Jilie, K., & Shaoning, Y. (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis. *Biochimica et Biophysica Sinica*, 549-559.
- Jimenez C., C., & León P., D. (2008). Biosensors: Implementation And Outlook In The Control And Process Quality And Foodstuffs. *Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*.
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Biochimica et Biophysica*, 549-559.
- Lara, A. R. (2011). Producción De Proteínas Recombinantes En *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 209-223.

- Li, S. B., Wu, Z. M., Li, W., Jiang, Y. D., & Liao, N. M. (2008). Influence of substrate temperature on the microstructure and optical properties of hydrogenated silicon thin film prepared with the microstructure and optical properties of hydrogenated silicon thin film prepared with pure silane. *Phys. B Condens*, 2282-2287.
- Lombardo Aburto , E. (2018). Abordaje pediátrico de las infecciones de vías urinarias. . *Acta Pediatr Mex.* , 85-90.
- Luna Pineda , V. M., Reyes Grajeda , J. P., Cruz Córdova , A., Saldaña Ahuactzi, Z., Ochoa, S. A., Maldonado Bernal , C., . . . Xicohtencatl Cortes , J. (2016). Dimeric and Trimeric Fusion Proteins Generated with Fimbrial Adhesins of Uropathogenic Escherichia coli. . *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 6:135.
- Luna Pineda, V. M., Ochoa , S., Cruz Cordoba , A., Cazares Domínguez, V., Vélez González, F., Hernández Castro , R., & Xicohtencatl Cortés , J. (2018). Infecciones del tracto urinario, inmunidad y vacunación. *Bol Med Hosp Infant Mex.* , 17.
- Machado , N. P., Téllez , G. A., & Castaño , J. C. (2006). Monoclonal antibodies: physical development and therapeutic perspectives. *Asociación Colombiana De Infectología*, 186-197.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K. S., Buckley, D., & Stahl, D. (2011). *Brock biology of microorganisms*. Boston: Pearson.
- Majoul, N., Aouida, S., & Bessaïs, B. (2015). Progress of porous silicon APTES-functionalization by FTIR investigations. *Applied Surface Science*, 388-391.
- Mann, R., Mediati, D. G., Duggin, I. G., Harry , E. J., & Bottomley , A. L. (2017). Metabolic Adaptations of Uropathogenic E. coli in the Urinary Tract. . *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 7:241.
- Martínez Bogado , M. (2011). *Materiales y materias primas.* .
- Mejia, J. E., Bolaños , J. O., & Rodríguez, E. J. (2012). Uso de la espectroscopia IR para estudiar la transformacion térmica que experimenta una arcilla caolinítica. *EIA*, 91-103.
- Mello, L., & Kubota, L. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem.* , 237-256.
- Miller , L. M., Bourassa, M. W., & Smith, R. J. (2013). FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochim Biophys*, 2339-2346.
- Morales Acevedo, A., & Pérez Sánchez, G. (2003). Caracterización por espectroscopía en el infrarrojo de óxidos de silicio depositados en ambiente de N2O. *Superficies y Vacío* , 16-18.
- Nuutinen , M., & Uhari , M. (2001). Recurrence and follow-up after urinary tract infection under the age of 1 year. . *Pediatr Nephrol* , 69-72.
- O'Brien , V. P., Hannan , T., Nielsen , H. V., & Hultgren , S. J. (2016). Drug and vaccine development fot the treatment and prevention of urinary tract infections. *Microbiol Spectr* , 1-62 .
- Ortiz Dosal, L. C., & Kolosovas Machuca , E. S. (2017). Ingeniería De Superficies Y Monocapas Autoensambladas. *Doctorado Institucional En Ingeniería Y Ciencia De Materiales, UASLP*.

- Parvez , I. (2013). Parvez I. (2013). Probing protein–protein interaction in biomembranes using Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica* , 2265–2271.
- Perez Coyotl , A. L. (2016). Análisis Y Estudio De La Interacción De Escherichia Coli ETEC E9034a Con Carburo De Silicio Amorfo Hidrogenado Como Soporte Inmovilizador. *Tesis Que Para Obtener El Título De Maestra En Biotecnología Aplicada*.
- Pineda, D. (2003). Biosensores y su Aplicación En La Industria De Alimentos. *Licda*.
- Prajapati, H. (2018). Urinary tract infections in children. . *Paediatrics and Child Health*.
- Schüle, S., FrieB, W., Bechtold-Peters, K., & Patrick, G. (2007). Conformational analysis of protein secondary structure during. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1-9.
- Sekkoum, K., Cheriti, A., Taleb, S., & Belboukhari, N. (2016). FTIR spectroscopic study of human urinary stones from El Bayadh district (Algeria). *Arabian Journal of Chemistry*, 330-334.
- Soberanis Monforte , G. A., Gordillo Rubio , J. L., & González Chi, P. I. (2015). Influence of Chemically Treated Palygorskite Over the Rheological Behavior of Polypropylene Nanocomposites. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 491-501.
- Vashist, S. K. (2012). Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. *Diagnostics*, 23-33.
- Waksman, G., & Hultgren, S. J. (2009). Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 765-774.
- Wang, Q., & Chung, Y. (2013). *Encyclopedia of Tribology*. New York: Springer Science.
- Wolfbeis, O. S., & Homola, J. (2006). *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Berlin Heidelberg: Springer.