



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**CENTRO DE FÍSICA APLICADA
Y TECNOLOGÍA AVANZADA**

**DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE DETECCIÓN
AMPEROMÉTRICA DE BIOMARCADORES EN TUBERCULOSIS
ACTIVA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN TECNOLOGÍA

PRESENTA:

YISSEL DIANA CONTRERAS VALERIANO

ASESORA: DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. RAMIRO PÉREZ CAMPOS
DIRECTOR DEL CFATA, UNAM
PRESENTE

ATN: Dr. José Luis Aragón Vera
Coordinador de la Licenciatura en
Tecnología

En cumplimiento del Artículo 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis con título Desarrollo de una plataforma de detección amperométrica de biomarcadores en tuberculosis activa, que presenta el pasante Yissel Diana Contreras Valeriano, con número de cuenta 304060834 para seguir con la opción de titulación por tesis y examen profesional en la carrera de Licenciatura en Tecnología.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Juriquilla, Qro. a 11 de noviembre del año 2011.

	NOMBRE	FIRMA DE ENTERADO
PRESIDENTE	Dr. Juan Bibiano Morales Malacara	
SECRETARIO	Dra. Luz María López Marín	
VOCAL	Dr. Pedro Salas Castillo	
1er. SUPLENTE	Dr. Domingo Rangel Miranda	
2o. SUPLENTE	Dra. Ma. Concepción Arenas Arrocena	



A mis padres

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado bajo la tutoría de la Dra. Luz María López Marín y la Dra. Ma. Concepción Arenas Arrocena, en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada. Agradezco a ambas doctoras el tiempo que dedicaron a apoyarme y la oportunidad de trabajar en este proyecto.

Quiero agradecer a todos mis profesores de licenciatura, ya que cada uno de ellos hizo una aportación valiosa a mi formación académica y, de forma directa o indirecta, al presente trabajo. De igual forma a todos mis compañeros de la licenciatura por haber compartido tantas experiencias y por las enseñanzas que cada uno me brindó. Creo que la Licenciatura en Tecnología es única por sus extraordinarios estudiantes.

Quisiera agradecer en especial a mis padres Victoria Valeriano y Jorge Contreras ya que sin su apoyo no me habría sido posible realizar estos estudios, y porque ellos son mi máximo ejemplo a seguir en cada momento. Así como a mis hermanos Claudia y Jorge por el apoyo incondicional que he recibido desde siempre de su parte.

Agradezco también a Armando por haber estado cerca en los momentos buenos y también en los difíciles.

Gracias a los Dres. Víctor M. Castaño y Horacio Estrada, y al estudiante de licenciatura Miguel Arroyo, ya que su colaboración ha sido imprescindible en el desarrollo del proyecto de bioMEMS para diagnóstico de tuberculosis.

Gracias al M.B. Jaime Pérez Trevilla, (Instituto de Ingeniería, UNAM), por su apoyo en el análisis de ácidos grasos por GC-MS, a la Dra. Genoveva Hernández Padrón (CFATA, UNAM) por su apoyo en los análisis espectroscópicos y al M.V.Z José Martín García Servín (Instituto de Neurobiología, UNAM), por su valiosa ayuda para la obtención de sueros hiperinmunes de conejo.

Finalmente, quisiera agradecer al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, y a la UNAM, por todas las valiosas oportunidades que recibí durante mi formación.

La realización de este proyecto recibió un apoyo por parte de IACOD-DGAPA a través del proyecto No. IA102611

Índice general

Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Introducción	2
Esquema metodológico	4
1. Antecedentes	5
1.1. Importancia de la tuberculosis y su diagnóstico oportuno	5
1.1.1. El bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
1.1.2. Patogénesis y respuesta inmune a la tuberculosis	7
1.1.3. Métodos usuales de diagnóstico	7
1.1.4. Diagnósticos próximos al paciente para tuberculosis	7
1.2. Polímeros semiconductores y su uso en aplicaciones biomédicas	8
1.2.1. Polímeros conductores	8
1.2.2. Clasificación de los polímeros semiconductores	9
1.2.3. Aplicaciones de los polímeros semiconductores	10
1.2.4. Polianilina (PANI)	10
1.3. Inmunodiagnóstico	12
1.3.1. Antígenos y anticuerpos	12
1.3.2. Reacciones antígeno-anticuerpo	13
1.3.3. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) y sus variantes	13
1.3.4. Sistemas microelectromecánicos (MEMS) como una alternativa para inmunodiagnóstico rápido	14
1.4. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)	18
1.4.1. Conceptos básicos en espectroscopía de impedancia electroquímica	18
Hipótesis	21
Objetivo	22
1.5. Objetivo general	22
1.6. Objetivos específicos	22

2. Materiales y métodos	23
2.1. Purificación y caracterización del antígeno di- <i>O</i> -aciltrealosa (DAT)	23
2.1.1. Cromatografía de adsorción en columna	23
2.1.2. Análisis de reactividad química y movilidad cromatográfica: cromatografía en capa fina	23
2.1.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	25
2.2. Obtención de anticuerpos policlonales anti-DAT en conejo	25
2.3. Síntesis de polianilina (PANI) en película delgada	26
2.3.1. Espectroscopía infrarroja UV-visible	26
2.4. Preparación del inmunosensor	27
2.5. Validación de los anticuerpos obtenidos mediante inmunoensayo enzimático (ELISA)	27
2.5.1. ELISA convencional para antígenos grasos	27
2.5.2. Pruebas de bioactividad del antígeno inmovilizado: ELISA modificado sobre PANI	28
2.6. Espectroscopía de impedancia electroquímica	29
2.6.1. Pruebas de espectroscopía de impedancia electroquímica	29
3. Resultados	31
3.1. Producción y caracterización de bioreactivos	31
3.1.1. Purificación del antígeno di- <i>O</i> -aciltrealosa(DAT)	31
3.1.2. Caracterización del antígeno DAT	31
3.1.3. Obtención y caracterización de anticuerpos anti-DAT	35
3.2. Preparación del inmunosensor	36
3.2.1. Síntesis y caracterización de polianilina (PANI)	36
3.2.2. Inmovilización de DAT sobre PANI y caracterización del sistema PANI-DAT	39
3.3. Análisis de la plataforma PANI-DAT para la medición de reacciones antígeno-anticuerpo	40
3.3.1. Bioactividad del antígeno inmovilizado	40
3.3.2. Reactividad de la plataforma en función de la dosis de anticuerpo	41
3.4. Pruebas de espectroscopía de impedancia electroquímica	41
4. Discusión	44
5. Conclusiones	46
Apéndices	49
Preparación de diazometano etéreo.	50
MEMS and nanotechnology: Challenges and opportunities. The case of fight against tuberculosis.	51
Biochip contra el mayor asesino mundial	52

Resumen

Resulta de vital importancia contar con un diagnóstico cercano POC (*point-of-care* o próximo al paciente) para la detección de tuberculosis activa. Una prueba de bajo costo y fácil uso permitirá la detección oportuna de pacientes que de otro modo no recibirían un tratamiento adecuado. En el presente trabajo se reporta la creación y caracterización de una plataforma novedosa para detectar biomarcadores de tuberculosis activa en suero. Para ello, un antígeno altamente específico se inmovilizó en una película de polímero semiconductor en un soporte conductor y se caracterizó la capacidad del sistema para capturar anticuerpos dirigidos contra el antígeno. El antígeno seleccionado fue el glicolípido di-*O*-aciltrealosa o DAT, característico de la pared celular del bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. El DAT fue purificado mediante cromatografía de adsorción en gel de sílice, y caracterizado por su corrimiento cromatográfico en capa fina, reactividad química y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). A fin de explorar la reactividad DAT-anticuerpo se produjo un suero hiperinmune mediante inmunización de conejos Nueva Zelanda; el suero obtenido mostró un título de 1/300 en ensayos inmunoenzimáticos. Para inmovilizar el antígeno, se sintetizaron películas delgadas de polianilina (PANI, un polímero semiconductor cuyas propiedades ópticas dependen de su estado de conducción) por oxidación química de anilina en soportes de vidrio y de óxido de estaño e indio (ITO). Las películas se caracterizaron evaluando su conductividad y espesor, así como por espectroscopía FTIR y UV-vis. El antígeno fue inmovilizado mediante adsorción sobre películas de PANI sintetizadas sobre soportes de vidrio y de óxido de estaño e indio (ITO). El sistema fue caracterizado en cuanto a estabilidad, bioactividad e impedancia (espectroscopía de impedancia electroquímica). Para ello se utilizaron métodos espectroscópicos y ensayos colorimétricos. La caracterización del sistema por voltametría permitió detectar anticuerpos contra tuberculosis incluso utilizando altas diluciones de suero, sugiriendo el potencial de esta plataforma para la detección de tuberculosis en dispositivos portátiles y de bajo costo.

Introducción

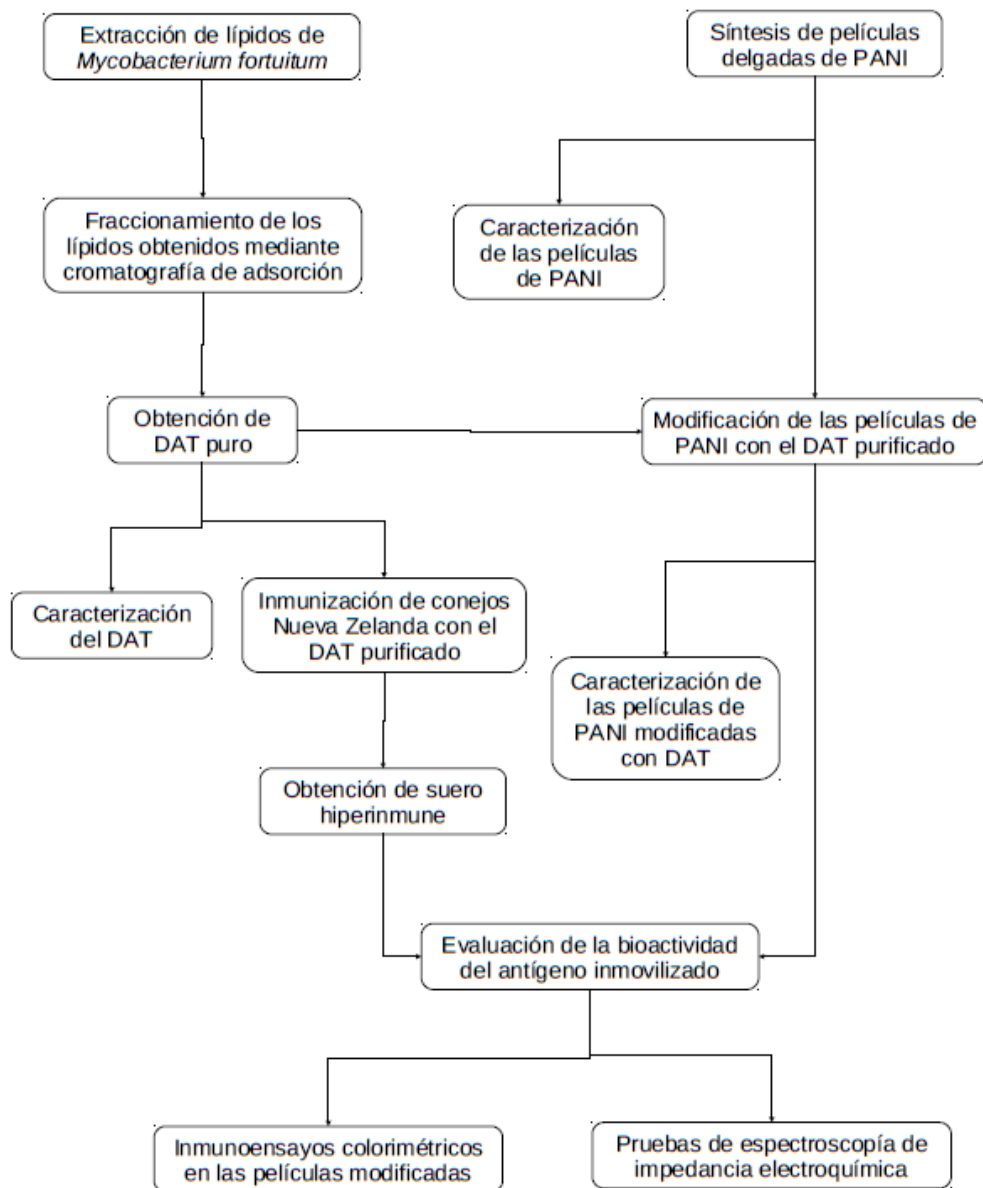
La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. A diferencia de otras enfermedades infecciosas, la tuberculosis ha aumentado constantemente en los últimos años. Según la OMS, en 2010 hubo aproximadamente 9 millones de nuevos casos y 1.3 millones de muertes debido a esta enfermedad, constituyendo una de las principales causas de muerte por infecciones a nivel mundial. La variedad pulmonar, altamente contagiosa, es la más frecuente.

En la actualidad los métodos más utilizados para diagnosticar tuberculosis pulmonar activa son la baciloscopía y el cultivo de muestras de esputo. La baciloscopía, desarrollada hace más de un siglo, llega a ser ineficaz en la detección de entre 3 y 7 de cada 10 pacientes infectados. El cultivo permite la detección del bacilo en casi todos los casos, pero llega a requerir hasta 8 semanas para su realización. Siendo la tuberculosis una enfermedad ligada a la pobreza, la necesidad de contar con un diagnóstico de bajo costo y exento de infraestructura o personal especializados es apremiante.

Se calcula que una persona enferma de tuberculosis y sin tratamiento puede llegar a infectar de 10 a 15 personas en un año [WHO, 2010]. Por lo anterior, la detección rápida de la tuberculosis, además de permitir el tratamiento oportuno de la enfermedad, ayudaría a evitar la transmisión innecesaria del padecimiento. Se ha propuesto la creación de pruebas *point-of-care* (próximas al paciente o POC) para el diagnóstico de tuberculosis. Una prueba POC consiste en un dispositivo de diagnóstico portátil que no requiere equipo costoso o entrenamiento especializado para su uso. La tecnología *Lab-on-a-chip* (laboratorio en un chip o LOC), es un desarrollo que permite realizar distintos procesos químicos en un dispositivo portátil, integrando reacciones que normalmente se realizan en varios pasos como en el caso del inmunodiagnóstico. La tecnología LOC es una variante de los sistemas microelectromecánicos (MEMS), los cuales son fabricados con los mismos procesos que un chip de silicio pero que además incorporan partes mecánicas. Además, algunos elementos de la tecnología de microfluidos (manipulación y control precisos de fluidos confinados a escala submilimétrica) también son utilizados en dispositivos LOC. Una opción atractiva para el diseño de una prueba POC para diagnóstico de tuberculosis es el inmunodiagnóstico. Las pruebas de inmunodiagnóstico requieren cortos tiempos de realización y pequeñas cantidades de reactivos, además de presentar alta sensibilidad. La integración de una prueba de diagnóstico en un inmunosensor (un transductor que emite una señal específica en respuesta a una reacción antígeno-anticuerpo) conlleva ventajas adicionales, como la eliminación de reactivos secundarios y la reducción del tiempo y costo necesarios para la prueba.

El primer paso para el desarrollo de un sistema LOC para inmunodiagnóstico de TB es el diseño y validación de una plataforma de detección escalable. En este trabajo se propone la creación de una plataforma de detección de anticuerpos asociados con tuberculosis activa. La propuesta consiste en la inmovilización de un antígeno altamente específico en un soporte semiconductor. El lípido di-*O*-aciltrealosa, antígeno altamente específico contra *Mycobacterium tuberculosis* [Steingart et al., 2009], fue purificado por cromatografía de adsorción e inmovilizado sobre polianilina (un polímero semiconductor) en película delgada. Diversas metodologías, como espectroscopías y ensayos colorimétricos, se utilizaron para demostrar la reactividad de la plataforma elaborada para capturar anticuerpos específicos. Finalmente, se evaluó la viabilidad de la plataforma para medir la reacción antígeno-anticuerpo mediante voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Este trabajo representa el primer desarrollo de una plataforma para detección amperométrica de anticuerpos asociados con tuberculosis, basado en uno de los antígenos que brindan mayor eficacia de inmunodiagnóstico de tuberculosis activa.

Esquema metodológico



Capítulo 1

Antecedentes

1.1. Importancia de la tuberculosis y su diagnóstico oportuno

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa de carácter respiratorio causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. La forma más común de la enfermedad es la pulmonar, caracterizada por tos prolongada, letargo, falta de apetito y pérdida de peso. La tuberculosis se transmite de forma aérea (por medio de los aerosoles expelidos por una persona enferma al toser, por ejemplo). Para contraer la infección, basta con la inhalación de unos pocos bacilos. El tratamiento de esta enfermedad generalmente se realiza con antibióticos.

Se calcula que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con el bacilo causante de la tuberculosis (Figura 1.1). Sin embargo, sólo el 10-15% de las personas infectadas con el bacilo desarrollarán la enfermedad de forma activa en algún momento de su vida. La probabilidad de desarrollar la infección incrementa de forma significativa en personas que padecen de alguna deficiencia en el sistema inmune, como es el caso de la infección causada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [WHO, 2010].

De acuerdo con la (Organización Mundial de la Salud) OMS, en 2010 hubo 8.8 millones de casos nuevos de tuberculosis y 1.1 millones de muertes (no asociadas con el VIH), debido a esta enfermedad. Además, una persona que padece tuberculosis activa, de no encontrarse bajo tratamiento, puede infectar 10 a 15 personas más en un año [WHO, 2010].

1.1.1. El bacilo *Mycobacterium tuberculosis*

El agente patógeno causante de la tuberculosis, descubierto por Robert Koch en 1882, es un bacilo Gram positivo, perteneciente al género *Mycobacterium* (del cual se conocen más de 120 miembros). El complejo *Mycobacterium tuberculosis* consta de aquellas micobacterias que causan tuberculosis en el ser humano y en otras especies. Originalmente se consideraban como pertenecientes a este grupo las siguientes variantes: *Mycobacterium tuberculosis* (el bacilo de la tuberculosis en humanos), *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* (el cual se encuentra en África ecuatorial y suele infectar otros mamíferos), y *Mycobacterium microti* (patógeno que suele infectar mamíferos pequeños). A este grupo se han añadido de forma reciente *My-*

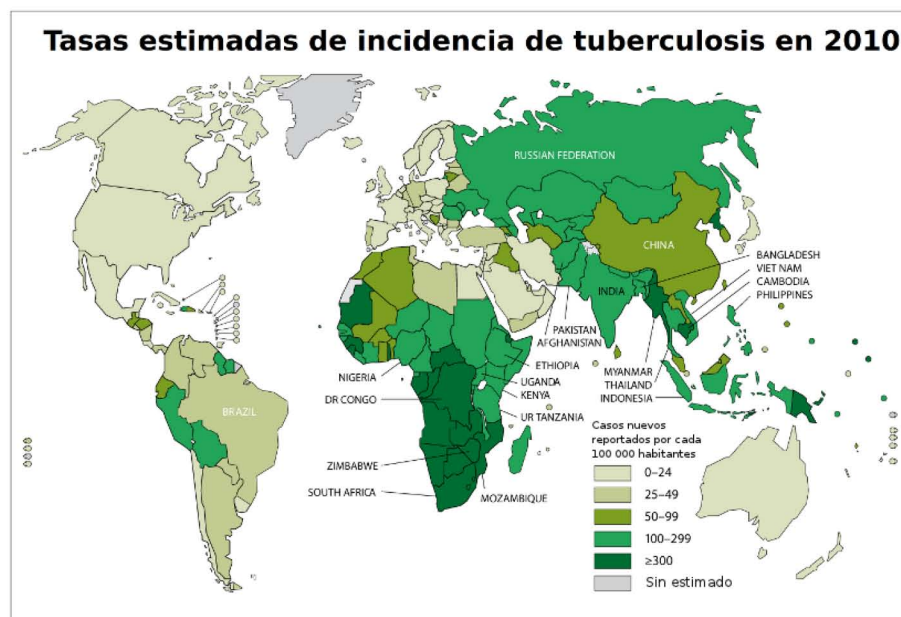


Figura 1.1: Incidencia de tuberculosis a nivel mundial en 2010 [WHO, 2010].

cobacterium pinnipedi, *Mycobacterium canneti*, *Mycobacterium caprae* y *Mycobacterium mungi*.

Los bacilos de la tuberculosis tienen forma de bastones de aproximadamente $4\mu\text{m}$ de largo y $0.5\mu\text{m}$ de diámetro (Figura 1.2). En medios de cultivo líquidos, se pueden encontrar en grupos o microcolonias similares a cuerdas, y son observables en un microscopio óptico con difracción de luz mediante una tinción de fenol y auramina. Una de las pruebas utilizadas para identificar a la bacteria es evaluando la producción de niacina. El bacilo de la tuberculosis es de crecimiento lento (la formación de colonias puede tardar de 2 a 6 semanas en medio de cultivo estándar). Las condiciones óptimas de crecimiento del bacilo son temperaturas de 33 a 39°C , pH de 6.5 a 6.8 y una atmósfera con 5 a 10% de CO_2 .

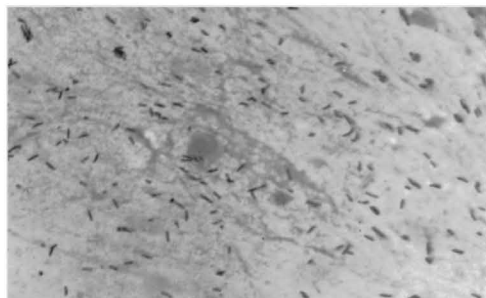


Figura 1.2: Tinción de Ziehl-Nielsen de una muestra de esputo, evidenciando la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* [Leitch, 2008].

1.1.2. Patogénesis y respuesta inmune a la tuberculosis

La tuberculosis se contrae por la inhalación de aerosoles expelidos por un individuo enfermo. Al ser inhalados, los aerosoles ingresan al espacio alveolar de los pulmones, donde los bacilos son fagocitados por los macrófagos. Si la respuesta innata, consistente en la activación de células fagocíticas y células presentadoras de antígeno, es altamente efectiva, la bacteria es eliminada del organismo. Si la respuesta inmune es insuficiente, la bacteria colonizará los tejidos pulmonares dando lugar a un cuadro clínico patológico, caracterizado por la aparición de granulomas con diversas morfologías. Cuando la bacteria inhibe la maduración de fagosoma producido, al ser fagocitada por los macrófagos evita la aparición de la respuesta antimicrobiana y previene la destrucción de la bacteria. En respuesta, el sistema inmune contiene los bacilos en estructuras llamadas granulomas, los cuales están rodeados de células inmunes. Dentro de los granulomas, la bacteria puede permanecer latente durante años hasta la aparición de algún factor que debilite el sistema inmune (edad o enfermedad, como en el caso del SIDA).

1.1.3. Métodos usuales de diagnóstico

La tuberculosis activa se diagnostica por la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en cualquier muestra del tracto respiratorio (en el caso de tuberculosis pulmonar) o fuera de él (si se trata de tuberculosis extrapulmonar). Aunque algunos métodos más modernos (como el diagnóstico molecular) han sido desarrollados, la visión microscópica de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) y el cultivo en medio Lowenstein-Jensen siguen siendo el estándar de oro del diagnóstico de la tuberculosis, especialmente en países con bajos recursos sanitarios. La microscopía de BAAR es rápida, barata y muy eficiente para detectar pacientes contagiosos. El cultivo se realiza cuando hay poca carga bacteriana y se requiere mayor sensibilidad. Asimismo, el cultivo es utilizado para la identificación de la cepa y para el estudio de sensibilidades a los distintos tratamientos. Tanto la microscopía como el cultivo pueden usarse para monitorizar el tratamiento.

1.1.4. Diagnósticos próximos al paciente para tuberculosis

Una solución propuesta al problema de diagnóstico de tuberculosis en comunidades marginadas es llevar las pruebas de diagnóstico a los pacientes en vez de traer a los mismos (o sus muestras) al laboratorio, para que el tratamiento apropiado pueda ser administrado con prontitud. A veces los pacientes, que esperan días o semanas por los resultados del examen, nunca vuelven para ser tratados; el diagnóstico POC puede reducir o posiblemente eliminar este problema de pérdida de seguimiento.

El enfoque, conocido como diagnóstico de *punto de atención* (point-of-care, o POC por sus siglas en inglés), se utiliza en los Estados Unidos para unas cuantas aplicaciones específicas, tales como las pruebas de glucosa en la sangre para los diabéticos, las pruebas caseras de embarazo, y las pruebas de estreptococo en el consultorio médico, así como las pruebas de detección de enfermedades de transmisión sexual administradas en las clínicas de salud y durante visitas domiciliarias a las comunidades desfavorecidas. Las futuras aplicaciones de la tecnología POC

podrán adoptar la forma de un laboratorio portátil de bajo costo que podría ser almacenado a largo plazo para su uso inmediato en caso de desastres naturales, como inundaciones o terremotos. Otra aplicación posible es un botiquín con una prueba casera que rastree los biomarcadores de interés y avise al médico si se observa una tendencia preocupante, como las indicaciones de un cáncer en estado temprano o enfermedades del corazón.

1.2. Polímeros semiconductores y su uso en aplicaciones biomédicas

1.2.1. Polímeros conductores

El estudio de los polímeros conductores ha cobrado gran importancia recientemente. Los polímeros conductores son polímeros orgánicos con la capacidad de conducir la corriente eléctrica. Las propiedades de los polímeros conductores van desde ser materiales semiconductores, hasta conducir la corriente eléctrica de forma similar a un metal. El primer material semiconductor conocido (el poliacetileno) fue sintetizado en 1958 [Ito et al., 1974]. En general, aquellos materiales que no consisten en elementos metálicos, pero presentan una alta conductividad, suelen denominarse “metales sintéticos”.

Los primeros polímeros orgánicos sintetizados eran electroaislantes. Las propiedades aislantes se deben al hecho de que todos los electrones del polímero están localizados en los enlaces orbitales moleculares híbrido-atómicos, es decir, en la estructura saturada en carbono del polímero. Estos materiales, que incluyen polímeros tales como el poli(n-vinilcarbazol) y el polietileno, presentan unas separaciones de banda extraordinariamente grandes, necesiéndose 5 eV para excitar electrones desde la valencia (HOMO) a la banda de conducción (LUMO). Las aplicaciones de dichos polímeros suelen el aislamiento o soporte cuando se necesitan un peso bajo y excelentes propiedades mecánicas y de transformación.

Estos polímeros se caracterizan por sus enlaces conjugados (enlaces simples y dobles alternados), que al ser dopados, mediante un proceso de oxidación o reducción se provoca la deslocalización de sus enlaces π , permitiendo el transporte de electrones en la cadena polimérica.

Las propiedades de los polímeros conductores pueden modularse de acuerdo a un proceso de dopaje, es decir, mediante la modificación del estado de oxidación o reducción de los polímeros conjugados. El dopaje en los polímeros semiconductores tiene efectos similares al dopaje en el silicio o germanio cristalinos. Al igual que en estos materiales, en un polímero conductor la adición de determinadas impurezas en cantidades traza da lugar a cambios en la conductividad de varios órdenes de magnitud. Sin embargo, en el proceso de dopaje en el silicio o germanio cristalinos, las impurezas añadidas ocupan ciertas posiciones dentro de la red del material (creando un exceso o deficiencia de electrones en el material, por ejemplo), mientras que en los polímeros conductores la adición del dopante produce una reducción u oxidación parcial del material, modificando la conductividad del mismo. La oxidación parcial de los polímeros conductores se denomina *dopaje tipo p*, mientras que la reducción parcial del polímero se denomina

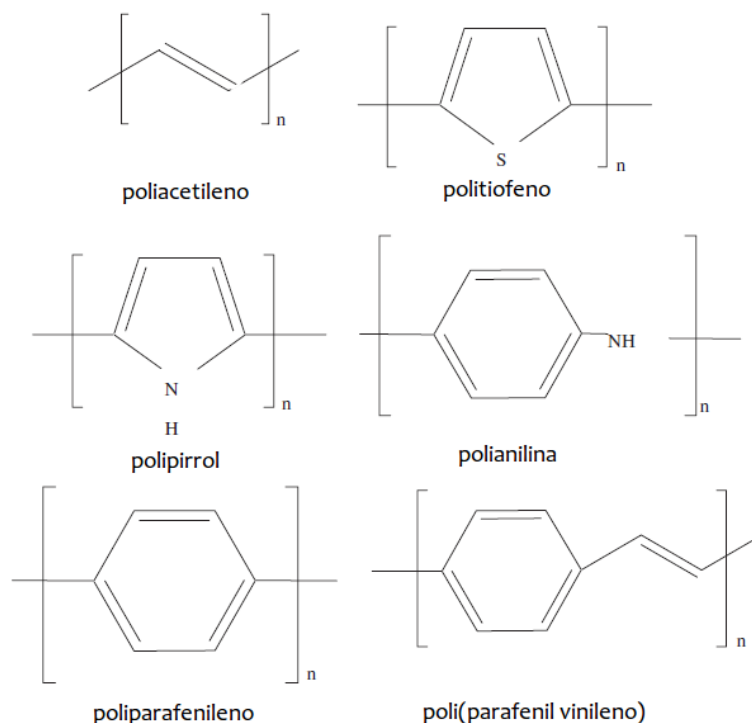


Figura 1.3: Estructura de algunos polímeros semiconductores [Palaniappan, 2008].

dopaje tipo n. En la Figura 1.3 se muestra la estructura de algunos polímeros semiconductores [Evans, 2008].

Las técnicas para sintetizar polímeros conductores se dividen en dos grandes ramas: técnicas químicas y técnicas electroquímicas. La síntesis por técnicas químicas se realiza a partir de un monómero, al cual se añade un catalizador. Este método presenta las desventajas de brindar poco control en la morfología de la película sintetizada, además de que puede dificultarse la obtención del producto deseado altamente puro. En el caso de la síntesis por método electroquímico, se requiere que el monómero utilizado a) tenga un potencial de oxidación accesible con el sistema de solventes adecuado, b) forme un radical catiónico que reaccione con otros monómeros antes que con cualquier nucleófilo en la solución electrolítica, y c) produzca un polímero con un potencial de oxidación mayor que el del monómero (si el material a producir es de alta conductividad). El procedimiento básico de síntesis electroquímica de polímeros semiconductores es el siguiente: el monómero se disuelve en un solvente adecuado, y se utiliza una celda de reacción para polimerizar anódicamente los materiales en el electrodo, ya sea en condiciones potencioestáticas o galvanostáticas [Evans, 2008].

1.2.2. Clasificación de los polímeros semiconductores

La inestabilidad del poliacetileno en el medio ambiente provocó la búsqueda de otros polímeros que presentaran las mismas propiedades conductoras. Esto se puede conseguir de

distintas maneras, mediante la conjugación de cadenas de átomos de carbono insaturados, átomos de carbono y heteroátomos o incluso cadenas de heteroátomos. Una clasificación de los distintos tipos de polímeros conductores se puede observar en la Figura 1.4.

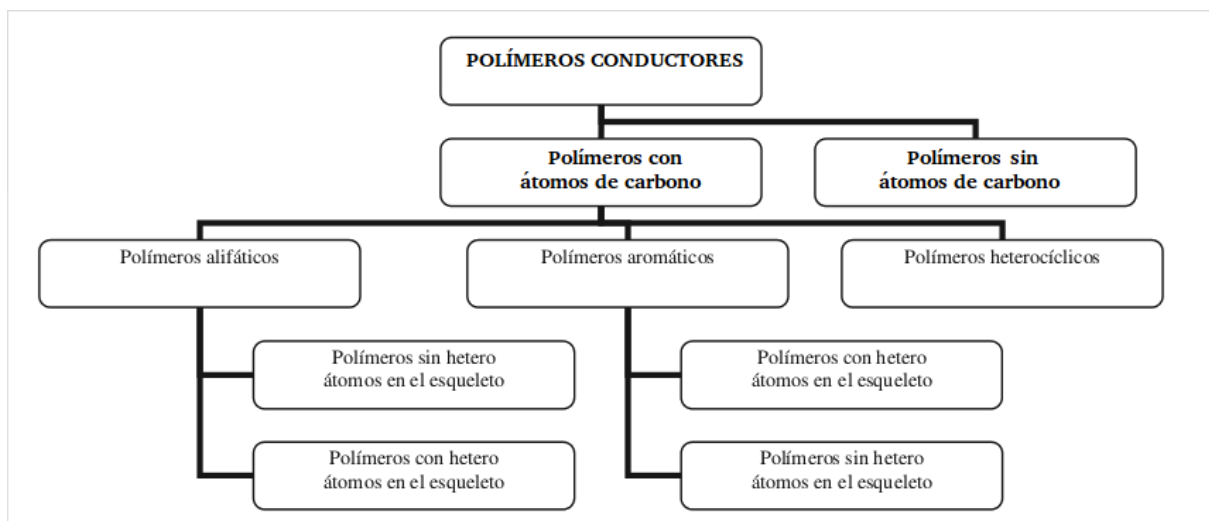


Figura 1.4: Clasificación de los polímeros conductores de acuerdo con su estructura [Pardilla, 2007].

1.2.3. Aplicaciones de los polímeros semiconductores

Las aplicaciones de los polímeros conductores son numerosas y variadas, entre ellas destacan: baterías orgánicas, visores electrocrómicos, sensores químicos, diodos emisores de luz, aditivos anticorrosivos, entre otras. Por otra parte, cualquier dispositivo que incorpore un polímero conductor requiere un compromiso entre la conductividad, la procesabilidad, la solubilidad y la estabilidad química y ambiental.

1.2.4. Polianilina (PANI)

El término *polianilina* se refiere a una familia de polímeros conductores con propiedades similares a algunos metales. Fue descubierta como negro de anilina en una forma orgánica como parte de la melanina en 1934. La melanina tiene diversas funciones en la naturaleza, incluida la protección de la piel mediante el control de la exposición UV. En forma natural, la polianilina generalmente se encuentra incorporada con otros polímeros.

La polianilina es polímero de tipo semiconductor, y puede ser modificada para una amplia gama de estados: de ser absolutamente no conductora para su uso como aislante hasta poseer una alta conductividad eléctrica para otros fines. Al igual que otros polímeros, la polianilina es muy flexible, lo que la hace atractiva para diversas aplicaciones de fabricación de materiales. Las distintas formas de la polianilina de acuerdo con su estado de oxidación se muestran en la Figura 1.5.

La polianilina viene en forma granular que puede ser mezclada con una sustancia química

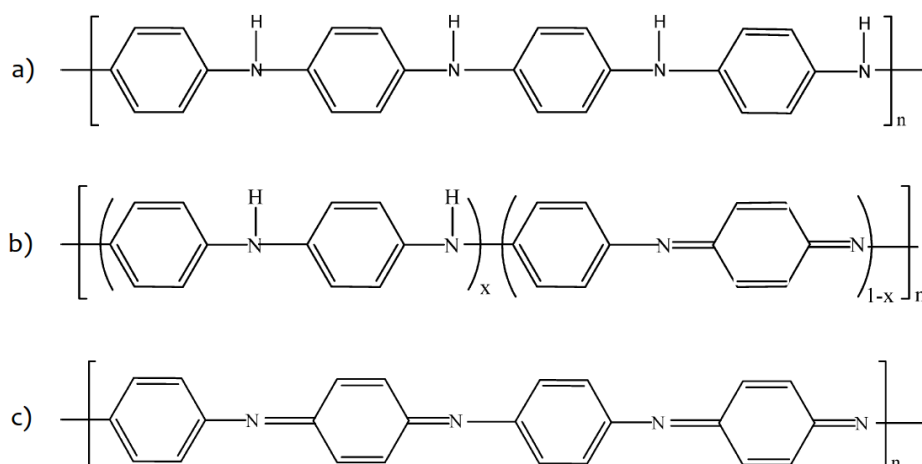


Figura 1.5: Formas de la polianilina de acuerdo con su estado de oxidación. a) Leucoemeraldina (completamente reducida), b) emeraldina (residuos oxidados y reducidos) y c) pernigranilina (completamente oxidada) [Palaniappan, 2008].

orgánica, y rociada sobre una sustancia para formar una película delgada. En la figura 1.6 se muestra la transición de polianilina emeraldina base (no conductora) a emeraldina sal (conductora).

La polianilina se obtiene por polimerización de moléculas de anilina a través de una reacción

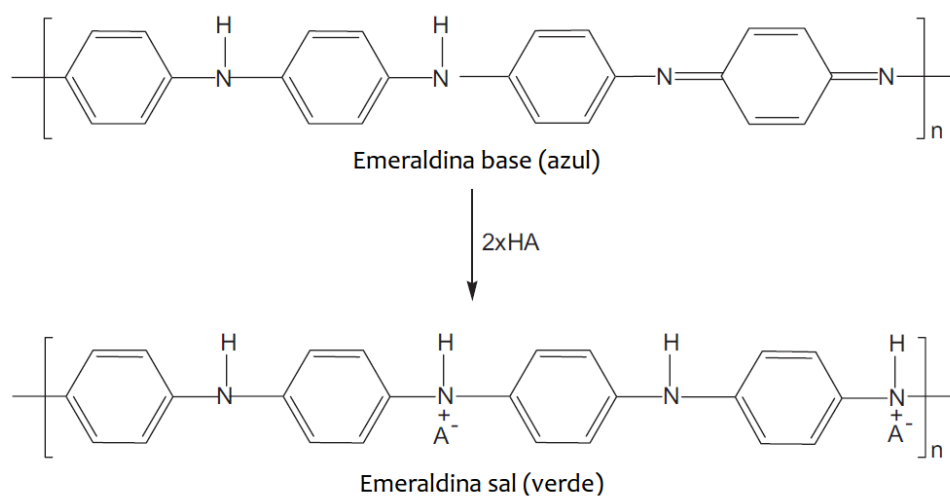


Figura 1.6: Protonación de PANI de emeraldina base para formar emeraldina sal [Palaniappan, 2008].

química con una sustancia como el ácido clorhídrico. Esto se realiza generalmente mediante la oxidación de las moléculas de anilina. Dependiendo de la conductividad deseada de la

polianilina, el polímero resultante será expuesto a otras sustancias químicas en un proceso conocido como dopaje. El dopaje de la polianilina conduce a un polímero más estable, y también le permitirá conducir la corriente de manera uniforme.

La polianilina se utiliza en una variedad de aplicaciones, ya que se puede combinar fácilmente con otros polímeros para obtener la forma deseada. Con frecuencia se utiliza en la industria informática, donde se incorpora a los envases antiestáticos y flexibles de componentes electrónicos, y en los experimentos que requieren de protección contra la radiación electromagnética.

1.3. Inmunodiagnóstico

Las técnicas basadas en reacciones entre un antígeno y su anticuerpo complementario, y utilizadas para cuantificar un analito, se denominan inmunoensayos.

1.3.1. Antígenos y anticuerpos

Los anticuerpos fueron los primeros elementos del sistema inmune en ser identificados. Son proteínas reactivas hacia moléculas específicas denominadas antígenos y se encuentran en el suero inmune. El suero inmune se obtiene después de la exposición de un organismo vertebrado ante un antígeno específico o inmunógeno. Por lo contrario, el suero normal o suero preinmune no contiene anticuerpos específicos contra dicho antígeno. Los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas, se pueden encontrar en el plasma y diversos fluidos extracelulares [Zouali, 2001]. La más común es la inmunoglobulina G (IgG), compuesta por dos regiones principales, estructural y funcional (Figura 1.7). Un antígeno es una molécula capaz de producir una respuesta inmune en un organismo. Las inmunoglobulinas se unen a sus antígenos correspondientes con alta especificidad. Es por ello que los anticuerpos pueden utilizarse para:

- Fines diagnósticos
- Neutralización de venenos y toxinas
- Vacunación activa
- Inmunoterapia, mediante el bloqueo de moléculas específicas en la superficie celular.
- Purificación y análisis de moléculas

Por otro lado, el término “antígeno” se refiere a cualquier molécula reconocible por el sistema inmune. Puede tratarse de un compuesto químico simple o una macromolécula compleja. Cada antígeno es reconocido de forma específica por uno o más elementos del sistema inmune innato y adaptativo. A pesar de que los antígenos pueden ser reconocidos por determinados elementos del sistema inmune tales como las inmunoglobulinas o los receptores de las células T, un antígeno no necesariamente desencadena una respuesta inmune específica de dicha molécula. Los antígenos que desencadenan una respuesta inmune se denominan

inmunógenos; la capacidad de provocar una respuesta inmune se llama *inmunogenicidad* [Saha, 2001].

1.3.2. Reacciones antígeno-anticuerpo

La unión de un antígeno y un anticuerpo implica la formación de múltiples interacciones entre el antígeno y los aminoácidos del sitio de unión (puentes de hidrógeno, atracción electrostática, etc). El conjunto de todas estas interacciones resulta en la unión de energía total. La afinidad en una reacción antígeno-anticuerpo está determinada por la constante de equilibrio (K) de dicha interacción. La expresión de la constante de equilibrio (ecuación 1.1) es la suma de las tasas a las cuales el antígeno y el anticuerpo se combinan y se disocian [Goldblatt, 2011].

$$k = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]} \quad (1.1)$$

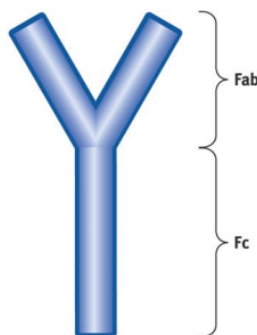


Figura 1.7: Estructura del anticuerpo y sus puntos funcionales. La región Fab contiene el punto de unión del antígeno (Ag) que varía entre diferentes anticuerpos, mientras que la región Fc es la región de estructura constante dentro de una clase de anticuerpo.

1.3.3. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) y sus variantes

Los inmunoensayos enzimáticos (IEE) se basan en dos estrategias fundamentales: la reacción entre los inmunorreactantes antígeno- anticuerpo; y la detección de esta reacción usando la capacidad catalítica y específica de las enzimas conjugadas al antígeno. En la Figura 1.8 se encuentra esquematizado el inmunoensayo enzimático.

A mediados de la década de los 60's se desarrollaron estas técnicas para la identificación y localización de antígenos en preparaciones histológicas. Desde entonces hasta la fecha se han desarrollado técnicas nuevas o modificaciones de las existentes, incrementándose la variedad de procedimientos que tienen como objetivo principal la necesidad de revelar y amplificar la señal de la presencia de antígenos, aún a muy bajas concentraciones a través de la inmunolocalización con anticuerpos.

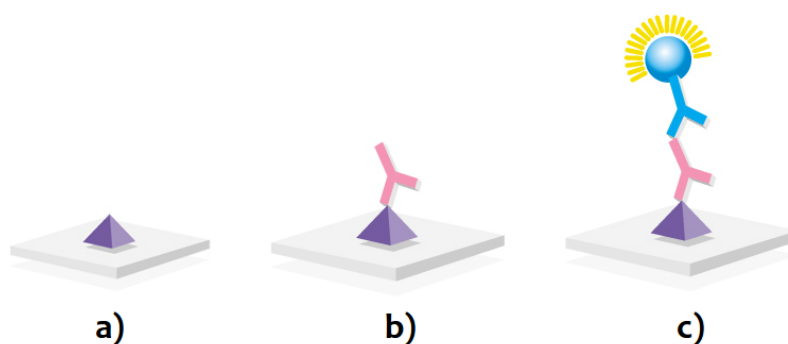


Figura 1.8: Esquema general del ensayo inmunoenzimático. En primer lugar, un antígeno previamente purificado se inmoviliza en la plataforma de reacción (a). A continuación, la plataforma captará anticuerpos específicos contra el antígeno seleccionado al entrar en contacto con el fluido a analizar (b). Por último, la reacción es puesta en evidencia mediante un segundo anticuerpo, capaz de reconocer el fragmento Fc del anticuerpo capturado, y acoplado a un colorante o un compuesto fluorescente (c). Este proceso permite medir cuantificar los anticuerpos presentes en la muestra.

Los inmunoensayos enzimáticos presentan alta sensibilidad, especificidad, y detectabilidad. El costo del equipo para realizar estas pruebas es relativamente bajo. Además, pueden realizarse con rapidez (horas) y los reactivos utilizados tienen una vida útil larga.

Marcaje de antígenos y marcaje de anticuerpos.

La cuantificación de analitos en un inmunoensayo se puede llevar a cabo mediante el marcaje de moléculas específicas tales como antígenos o anticuerpos (Figura 1.9).

Las enzimas más utilizadas en las técnicas para el marcaje de antígenos o de anticuerpos son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina (FA) de mucosa intestinal de ternera. Esta última es la favorita por su bajo costo, su fácil conjugación y la amplia variedad de sustratos que posee. No obstante existen otras como son: microperoxidasa, citocromo C, glucosa oxidasa, acetilcolinesterasa, anhidrasa carbónica, glucoamilasa, ureasa, y galactosidasa, entre otras [Paulie et al., 2001].

1.3.4. Sistemas microelectromecánicos (MEMS) como una alternativa para inmunodiagnóstico rápido

La detección de anticuerpos en microsistemas puede realizarse aprovechando la tecnología de los microfluidos, los cuales utilizan los sistemas microelectromecánicos para el transporte y manipulación de fluidos. Por ejemplo, de forma reciente se han integrado estos sistemas para la realización de inmunoensayos enzimáticos, determinaciones electroquímicas, entre otros. Los biosensores microfluídicos ofrecen una atractiva alternativa a los métodos tradicionales de análisis debido a que reducen el volumen requerido de muestra, incrementan la sensibilidad y permiten analizar múltiples muestras simultáneamente gracias a la automatización. Por ejemplo, el uso de inmunoensayos enzimáticos junto con sistemas de inyección de flujo y detecciones electroquímicas, representan una poderosa herramienta para la detección de niveles de analito

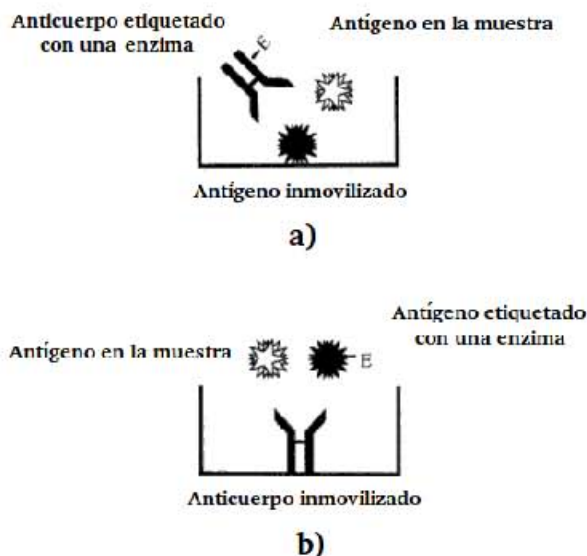


Figura 1.9: ELISA competitivo para la detección de antígenos. En a) la competición está determinada por el antígeno en la muestra, una cantidad fija de antígeno unido al soporte y anticuerpo etiquetado con una enzima. En b), la competición se define por una cantidad fija de anticuerpo inmobilizada en el soporte y antígeno etiquetado con una enzima.

que serían indetectables por otras técnicas. Específicamente, los inmunosensores electroquímicos están comenzando a ser cada vez más utilizados debido a que combinan la alta especificidad de los inmunoensayos tradicionales con los bajos límites de detección y costo de los sistemas electroquímicos [Messina et al., 2008].

En los inmunosensores basados en sistemas microelectromecánicos, se encuentran transductores que emiten una señal característica en respuesta a una determinada concentración de antígeno o anticuerpo. En un sistema microelectromecánico, un inmunosensor puede basarse en cambios de peso o de conductividad, entre otros.

Sistemas microelectromecánicos (MEMS)

Los sistemas microelectromecánicos (Figura 1.10) son dispositivos diseñados a escala micrométrica con la tecnología con la que se fabrican los chips de computadora. Estos sistemas consisten en estructuras de silicio cristalino y silicio amorfo, micromaquinados de tal forma que incorporan partes eléctricas y partes mecánicas como canales, vigas micrométricas, engranes, entre otros.

En la década pasada, esta tecnología tuvo un gran crecimiento. El uso de los sistemas microelectromecánicos en distintas áreas de la industria siga aumentando en los próximos años. Esto se debe a que los sistemas microelectromecánicos pueden producirse en grandes volúmenes a bajo costo con la misma tecnología con la que se fabrica un chip de silicio. Adicionalmente a estos beneficios económicos, estos sistemas permiten la integración a escala micrométrica de

elementos altamente sofisticados tales como sensores, actuadores, dispositivos generadores de energía, entre otros [S.M y Spearing, 2000].

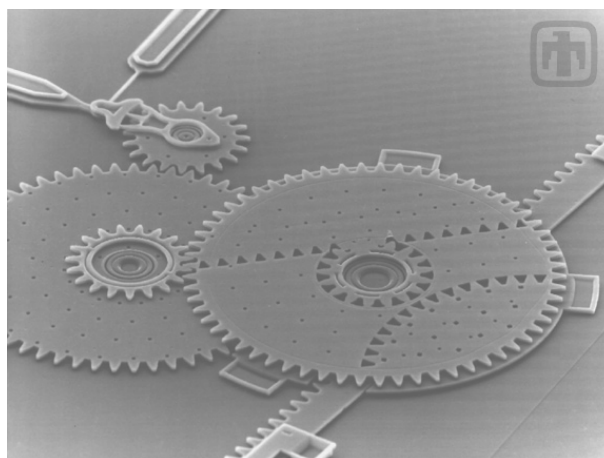


Figura 1.10: Micrografía de un sistema microelectromecánico [Sandia National Laboratories, 2011].

Inmovilización de reactivos para inmunodiagnóstico

Los inmunodiagnósticos generalmente se implementan en biosensores donde los reactivos inmovilizados suelen ser de carácter proteico. A continuación se mencionan algunas de las principales técnicas de inmovilización de bioreactivos para inmunosensores [Sassolas et al., 2011] (Figura 1.11):

- Atrapamiento del reactivo en el polímero o material de soporte. Algunas técnicas para realizar esta incorporación del bioreactivo son la electropolimerización, fotopolimerización y proceso de sol-gel.
- Adsorción del bioreactivo en el soporte. Por ejemplo, adsorción física o interacciones electrostáticas.
- Enlaces cruzados.
- Inmovilización covalente; por ejemplo, por activación de grupos amino o carboxilo o quimiosorción.
- Afinidad. Por ejemplo, aprovechando la interacción biotina-avidina o metal-ion quelante.

Diseño básico de un MEMS de diagnóstico

Un sistema microelectromecánico adaptado con fines diagnósticos permite aprovechar las ventajas de la tecnología lab-on-a-chip (laboratorio en un chip); es decir, un sistema que integra múltiples funciones bioanalíticas en un instrumento pequeño y portátil. Básicamente, estos dispositivos brindan todas las herramientas presentes en un laboratorio analítico, pero en un

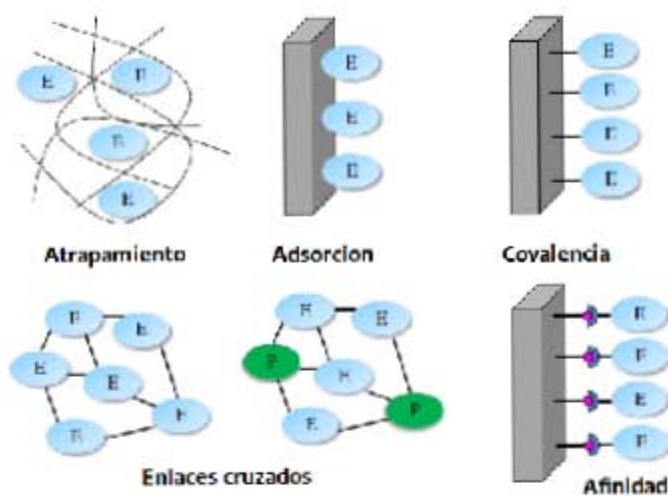


Figura 1.11: Estrategias de inmovilización de proteínas para biosensores. E representa la proteína inmovilizada. Adaptado de [Sassolas et al., 2011].

sistema miniaturizado a microescala o nanoescala. Estas características brindan ventajas adicionales tales como uso reducido de reactivos, incremento en la rapidez de análisis de la muestra, desempeño mejorado, aumento de sensibilidad, portabilidad, automatización de procesos bioanalíticos complejos, facilidad de uso, y una arquitectura aislada que minimiza el error por contaminación ambiental.

El diseño de un dispositivo de diagnóstico que detecte biomarcadores específicos en fluidos biológicos debe considerar los siguientes elementos:

- Sistema de recepción de la muestra: si se trata de un fluido biológico como una muestra de sangre, el ingreso puede realizarse por capilaridad.
- Separación o pre-enriquecimiento de la muestra: este paso consiste en separar algún componente no deseado de la muestra (por ejemplo, células sanguíneas), o enriquecer la misma mediante mecanismos físicos o químicos para incrementar la concentración del biomarcador buscado.
- Mecanismos de transporte de la muestra: tratándose de un fluido biológico, este mecanismo puede consistir en un sistema de microcanales, microbombas y válvulas que dirijan el fluido entre las distintas etapas del sistema de análisis.
- Cámara de detección: es el compartimento o compartimentos en los que ingresa la muestra ya lista para la detección del analito. En un microsistema, existen varias posibilidades de mecanismos de detección (flexión de una estructura en el microsistema por efecto de peso, cambios de conductividad, transducción electroquímica, etc). Estos cambios en parámetros clave se transducen por algún mecanismo a una señal interpretable por el microsistema y, más adelante, por algún sistema externo al biochip.

- Sistema de control: dispositivo o controlador que coordina los pasos del análisis y realiza el análisis de datos.

1.4. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

La espectroscopía de impedancia electroquímica o EIS fue utilizada en un principio para determinar la capacitancia de doble capa en polarografía de corriente alterna. En la actualidad, esta técnica está siendo utilizada para caracterizar procesos en electrodos e interfaces complejas. Mediante EIS, es posible analizar la impedancia Z de un sistema al aplicar una señal alterna periódica de baja intensidad. Las mediciones se llevan a cabo en diferentes frecuencias; y el análisis de la respuesta del sistema brinda información acerca de las interfases, estructura y reacciones que se llevan a cabo en dicho sistema. Actualmente, EIS ya es considerada una técnica básica en electroquímica.

De forma reciente, han surgido diversas aplicaciones de EIS para caracterizar interfases con el objetivo de monitorear reacciones antígeno anticuerpo utilizando un transductor electroquímico. Por ejemplo, en 2011, Zamfir y colaboradores desarrollaron un inmunosensor sin reactivos secundarios para la detección de ocratoxina A (OTA), (una toxina que puede encontrarse en determinados cereales y semillas). La variación de impedancia para el sistema anticuerpo-OTA se correlacionó linealmente con la concentración de la toxina obteniendo un límite de detección de 0.01 ng/ml [Zamfir et al., 2011].

1.4.1. Conceptos básicos en espectroscopía de impedancia electroquímica

La impedancia es un parámetro más general que la resistencia eléctrica, aunque en términos generales puede interpretarse como la capacidad de un circuito para oponerse al flujo de corriente eléctrica. Sin embargo la impedancia a diferencia de una resistencia, no sigue la ley de Ohm, es dependiente de la frecuencia y causa un cambio de fase en una señal de corriente alterna aplicada. Los análisis de espectroscopía de impedancia se realizan generalmente en una celda electroquímica. A bajas amplitudes de la señal aplicada, la corriente resultante en el circuito presentará la misma frecuencia que la corriente de entrada, pero con un desplazamiento de fase (Figura 1.12). Esto se debe a que la celda electroquímica presenta un comportamiento “pseudo-lineal”.

La señal de excitación, expresada en función del tiempo, se expresa como se indica en la ecuación 1.2:

$$E_t = E_o \sin \omega t \quad (1.2)$$

Donde E_t es el potencial en el tiempo, E_o la amplitud de la señal y ω la frecuencia angular. En un sistema lineal, la señal de respuesta I_t tendrá un desplazamiento de fase ϕ y la amplitud, I_o , será distinta a la amplitud original. De forma análoga a la ley de Ohm, la impedancia del sistema es:

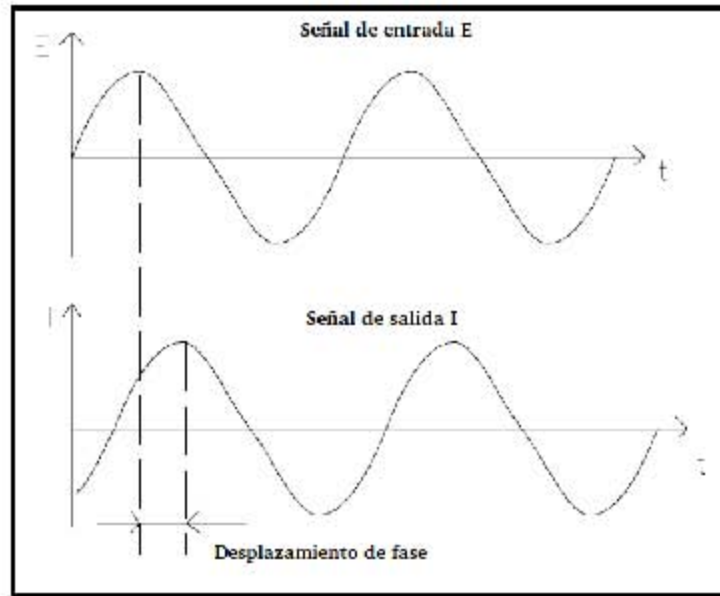


Figura 1.12: Respuesta de un sistema lineal a una señal senoidal.

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \phi)} \quad (1.3)$$

Utilizando la relación de Euler, la impedancia Z_0 se puede representar como un número complejo:

$$Z(\omega) = \frac{E}{I} = Z_0 \exp j\phi = Z(\cos\phi + j\sin\phi) \quad (1.4)$$

La ecuación 1.4 muestra a la impedancia como un parámetro con componentes real e imaginaria. Graficando ambas componentes se puede obtener un diagrama llamado *Diagrama de Nyquist*. En el diagrama de Nyquist la impedancia puede representarse como un vector de magnitud $|Z|$ con un ángulo de fase ϕ . La principal desventaja del diagrama de Nyquist es que no brinda información acerca de la frecuencia correspondiente a un punto en la gráfica. En la Figura 1.13 se muestra un circuito con una constante de tiempo única y en la Figura 1.14 se muestra su diagrama de Nyquist.

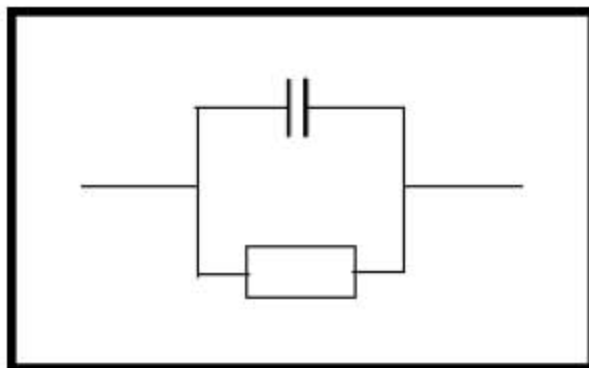


Figura 1.13: Circuito simple con una sola constante de tiempo.

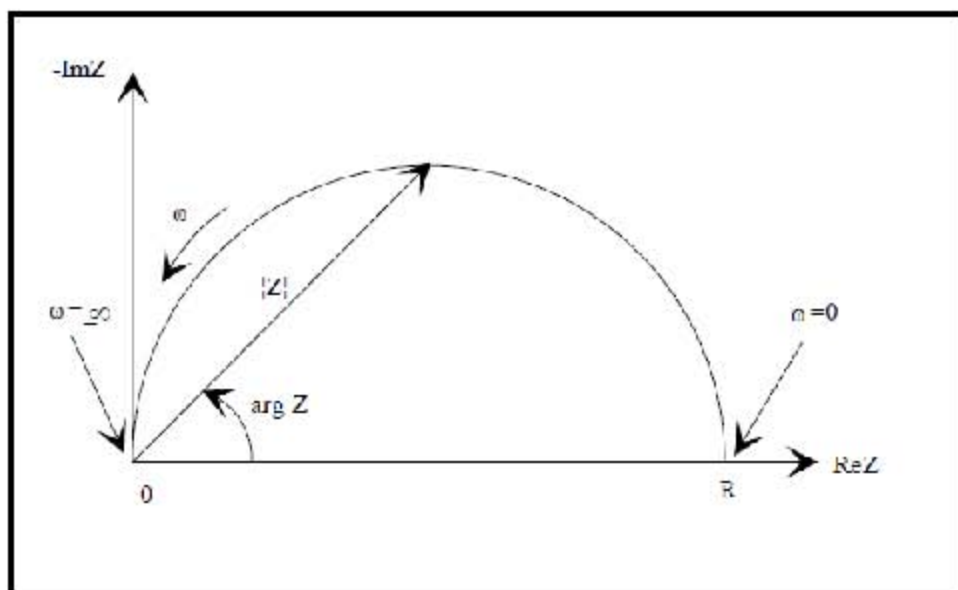


Figura 1.14: Diagrama de Nyquist de un circuito con una sola constante de tiempo. Estos circuitos se caracterizan por tener un diagrama con un único semicírculo.

Hipótesis

Es posible detectar amperométricamente la presencia de anticuerpos específicos de individuos con tuberculosis, en suero, mediante una plataforma de diagnóstico basada en polímeros semiconductores.

Objetivos

1.5. Objetivo general

- Desarrollar una plataforma basada en polímeros semiconductores para la detección electroquímica de biomarcadores asociados con tuberculosis activa.

1.6. Objetivos específicos

- Producir el antígeno di-*O*-aciltrealosa (DAT) y anticuerpos policlonales anti-DAT, bioreactivos de alta especificidad para inmunodiagnóstico de tuberculosis.
- Inmovilizar DAT sobre una película delgada de polímero conductor, la polianilina (PANI), sintetizada sobre soportes de vidrio y de óxido de estaño e indio (ITO).
- Evaluar una plataforma para medir la reacción antígeno-anticuerpo mediante cambios en el espectro de impedancia del polímero por la captura de un ligando (anticuerpos específicos de tuberculosis activa) sobre el soporte conductor.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1. Purificación y caracterización del antígeno di-*O*-aciltrealosa (DAT)

2.1.1. Cromatografía de adsorción en columna

Para obtener fracciones lipídicas enriquecidas en el antígeno di-*O*-aciltrealosa (DAT), se obtuvo el extracto lipídico total de cultivos de *Mycobacterium fortuitum* (bacteria no patógena que comparte el glicolípido DAT con *Mycobacterium tuberculosis*). Los cultivos fueron realizados durante 15 días en medio líquido de Sauton.

El extracto lipídico se obtuvo por incubación de los cuerpos celulares inactivados en cloroformo-metanol (1:2, vol/vol) durante 2 hrs a 50°C separó mediante cromatografía de adsorción en columnas de gel de sílice (FlorisilTM, Supelco). Como eluyente, se utilizó una serie de mezclas de solventes de metanol en cloroformo. Se agregó al cloroformo el metanol en concentraciones crecientes, como previamente reportado [Escamilla et al., 1996]. Se purificó DAT a partir las fracciones ricas en el lípido, mediante cromatografía en columnas de sílice Sep-Pack de 12cc. La separación se realizó con cloroformo-metanol, utilizando las siguientes concentraciones de metanol en cloroformo: 5, 10, 15 y 20% (v/v). Se evaporó el solvente en todas las fracciones obtenidas en un concentrador Multiblock (LabLine), y proporcionado una corriente de nitrógeno de alta pureza. Se guardaron las fracciones obtenidas a 4°C en ambiente de nitrógeno.

En los siguientes apartados se describe la caracterización del antígeno por distintas técnicas, realizadas para confirmar la identidad del lípido y para determinar la composición en ácidos grasos del lote obtenido.

2.1.2. Análisis de reactividad química y movilidad cromatográfica: cromatografía en capa fina

El DAT consiste en dos unidades de glucosa unidas en posición 1,1', y dos residuos acilo sustituyendo las posiciones 2 y 3 de una de las glucosas (Figura 2.1). Se trata de una familia de

moléculas basadas en ácidos grasos que varían de acuerdo con las condiciones de crecimiento de la bacteria. Este antígeno fue monitoreado dentro de los productos grasos de *Mycobacterium fortuitum* gracias a la característica de los grupos hexosa (glucosa) para generar un derivado cromogénico ante la reacción con antrona en presencia de ácido sulfúrico (figura 2.2).

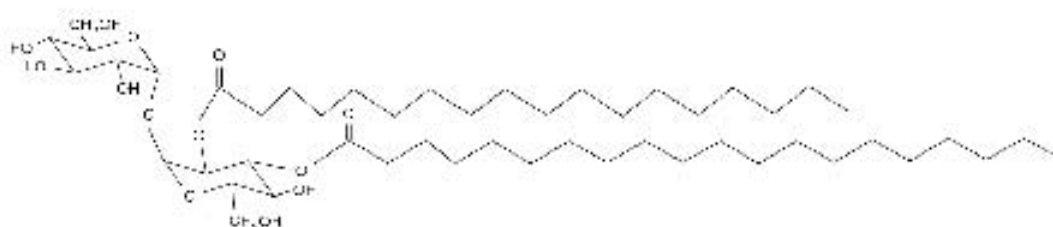


Figura 2.1: Estructura de la di-2,3-*O*-aciltrealosa (DAT), lípido característico de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium fortuitum*.

El antígeno fue monitoreado dentro de los productos grasos de *Mycobacterium fortuitum* gracias a la característica de los grupos hexosa (glucosa) para generar un derivado cromogénico ante la reacción con antrona en presencia de ácido sulfúrico (figura 2.2). Para ello se realizó un análisis por cromatografía en placa fina (CCF).

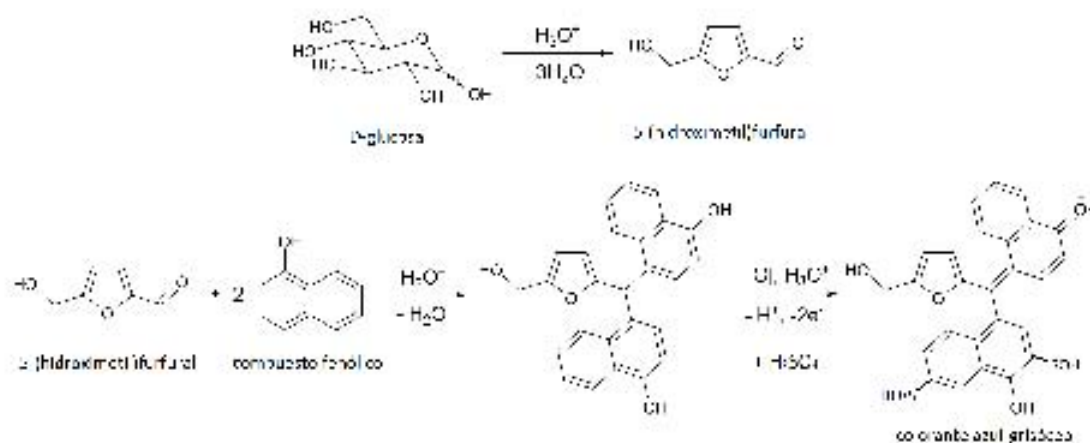


Figura 2.2: Reacción de antrona para identificación de azúcares en los productos separados por cromatografía sobre capa fina.

Se punteó con pipetas Pasteur una muestra de cada fracción, así como un estándar de DAT, en una placa de vidrio con gel de sílice, de 20x20cm. Se introdujo la placa en una cámara de vidrio con 50ml de una mezcla 80-20 (v/v) de cloroformo-metanol. Se dejó secar la placa y se reveló con una solución de antrona al 2% en H_2SO_4 . Para visualizar los lípidos en la placa, se calentó la misma durante 5 min a $100^\circ C$. Las fracciones que contenían DAT se secaron, cuantificaron y almacenaron nuevamente.

Espectroscopía FTIR

El DAT purificado se analizó por espectroscopía FTIR (espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier) para identificar los grupos funcionales característicos del compuesto. El análisis se realizó por transmitancia en pastillas de DAT con KBr (que no absorbe radiación en la región de infrarrojo) en el intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} .

2.1.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Para determinar la composición de la cadena de ácido graso del antígeno purificado, se saponificó el DAT obtenido con 2 ml de KOH metanólico 1N y se calentó a 80 °C por 60 min. Los ácidos grasos se extrajeron tres veces utilizando en cada ocasión 1 ml de hexano, y se derivatizaron a metil ésteres con diazometano etéreo. Las muestras se analizaron por cromatografía líquida de gases acoplada a espectrometría de masas en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N equipado con una columna capilar de sílice (HP-5MS 5% fenil metil siloxano, 30 m x 0,25 mm de diámetro, espesor de la película de 0.25 μm), combinado con un detector selectivo de masas tipo cuadrupolo (HP 5975, Agilent Technology, Massy, Francia). Los espectros de masas se registraron a 70 eV en modo de impacto de electrones. Se disolvieron los compuestos en 100 μl de cloroformo y se inyectó en la columna 1 μl sin divisor de flujo a 250 °C. La temperatura del horno se mantuvo 5 min a 150 °C, después de lo cual se incrementó a 182 °C a una tasa de 1 °C/min y posteriormente se incrementó hasta 230 °C siguiendo una rampa de 15 °C/min. La temperatura final se estabilizó durante 10 min antes de volver a las condiciones iniciales. Se utilizó helio como gas acarreador a un flujo constante de 1 ml/min. Con el fin de obtener la distribución porcentual de ácidos grasos en muestras, se realizó un monitoreo de iones selectos (SIM) para determinar las señales con un cociente carga-masa (m/z) igual a 74 (Thurnhofer y Vetter, 2005).

2.2. Obtención de anticuerpos policlonales anti-DAT en conejo

Uno de los requisitos para el diseño de un biosensor es la disponibilidad de inmuno-reactivos que puedan ser utilizados en todas las etapas del desarrollo. En este caso, además del antígeno purificado, requeríamos de un suero con anticuerpos dirigidos en contra del antígeno DAT. Para este fin, se obtuvo suero hiperinmune de conejo con altas concentraciones de anticuerpos contra DAT. Se inmunizaron dos conejos Nueva Zelanda con 5 mg de DAT en 0.5 ml de solución salina isotónica (SSI, NaCl al 0.85 %) y 0.5 ml de adyuvante completo de Freund (CFA, Sigma). Se dieron dos refuerzos con 10 y 40 días de diferencia, inyectando 3 mg de DAT en 0.5ml de SSI y 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund (IFA, Sigma). El esquema de inmunización se muestra en la siguiente tabla. Se sangraron los conejos los días 0, 10, 40, 60 y 80.

Día	Tratamiento	Sangrado
0	5 mg de DAT en 0.5 ml SSI + 0.5 ml CFA	t = 0
10	3 mg de DAT en 0.5 ml SSI + 0.5 ml IFA	t = 1
40	3 mg de DAT en 0.5 ml SSI + 0.5 ml IFA	t = 2
60	-	t=3
80	-	t=4

Todas las muestras de sangre se colectaron en tubos de ensayo y se dejaron coagular a temperatura ambiente por 2 a 3 horas sin aditivos. Posteriormente, se separó el suero de las muestras centrifugando 10 minutos a 1500 rpm (ca. 250 g). Se separó el suero en alícuotas de 200 μ l y se almacenó a -20 °C.

2.3. Síntesis de polianilina (PANI) en película delgada

La plataforma seleccionada para detectar anticuerpos asociados con tuberculosis activa fue la polianilina (PANI) en película delgada. Se escogió PANI como plataforma de inmovilización debido a que las propiedades ópticas de este polímero semiconductor se pueden modificar de acuerdo con su estado de dopaje (cantidad de portadores de carga en el polímero). Además, la polianilina es biocompatible y puede obtenerse de forma sencilla y a bajo costo.

Se sintetizaron películas de PANI por oxidación química de anilina ($C_5H_5NH_2$, Sigma) destilada en atmósfera de nitrógeno. La síntesis se realizó en medio acuoso, entre 0 °C y 4 °C, con HCl (J.T.Baker) como dopante y persulfato de amonio (APS, $(NH_4)_2S_2O_8$, Aldrich) como agente oxidante. En un cristizador con hielo, se colocó un vaso de precipitado con 74 ml de HCl 1M. Se añadió a la solución 0.36 ml de anilina y se dispersó el monómero durante 20 minutos por agitación magnética. A continuación se añadió la solución del oxidante (0.9 g de APS disueltos en 6 ml de agua) por goteo lento con una bureta. Se lavaron 4 vidrios Corning con jabón Extrán al 2%. En el momento de observar una ligera tonalidad azul en la solución (debido a la formación de PANI), se colocaron los vidrios en el vaso, cuidando que no tocaran el agitador magnético (Figura 2.3). Después de observar la aparición del color azul, se dejó el sistema en agitación durante aproximadamente 45 min. Transcurrido este tiempo se retiraron de la solución los vidrios, en los cuales se depositó una capa homogénea de PANI de color verde brillante. Se limpió la cara que quedaba pegada a la pared del vaso y se enjuagó la película de PANI con un poco de solución de HCl. Finalmente, se dejaron secar y almacenaron las películas de PANI obtenidas (Figura 2.4). Se realizó el mismo proceso para sintetizar PANI, en portaobjetos de vidrio recubiertos con ITO y sustratos plásticos de PET (tereftalato de polietileno).

2.3.1. Espectroscopía infrarroja UV-visible

Se analizaron las películas mediante espectroscopía FTIR en el intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} . El equipo utilizado fue un Vector 33 de la marca Bruker. También se realizó análisis UV-vis, en un equipo Genesys 2PC, marca Spectronic. El intervalo de análisis fue de 400 a 1100 nm. Se analizaron las siguientes muestras: PANI sin modificar, PANI modificada con una mezcla 1:1,



Figura 2.3: Proceso de síntesis de películas delgadas de polianilina.

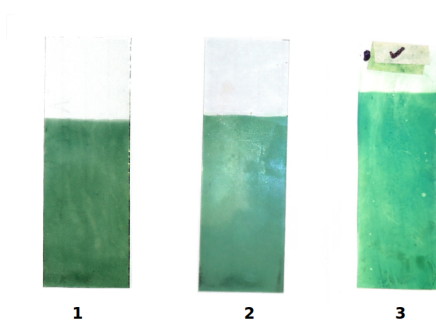


Figura 2.4: Películas delgadas de polianilina sintetizadas por baño químico en soportes de 1) vidrio Corning, 2) vidrio recubierto de óxido de estaño e indio (ITO) y 3) polietileno (PET).

vol/vol hexano-etanol, y PANI modificada con 20 μ g de DAT disueltos en hexano-etanol etanol (1:1, vol/vol).

2.4. Preparación del inmunosensor

Se cortaron las películas de PANI depositadas sobre vidrio, ITO o PET en placas cuadradas de 1cm por lado, utilizando un cortador de vidrio y dos portaobjetos como soporte. Se añadió a cada placa cubierta de PANI, 20 μ g de DAT disueltos en una mezcla de hexano-etanol (1:1, vol/vol). Se utilizó hexano (J.T. Baker) recién destilado y etanol grado reactivo (J.T. Baker). Se dejó evaporar el solvente en una campana de extracción.

2.5. Validación de los anticuerpos obtenidos mediante inmunoensayo enzimático (ELISA)

2.5.1. ELISA convencional para antígenos grasos

El suero obtenido mediante inmunización de conejos se tituló mediante inmunoensayo enzimático convencional (ELISA). Se utilizó una placa de microtitulación de 96 pozos (Polysorp, NUNC). Se depositaron 2 μ g de DAT en cada pozo disuelto en 100 μ l de una mezcla

de hexano-etanol (1:1, vol/vol), como se describió anteriormente (por ensayos preliminares, se determinó la cantidad de antígeno utilizada). Se dejó incubando la placa a 37 °C toda la noche. Se añadió a cada pozo 200 µl de BSA al 3 % (w/v) en PBS y se incubó 2 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS y se depositó en cada pozo 50 µl de la correspondiente dilución de suero, dejando incubar toda la noche a 4 °C. A continuación se realizaron 5 lavados con PBS y se añadió a cada pozo 100 µl de anti-IgG conjugado a fosfatasa alcalina y diluido 1:10 000 en BSA al 0.3 % en PBS (w/v), dejando incubar 2 h a 37 °C. Finalmente se realizaron 5 lavados con BSA al 0.3 % en PBS y se añadió a cada pozo 100 µl de *paranitrofenilfosfato* al 0.1 % en tampón de dietanolamina ajustado a un pH de 9.8. Se incubó por 15 min a 37 °C y se leyó la absorbancia a 415 nm en un lector de microplaca (iMark Microplate Reader, BioRad).

2.5.2. Pruebas de bioactividad del antígeno inmovilizado: ELISA modificado sobre PANI

Los análisis espectroscópicos del soporte confirmaban que el antígeno fue exitosamente adsorbido por el polímero conductor. Para comprobar que la actividad del antígeno se conservaba después de esta inmovilización, se realizó un ensayo en el cual la capacidad del antígeno para capturar anticuerpos inmunespecíficos fue evaluada mediante inmunoensayo enzimático colorimétrico.

Películas de PANI obtenidas sobre soportes de vidrio o sobre ITO mostraron poca estabilidad frente a los procesos de incubación y lavados correspondientes al inmunoensayo enzimático (no mostrado). Por esta razón, el soporte de PANI fue sintetizado sobre películas de PET, el cual resultó ser el soporte polimérico en el cual la película presentó mayor estabilidad frente a los procesos descritos.

Se utilizaron películas de PANI de 1 cm² depositadas sobre vidrio o ITO, y modificadas como se describió en la Sección 6.4. Se realizó el ensayo en una placa de 24 pozos (Nunc Surface, NUNC). Se añadió a cada cuadro 20 µg de DAT disueltos en 70 µl de una mezcla hexano-etanol (1:1, vol/vol) y se colocó un cuadro de PANI sobre vidrio o ITO en cada uno de los pozos de la placa. Se dejó incubando la placa, cubierta con aluminio, toda la noche a 37°C. Se añadió a cada pozo 500 µl de BSA al 3 % (w/v) y se incubó 2h a 37°C. Se realizaron 3 lavados con PBS y se depositó en cada placa 100 µl de la correspondiente dilución de suero, dejando incubar 2 h a 37°C. Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS y se añadió a cada pozo 200 µl de anti-IgG conjugado a fosfatasa alcalina y diluido 1:10 000 en BSA al 3 % en PBS (w/v), dejando incubar 2h a 37 °C. Por último, se realizaron 5 lavados con BSA al 0.3 % en PBS y se añadió a cada pozo 200 µl de *paranitrofenilfosfato* al 0.1 % en tampón de dietanolamina (pH =9.8) Se incubó por 15 min a 37 °C. Se transfirió 100 µl de cada pozo a una placa de microtitulación de 96 pozos para ELISA convencional, y se leyó absorbancia a 415 nm en un lector de microplaca (iMark Microplate Reader, BioRad).

2.6. Espectroscopía de impedancia electroquímica

2.6.1. Pruebas de espectroscopía de impedancia electroquímica

La última parte de este trabajo consistió en evaluar la capacidad de la plataforma desarrollada para detectar anticuerpos contra tuberculosis en un proceso sin reactivos secundarios, mediante la realización de mediciones electroquímicas. Para ello se realizaron pruebas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) en películas delgadas de PANI depositadas sobre vidrio recubierto con ITO. Se inmovilizó el antígeno en las películas de polianilina como se describió antes, y se expuso la plataforma a suero inmune o suero control en diluciones 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800. Se realizaron 3 lavados con BSA al 0.3%. Las pruebas de espectroscopía de impedancia se realizaron en una celda electroquímica con 15 ml de KCl a 0.1M, utilizando una malla de platino como contraelectrodo, un electrodo de referencia de Ag/AgCl, y la placa de ITO como electrodo de trabajo. Los tres electrodos se ajustaron en la celda dejando paralelos el contraelectrodo y el electrodo de trabajo. Se conectaron los electrodos a un potenciostato GillAC, y después de tres minutos se realizó la medición en las frecuencias de 10 000 a 10 Hz, con una amplitud de 32 mV RMS. La integración del barrido de frecuencias es cada 10 ciclos y se hacen 100 lecturas en total en la prueba. En la Figura 2.5 se muestra el montaje experimental correspondiente.

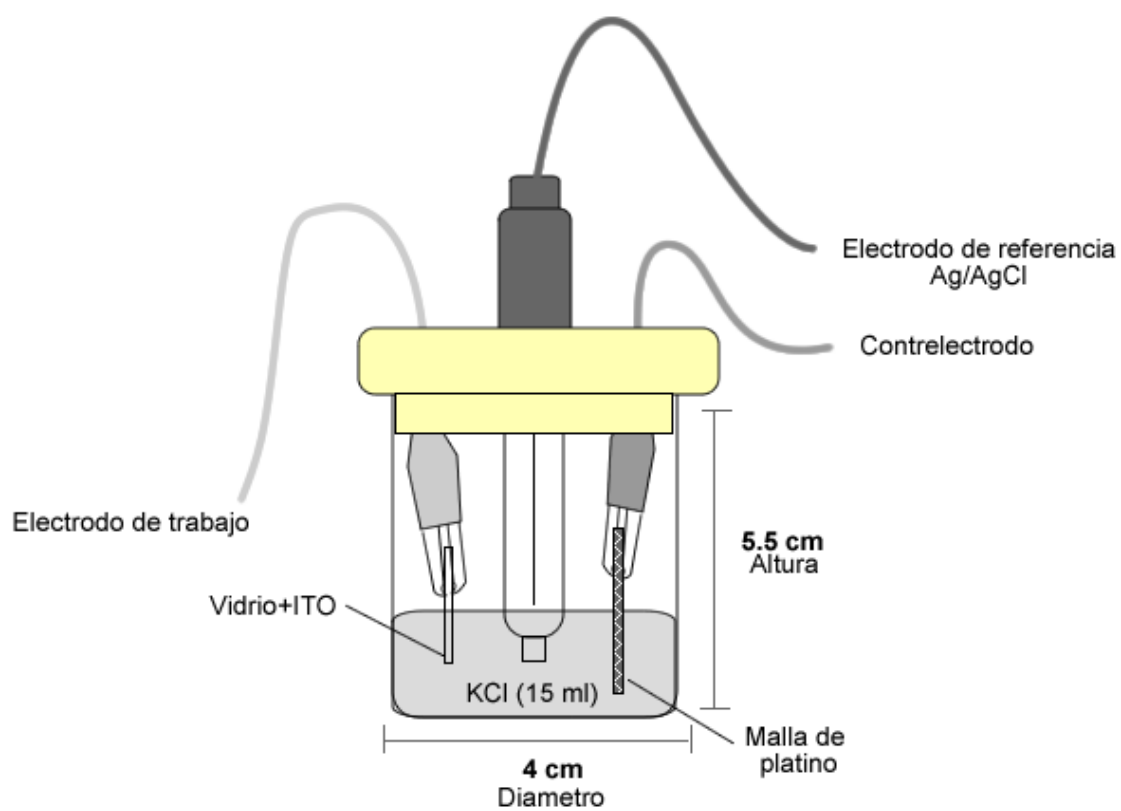


Figura 2.5: Esquema del montaje experimental para medición electroquímica de la reacción antígeno-anticuerpo, utilizando DAT y suero hiperinmune anti-DAT.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Producción y caracterización de bioreactivos

3.1.1. Purificación del antígeno di-*O*-aciltrealosa(DAT)

Para obtener fracciones enriquecidas en el antígeno di-*O*-aciltrealosa (DAT), se utilizó el extracto lipídico total de bacterias *Mycobacterium fortuitum* cultivadas en medio Sauton. El extracto lipídico se separó por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice (FlorisilTM, Supelco). Al utilizar cloroformo como eluyente se obtuvieron lípidos no polares como los triglicéridos y el colesterol, como puede visualizarse en un análisis por cromatografía sobre capa fina (CCF) de los productos resultantes (Figura 3.1). Se obtuvieron fracciones enriquecidas con DAT al eluir con 10-15 % de metanol en cloroformo- Al utilizar concentraciones de metanol en cloroformo superiores al 20 % se obtuvieron fosfolípidos (resultados no mostrados).

Para la purificación del DAT se utilizó una columna abierta eluida con incrementos de 5 % de metanol en cloroformo. Posteriormente se realizaron cromatografías de mayor eficiencia de separación en columnas de gel de sílice pre-empacadas (Sep-PakTM, Waters), eluyendo con un gradiente más fino (incrementos de 2 % de metanol en cloroformo).

3.1.2. Caracterización del antígeno DAT

En DAT purificado se caracterizó por distintas técnicas, realizadas para confirmar la identidad del lípido y para determinar la composición en ácidos grasos del lote obtenido.

Reactividad química y movilidad cromatográfica

El antígeno fue monitoreado dentro de los productos grasos de *Mycobacterium fortuitum* gracias a la característica de los grupos hexosa (glucosa) para generar un derivado cromogénico ante la reacción con antrona en presencia de ácido sulfúrico (figura 2.2). En particular, el antígeno DAT fue identificado por la generación de manchas de color azul grisáceo en placas de cromatografía sobre capa fina, como se muestra en la figura 3.1. Por otro lado, este mismo

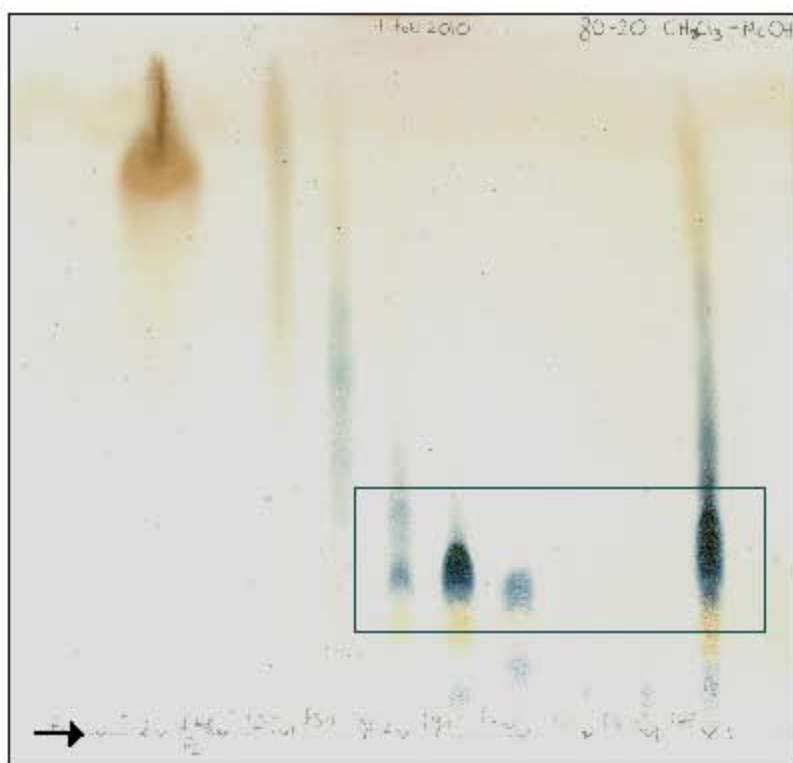


Figura 3.1: Cromatografía en capa fina (CCF) de fracciones lipídicas separadas a partir de extracto lipídico total de *Mycobacterium fortuitum* mediante cromatografía de adsorción. El recuadro muestra el DAT identificado en las distintas fracciones. La placa fue corrida en una solución de CHCl_3 :MeOH (80:20, vol/vol) y se reveló con antrona al 2% en H_2SO_4 a 110°C . La flecha negra indica el origen del recorrido de las muestras.

análisis mostró que el producto purificado migra a la misma distancia que un estándar del antígeno previamente caracterizado.

Espectroscopía FTIR

El DAT purificado se analizó por espectroscopía FTIR (espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier) para identificar los grupos funcionales característicos del compuesto. El análisis se realizó por transmitancia en pastillas de DAT con KBr (que no absorbe radiación en la región de infrarrojo) en el intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} .

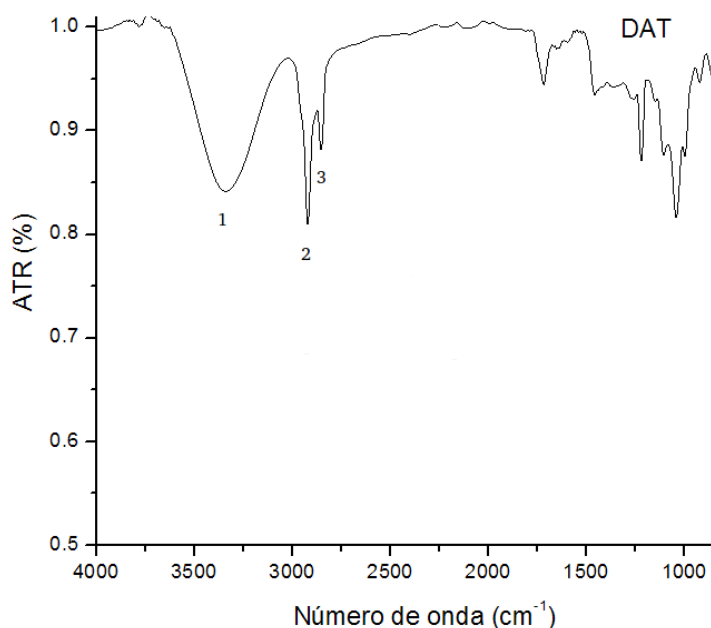


Figura 3.2: Espectro infrarrojo del antígeno DAT. Se señalan las bandas de absorción correspondientes al estiramiento del grupo funcional hidroxilo (1) y a los estiramientos asimétrico y simétrico de metileno (-CH) (2 y 3, respectivamente).

En la Figura 3.2 se muestra el espectro infrarrojo del compuesto purificado. Como puede observarse, el producto purificado muestra la absorbancia característica del estiramiento de los grupos -OH intermoleculares, presentes en las unidades de glucosa (3200 a 3650 cm^{-1}), y la absorbancia correspondiente al estiramiento simétrico y asimétrico de grupos metilo y metileno (2850 y 2925 cm^{-1} , respectivamente). Adicionalmente, la región de la huella digital (de 1500 a 400 cm^{-1}) corresponde a una acil-trealosa.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Para analizar la composición de ácidos grasos del antígeno obtenido, el DAT se saponificó con KOH metanólico y se extrajeron los ácidos grasos con hexano para posteriormente ser derivatizados con diazometano etéreo. Con este procedimiento, los ácidos grasos fueron liberados del antígeno, y esterificados para tenerlos en formas volátiles que pudieran ser analizadas

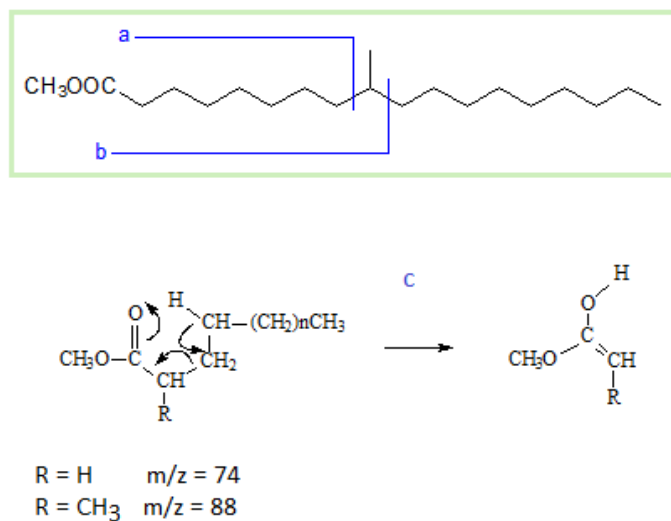


Figura 3.3: Los ácidos grasos liberados a partir del antígeno son transformados en derivados volátiles (ésteres de metilo) para poder ser analizados por cromatografía de gases, y detectados por espectrometría de masas con ionización por impacto de electrones a 70keV. El impacto electrónico genera la ruptura de la molécula, privilegiando la obtención de ciertos aductos, tales como fragmentos contiguos a una ramificación (a y b), o el ion de McLafferty, típico de ácidos grasos fragmentados en su posición 2-3 (c). De esta manera, los espectros obtenidos corresponden a patrones de fragmentación característicos para la estructura de cada éster graso analizado.

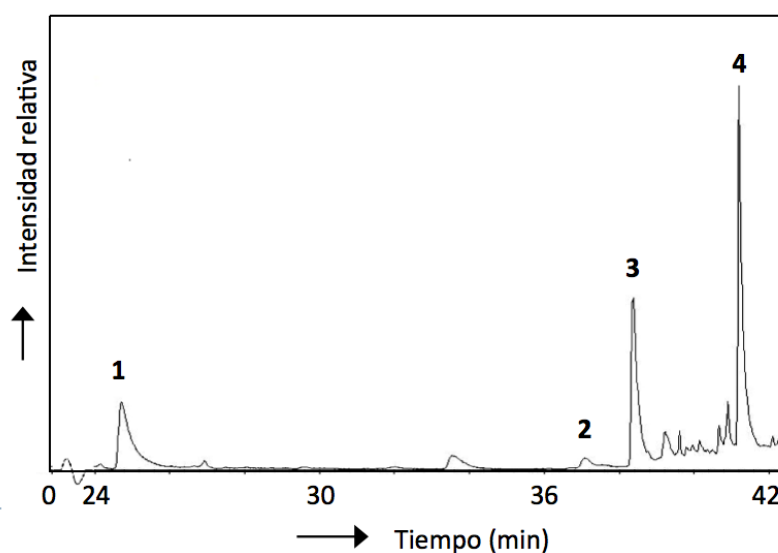


Figura 3.4: Análisis por cromatografía de gases de los metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) liberados a partir de DAT por solvólisis alcalina.

por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Figura 3.3).

En la figura 3.4 se muestra el cromatograma de gases obtenido al analizar los ésteres de metilo de ácidos grasos obtenidos. Para la identificación de estos compuestos, el cromatógrafo fue acoplado a un espectrómetro de masas con ionización por bombardeo electrónico. Para detectar y cuantificar los productos correspondientes a ácidos grasos, se buscó la presencia de los aductos de 74 o de 83 u.m.a., correspondientes a la ruptura de un éster de metilo de ácido graso en la posición 2-3, facilitada por el arreglo de McLafferty [Christie, 2011]. El bombardeo electrónico genera la fragmentación de un éster de metilo de ácido graso y, mediante el espectro de masas obtenido, brinda la identificación inequívoca de la estructura del grupo acilo. En la Figura 3.5 se muestra, a manera de ejemplo, el espectro de masas correspondiente a un Ácido graso 3-metil-di-insaturado, que es característico como acilo sustituyente del DAT [Gautier et al., 1992]. En resumen, el producto purificado mostró (1) movilidad cromatográfica

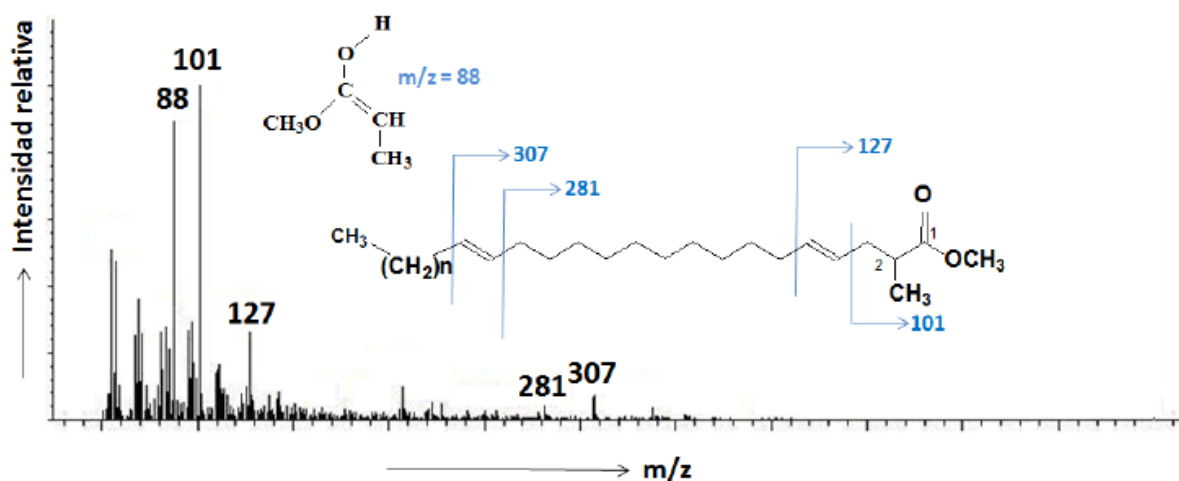


Figura 3.5: Espectro de masas por impacto electrónico de un éster de ácido graso del antígeno DAT. El patrón de fragmentos obtenidos para el éster con tiempo de elución a 41.2 min permite asignar la señal a un ácido graso con ramificación metilo en posición 2, y con insaturaciones en posiciones 4 y 16.

acorde con una di-*O*-aciltrealosa, (2) reactividad positiva a la prueba de antrona para detección de azúcares, (3) presencia de grupos funcionales característico, y (4) estructura fina de ácidos grasos que caracterizan al antígeno. El conjunto de estas pruebas permite corroborar que el lípido purificado para el desarrollo de la plataforma es el antígeno di-*O*-aciltrealosa (DAT).

3.1.3. Obtención y caracterización de anticuerpos anti-DAT

Para obtener suero con anticuerpos dirigidos en contra del antígeno DAT, se inmunizaron conejos Nueva Zelanda con tres dosis de DAT, utilizando el esquema de inmunización señalado en la sección 2.2. En este esquema, el antígeno es suspendido en solución salina isotónica, y mezclado con adyuvante completo o incompleto de Freund. Los animales fueron monitoreados para determinar la producción de anticuerpos a lo largo del protocolo de inmunización. El suero

obtenido se tituló mediante inmunoensayo enzimático convencional (ELISA).

Se considera que una dilución adecuada de trabajo es aquella que permite observar una diferencia de al menos 0.2 unidades en densidad óptica con respecto al suero control (no inmune). En la gráfica se puede observar que la dilución más alta en la cual hay una diferencia en densidad óptica de 0.2 unidades se encuentra entre 1/200 y 1/400.

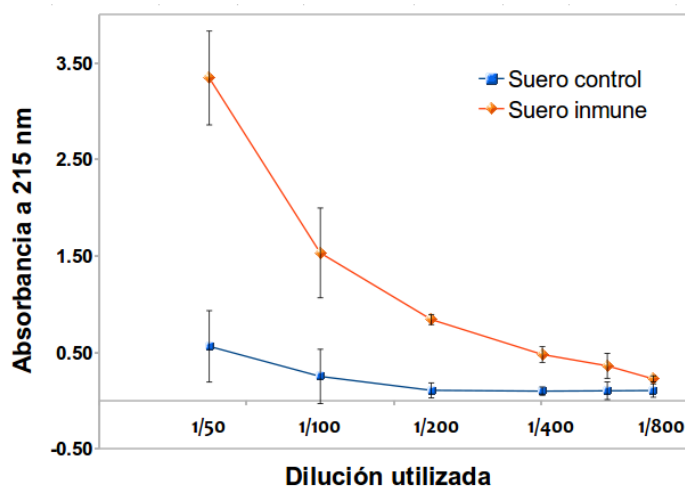


Figura 3.6: Titulación del suero hiperinmune obtenido en conejos. La reactividad de los sueros pre-inmune e hiperinmune fue medida mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA), utilizando 1 μg de antígeno por reacción.

3.2. Preparación del inmunosensor

3.2.1. Síntesis y caracterización de polianilina (PANI)

La plataforma seleccionada para detectar anticuerpos asociados con tuberculosis activa fue la polianilina (PANI) en película delgada. Se sintetizaron películas de PANI por oxidación química de anilina destilada, en medio ácido medio acuoso, entre 0°C y 4°C, con HCl (J.T.Baker) como dopante y persulfato de amonio (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, Aldrich) como agente oxidante

El espesor de las películas de PANI sintetizadas fue de 313.7 ± 48 nm (el espesor fue evaluado con un perfilómetro Contour GT-K0). La conductividad del polímero se evaluó en un equipo Loresta GP MCP-T600, encontrándose que era de 2138 ± 4.4 S/cm.

Las películas sintetizadas se caracterizaron por espectroscopías UV-visible (se analizaron las películas en el intervalo de 400 a 1100 nm en un equipo Genesys 2PC de la marca Spectronic) y FTIR (4000 a 400 cm^{-1} ; el equipo utilizado fue un Vector 33 de la marca Bruker).

El espectro de absorción UV-visible (Figura 3.7) de la polianilina presenta los tres picos característicos de la polianilina en estado conductor a 800nm, 425nm y 380nm. Estas bandas

corresponden a las transiciones electrónicas de la banda p a la banda polarónica localizada; de la banda polarónica a la banda p* y, de la banda p a la banda p*, respectivamente [Arenas et al., 2010, Li et al., 2010].

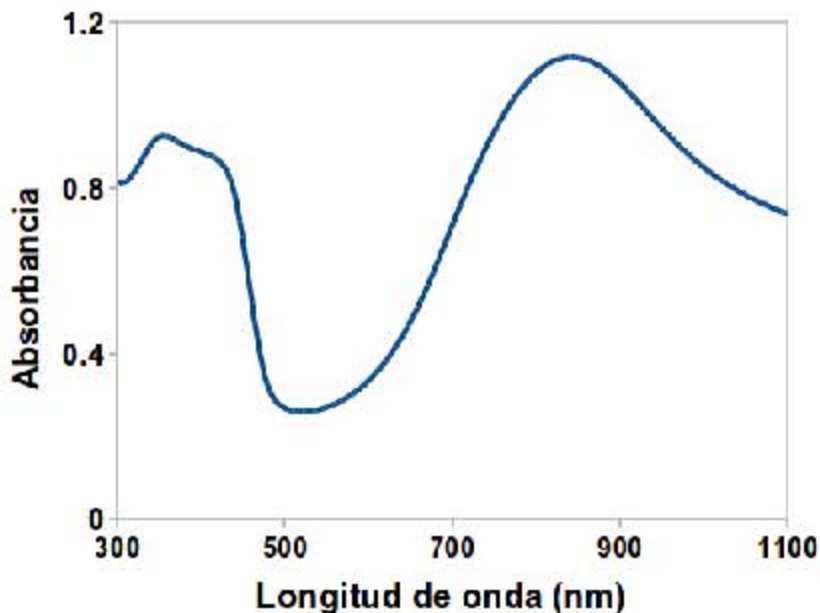
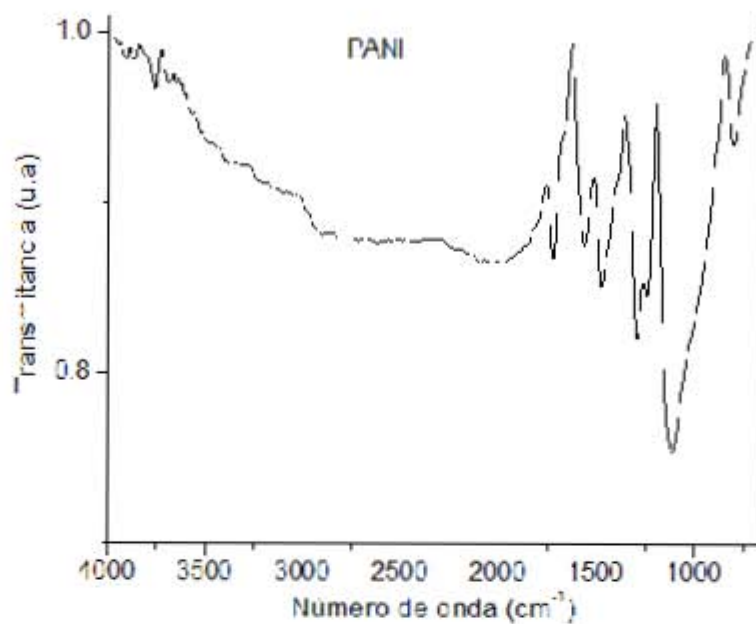


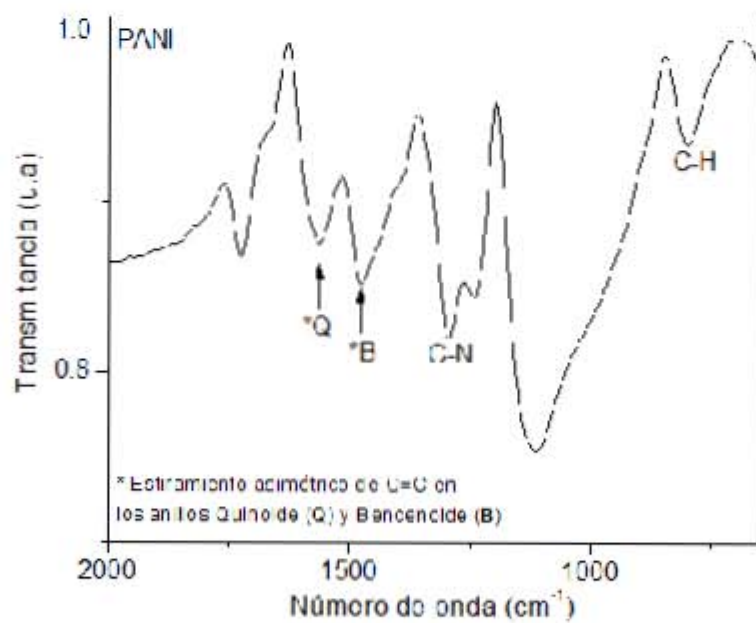
Figura 3.7: Espectro UV-visible de una película delgada de polianilina en estado conductor.

Para la síntesis de películas delgadas de polianilina se realizó una polimerización de anilina por oxidación química en soportes de vidrio cortado, vidrio recubierto con una capa de óxido de estaño e indio (ITO), y polietileno (PET). Se realizó la polimerización en medio ácido inorgánico (HCl) por oxidación química de anilina con persulfato de amonio (APS) a 4°C. Para depositar una capa delgada de polianilina en el soporte deseado, se sumergió el mismo en la solución durante el proceso de polimerización hasta que la capa de polímero en la película cambió de un tono azul oscuro a verde intenso, indicando la formación de PANI en estado emeraldina sal (la forma más conductora de la polianilina).

El espectro de FT-IR de la PANI (Figura 3.8) presenta las bandas 1564cm^{-1} y 1475cm^{-1} , correspondientes al estiramiento asimétrico del C=C dentro de las unidades quinoide y bencenoide, respectivamente. La banda presente en 1294cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento del C-N asociada con los estados de oxidación o protonación de la polianilina emeraldina sal. La banda a 795cm^{-1} es asignada a la vibración de flexión del grupo funcional C-H (Arenas et al., 2010), (Li et al, 2010).



a)



b)

Figura 3.8: Espectro FTIR de a) PANI en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} y b) región del espectro donde se indican las principales bandas de absorción del compuesto. Se indican los picos correspondientes a las formas quinoide y bencenoide del polímero, así como al estiramiento C-H y C-N.

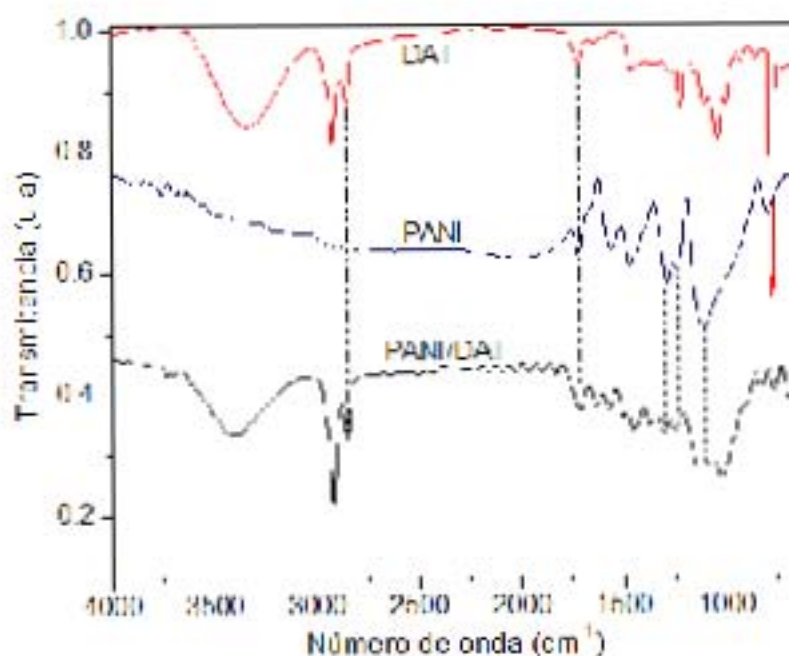


Figura 3.9: Espectro FTIR de DAT, PANI sin modificar y PANI modificada con DAT. Se observa una superposición de las bandas de absorción de ambos compuestos.

3.2.2. Inmovilización de DAT sobre PANI y caracterización del sistema PANI-DAT

Para inmovilizar el DAT en la plataforma de polímero semiconductor, se utilizaron películas delgadas de PANI sintetizadas en soportes de vidrio tal como se describió anteriormente. Se modificaron las películas de PANI mediante la adición de $20\mu\text{g}$ de DAT por cm^2 , disueltos en una mezcla de hexano y etanol (1:1, vol/vol). Con esta mezcla de solventes, el antígeno permanece soluble, sin que la película de PANI sea atacada.

Con el fin de identificar la presencia de los nuevos grupos funcionales sobre la PANI debido a la adición del lípido, se obtuvo el espectro FTIR (de 4000 a 400 cm^{-1}) y de absorción UV-visible (de 4000 a 1100 nm) de las películas tratadas con lípido. En la Figura 3.9 se muestra el espectro FTIR de DAT y PANI, así como el de PANI modificada con DAT. Como puede observarse, el espectro FTIR de la PANI modificada presentó una superposición de las bandas de absorción de los dos compuestos, DAT y PANI.

3.3. Análisis de la plataforma PANI-DAT para la medición de reacciones antígeno-anticuerpo

3.3.1. Bioactividad del antígeno inmovilizado

Para comprobar que la actividad del antígeno se conservaba después de esta inmovilización, se realizó un ensayo en PANI depositada en PET (el cual resultó en un soporte polimérico de mayor estabilidad frente a los procesos mencionados).

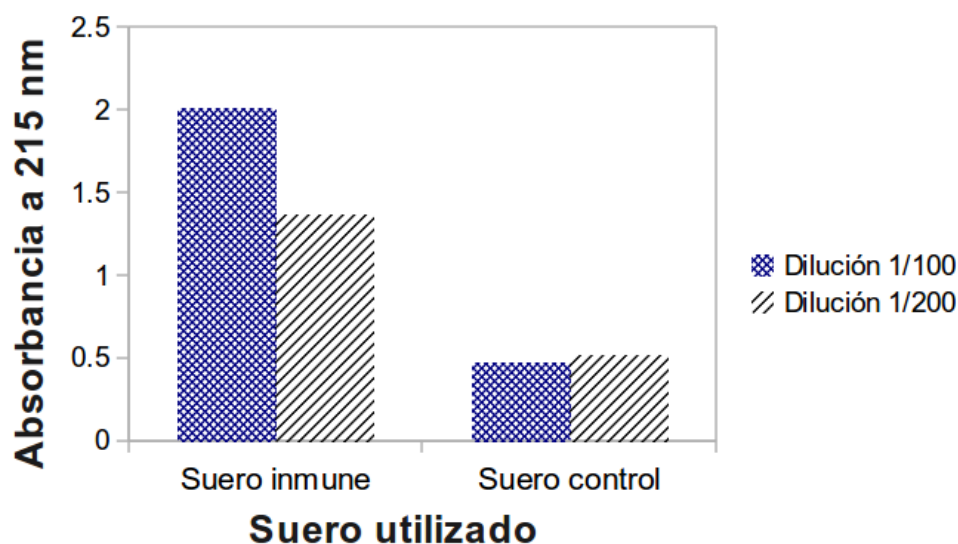


Figura 3.10: Evaluación de la bioactividad del antígeno inmovilizado por ensayo colorimétrico. Se utilizaron dos diluciones de suero.

Se prepararon placas de PET con PANI y se modificaron con 20 μ g DAT cada una como se describe en la sección 2.4 (Preparación del inmunosensor). Se procedió a realizar el inmunoensayo de acuerdo con la metodología descrita en la sección 2.6 (Inmunoensayo enzimático), utilizando diluciones de 1 a 100 y 1 a 200 para cada suero. Finalmente, se midió la densidad óptica en el medio de reacción a 415 nanómetros, utilizando un espectrofotómetro de microplacas. En la Figura 3.10 se muestra la absorbancia encontrada en el suero control (suero de conejo sin tratamiento) y para dos diluciones del suero hiperinmune específico contra DAT.

Dada la diferencia observada entre el suero control y el suero inmune en este ensayo, se concluyó que la bioactividad del antígeno purificado se conserva aún después de ser inmovilizado sobre la plataforma de polímero semiconductor. Con base a esto, se procedió a evaluar la reactividad de la plataforma en función de la dosis de anticuerpos, utilizando una serie de diluciones de ambos tipos de suero.

3.3.2. Reactividad de la plataforma en función de la dosis de anticuerpo

Una vez mostrada la bioactividad del antígeno inmovilizado, se realizó un nuevo inmunoensayo con el fin de mostrar que la reactividad de la plataforma es proporcional a la concentración de anticuerpos utilizados. Para ello, se realizó un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) modificado para la plataforma de polímero semiconductor, utilizando distintas diluciones de suero control y suero hiperinmune.

En el inmunoensayo modificado (Figura 3.11), se observa que la densidad óptica evaluada a 415 nm es mayor para el suero inmune que para el suero control. De acuerdo con estos datos, la polianilina es una plataforma de inmovilización viable para captar anticuerpos en contra del antígeno DAT, es decir anticuerpos marcadores de tuberculosis activa.

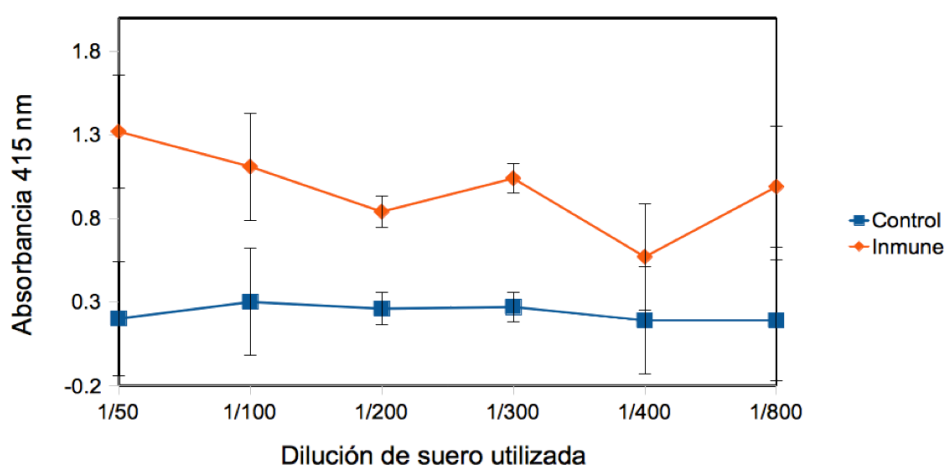


Figura 3.11: Reactividad del antígeno DAT inmovilizado sobre la plataforma de polímero semiconductor y anticuerpos en suero de conejo, evaluada con inmunoensayo enzimático (ELISA) colorimétrico, sobre polianilina como plataforma de inmovilización.

3.4. Pruebas de espectroscopía de impedancia electroquímica

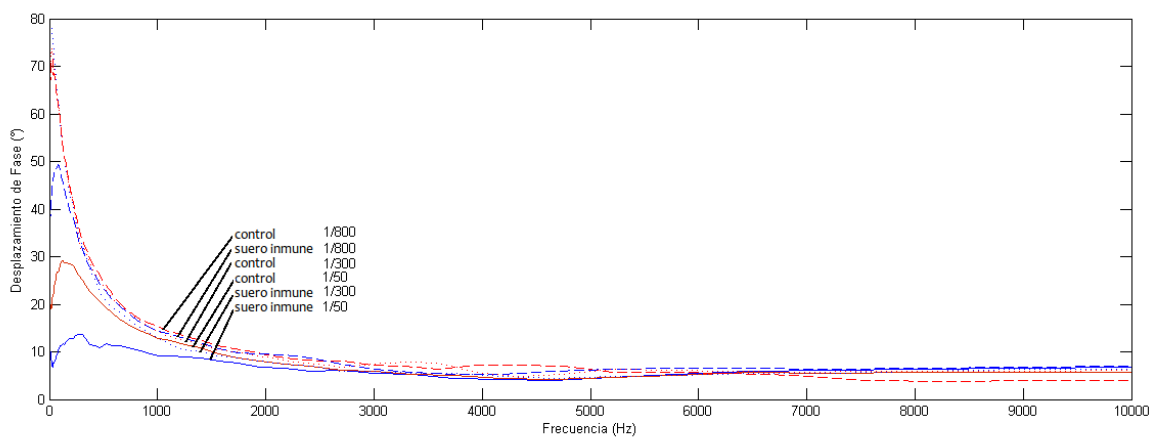
Para evaluar la capacidad de la plataforma desarrollada para detectar anticuerpos contra tuberculosis sin el uso de un segundo anticuerpo marcado, se realizaron mediciones electroquímicas. Esto se realizó mediante pruebas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) en películas delgadas de PANI depositadas sobre vidrio recubierto con ITO. Al igual que en las pruebas anteriores, las películas se modificaron con 20 μg de DAT por cm^2 , y los sitios activos de la PANI se bloquearon con BSA. A continuación, la superficie del polímero fue puesta en contacto con suero sano y suero inmune en las siguientes diluciones: 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800.

Después de la exposición de las películas modificadas al suero, se realizó el análisis por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). El ensayo se realizó en una celda electroquímica con KCl 0.1M, con una malla de platino como contra electrodo, un electrodo de referencia Ag/AgCl y la placa con PANI depositada en ITO más vidrio como electrodo de trabajo.

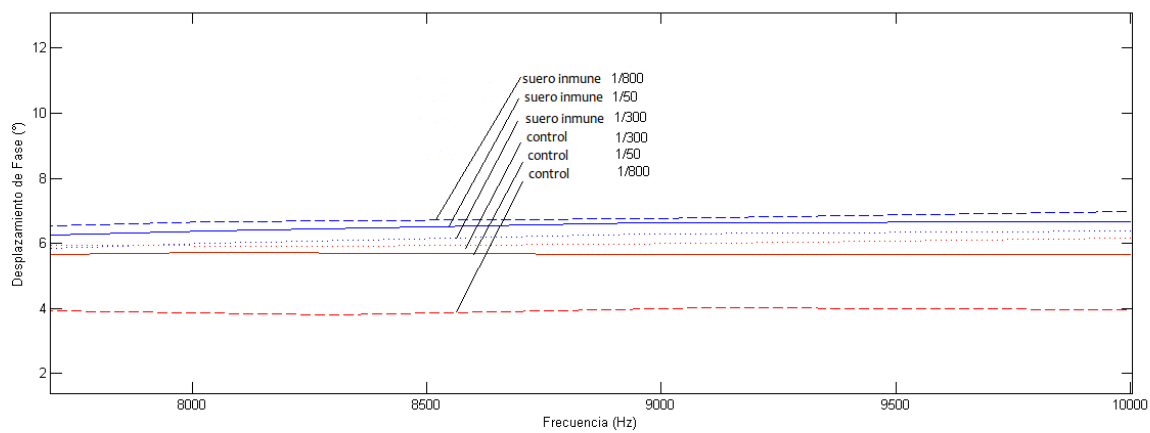
Para comparar las muestras control e inmune en los ensayos de espectroscopía de impedancia realizados, se graficó el desplazamiento de fase observado en la señal aplicada para cada muestra. A bajas frecuencias se observan los mayores capacitores del sistema. En este caso, los correspondientes a la película delgada de polianilina. Cerca de los 10kHz es donde se observa una clara separación entre las muestras con suero inmune y suero control, ya que los capacitores más pequeños del sistema son los correspondientes a la unión de un anticuerpo específico en la plataforma. En la Figura 3.12 se muestran el desplazamiento de fase para las muestras con suero control y suero inmune en distintas diluciones.

Se escogió el cambio de fase como parámetro indicador de la presencia de anticuerpos debido a que a altas frecuencias (alrededor de 10kHz) la diferencia de fase se debe a los capacitores más pequeños del sistema (los anticuerpos unidos a la plataforma), permitiendo distinguir las muestras con suero control y con suero inmune.

Al graficar el desplazamiento de fase obtenido por EIS, se observa que es posible discriminar dicho parámetro entre un sistema incubado con suero control y uno con suero hiperinmune. Este resultado sugiere que la captura de anticuerpos ocurrida al incubar el sistema con suero hiperinmune resulta en un incremento en el desplazamiento de la fase. Asimismo, este experimento preliminar muestra que para la optimización de mediciones electroquímicas de la reacción antígeno-anticuerpo debe considerarse la dilución o diluciones de la muestra biológica como un parámetro importante. En conjunto, estas observaciones permiten sugerir que la plataforma de inmunodiagnóstico desarrollada en el presente trabajo tiene un importante potencial para la detección electroquímica de anticuerpos asociados con tuberculosis activa.



a)



b)

Figura 3.12: Desplazamiento de fase observado en las pruebas de espectroscopía de impedancia electroquímica para distintas diluciones de suero control y suero inmune. El desplazamiento de fase para cada muestra en el rango completo de frecuencias se muestra en a), mientras que en b) se muestra un acercamiento del rango de 7kHz a 10kHz

Capítulo 4

Discusión

En años recientes, la urgencia de contar con una prueba rápida para diagnóstico de tuberculosis ha favorecido el desarrollo de algunos sistemas; entre ellos, destacan las pruebas basadas en inmunocromatografía de flujo lateral [Steingart et al., 2011]. Estos sistemas están basados en mediciones de la reacción antígeno-anticuerpo por medio de marcajes con oro coloidal que son evidentes a simple vista. Estos dispositivos son de fácil manejo; sin embargo, presentan dos grandes desventajas: su fabricación se ha basado principalmente en el uso de antígenos proteicos recombinantes, cuya especificidad y sensibilidad son insuficientes para proporcionar resultados confiables, y los sistemas utilizados requieren reactivos secundarios, aumentando su costo. Por lo tanto, el costo de dichos dispositivos es inadecuado para atender las necesidades diagnósticas de comunidades con bajo poder adquisitivo.

Una opción llamativa para la implementación de dispositivos diagnósticos de fácil manejo son los microelectromecánicos (MEMS, por las siglas en inglés de Micro-Electro-Mechanical System). Esta tecnología integra partes mecánicas y componentes electrónicos a escala submilimétrica, permitiendo la miniaturización de componentes eléctricos y electrónicos incorporados con elementos mecánicos como engranes, vigas en miniatura, canales y cámaras de reacción. Debido a que estos sistemas se fabrican con la misma tecnología que los circuitos integrados de computadora, el costo de estos dispositivos puede compararse al de una prueba de baciloscopía. El uso de la tecnología MEMS, acoplada a los sistemas microfluídicos, proporciona una poderosa herramienta para diseñar sistemas de análisis cercanos al paciente (producibles a bajo costo, portátiles y que no requieren personal especializado para su manejo). El primer paso para desarrollar un sistema de diagnóstico basado en MEMS consiste en el diseño de una plataforma con la capacidad de atrapar biomarcadores específicos de la enfermedad, y producir una señal detectable, relacionada con la concentración del biomarcador en la muestra.

En este trabajo se propone una plataforma miniaturizable para diagnóstico de tuberculosis, basada en un antígeno altamente específico, de fácil obtención y térmicamente estable, el cual fue inmovilizado en la plataforma semiconductor en un proceso de un solo paso, a temperatura ambiente y sin la adición de reactivos secundarios. Para poner en evidencia la captura de anticuerpos se eligió monitorear el cambio de fase como parámetro indicador, ya que la unión de anticuerpos sobre la plataforma correspondería a la introducción de un capacitor, cuya presencia

es posible evidenciar por diferencia de fases a altas frecuencias (alrededor de 10kHz). Los resultados sugieren que, en efecto, la medición por espectroscopía de impedancia electroquímica de cambios de fase en la señal alicada permite distinguir entre una muestra control de otra con anticuerpos inmunoespecíficos.

La realización de mediciones amperométricas para la detección de anticuerpos en una muestra será el siguiente paso en el diseño del dispositivo de diagnóstico. Una vez identificados los elementos capacitivos y resistivos del modelo, podrán explorarse las condiciones que permitan asociar una respuesta en voltaje con la presencia de anticuerpos específicos contra tuberculosis.

En resumen, los resultados de este trabajo indican que la plataforma desarrollada permitirá la detección de anticuerpos asociados con tuberculosis activa, en un sistema adaptable a MEMS y sin la necesidad de utilizar reactivos secundarios. El siguiente paso en el desarrollo del dispositivo de diagnóstico será la evaluación de la reactividad de la plataforma con muestras de suero humano. Posteriormente, la plataforma desarrollada se adaptará a un sistema microelectromecánico acoplado a una cámara microfluídica, lo cual permitirá obtener un sistema de bajo costo de producción y fácil de utilizar para el diagnóstico de tuberculosis activa fluidos biológicos.

Capítulo 5

Conclusiones

- Se propone una plataforma de diagnóstico basada en polianilina, un polímero semiconductor biocompatible, para la detección por espectroscopía de impedancia electroquímica de biomarcadores asociados con tuberculosis activa.
- Se purificó un antígeno altamente específico de la pared del bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (el lípido di-*O*-aciltrealosa) mediante cromatografía de adsorción, y su identidad se comprobó mediante distintas técnicas tales como espectroscopía FTIR y reacciones colorimétricas. Se produjo y validó suero hiperinmune con anticuerpos policlonales anti-DAT en conejos.
- Se inmovilizó por absorción el DAT sobre películas delgadas de polianilina, la cual fue sintetizada por baño químico sobre soportes de vidrio, óxido de estaño e indio (ITO) y PET.
- Se evaluó la reactividad de la plataforma de PANI con DAT inmovilizado por ensayos colorimétricos y espectroscopía de impedancia electroquímica, encontrándose que el antígeno inmovilizado permanece bioactivo y es capaz de capturar anticuerpos.

Los ensayos preliminares para detectar la captura de anticuerpos mediante EIS permiten indicar que la plataforma desarrollada permite la detección de anticuerpos asociados con tuberculosis activa libre de reactivos secundarios. De esta manera, una vez terminada la optimización de parámetros para medir electroquímicamente la captura de anticuerpos, el siguiente paso es la adaptación de esta plataforma para un dispositivo de diagnóstico cercano al paciente que permita diagnosticar tuberculosis en comunidades con limitado acceso a servicios médicos.

Bibliografía

- [Arenas et al., 2010] Arenas, M.; Andablo, E.; y Castaño, V. (2010). "Synthesis of conducting polyaniline nanofibers from single and binary dopant agents". *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(1), pp. 549–554.
- [Escamilla et al., 1996] Escamilla, L.; R., M.; Glender, W.; y López Marín, L. (1996). "Mycobacterium fortuitum glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis.". *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 154, pp. 1864–1867.
- [Evans, 2008] Evans, G. P. (2008). *The Electrochemistry of Conducting Polymers*, pages 1–74. Wiley-VCH Verlag GmbH.
- [Gautier et al., 1992] Gautier, N.; López Marín, L.; Lanéelle, M. A.; y M., D. (1992). "Structure of mycoside F, a family of trehalose-containing glycolipids of Mycobacterium fortuitum.". *FEMS Microbiol. Lett.*, 98, pp. 81–88.
- [Ito et al., 1974] Ito, T.; Shirakawa, H.; y Ikeda, S. (1974). "Simultaneous polymerization and formation of polyacetylene film on the surface of concentrated soluble ziegler-type catalyst solution.". *J Polym Sci Part A-1 Polym Chem*, 12(1), pp. 11–20.
- [Leitch, 2008] Leitch, A. G. (2008). *Tuberculosis: Pathogenesis, Epidemiology and Prevention*, pages 476–506. Blackwell Science Ltd.
- [Li et al., 2010] Li, G.; Zhang, C.; Li, Y.; Peng, H.; y Chen, K. (2010). "Rapid polymerization initiated by redox initiator for the synthesis of polyaniline nanofibers". *Polymer*, 51(9), pp. 1934 – 1939.
- [Messina et al., 2008] Messina, G. A.; Panini, N. V.; Martinez, N. A.; y Raba, J. (2008). "Microfluidic immunosensor design for the quantification of interleukin-6 in human serum samples". *Analytical Biochemistry*, 380(2), pp. 262 – 267.
- [Palaniappan, 2008] Palaniappan, S. and John, A. (2008). "Polyaniline materials by emulsion polymerization pathway". *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 33(7), pp. 732–758.
- [Pardilla, 2007] Pardilla, J. A. (2007). *Síntesis y caracterización de polímeros conductores basados en anilinas sustituidas y su aplicación en electrocatálisis*. Tesis de doctorado. Universidad de Alicante.

- [Paulie et al., 2001] Paulie, S.; Perlmann, H.; y Perlmann, P. (2001). *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. Wiley.
- [Saha, 2001] Saha, B. (2001). *Antigens*. John Wiley.
- [Sassolas et al., 2011] Sassolas, A.; Blum, L. J.; y Leca-Bouvier, B. D. (2011). "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors". *Biotechnology Advances*.
- [S.M y Spearing, 2000] S.M y Spearing (2000). "Materials issues in microelectromechanical systems (MEMS)". *Acta Materialia*, 48(1), pp. 179 – 196.
- [Steingart et al., 2011] Steingart, K.; Flores, L.; Dendukuri, N.; Schiller, I.; Laal, S.; Ramsay, A.; Hopewell, P.; y Pai, M. (2011). "Commercial Serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: An updated systematic review and Meta-Analysis". *PLoS Medicine*, 8(8).
- [Steingart et al., 2009] Steingart, K. R.; Dendukuri, N.; Henry, M.; Schiller, I.; Nahid, P.; Hopewell, P. C.; Ramsay, A.; Pai, M.; y Laal, S. (2009). "Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis.". *Clin. Vaccine Immunol.*, 98, pp. 260–276.
- [WHO, 2010] WHO (2010). "Tuberculosis". (who.int, consultado el 2 de noviembre de 2011).
- [Zamfir et al., 2011] Zamfir, L.-G.; Geana, I.; Bourigua, S.; Rotariu, L.; Bala, C.; Errachid, A.; y Jaffrezic-Renault, N. (2011). "Highly sensitive label-free immunosensor for ochratoxin A based on functionalized magnetic nanoparticles and EIS/SPR detection". *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 159(1), pp. 178–184.
- [Zouali, 2001] Zouali, M. (2001). *Antibodies*. John Wiley.

Apéndices

Apéndice I

Preparación de diazometano etéreo.

La preparación debe realizarse en una campana de reacción entre 0 y 4°C.

No utilizar material de vidrio esmerilado.

El diazometano resulta de la acción de la potasa sobre la nitrosometilurea, como se muestra en la Figura 5.1:

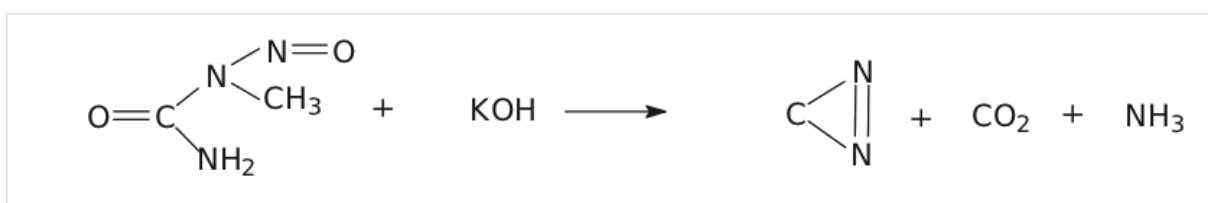


Figura 5.1: Reacción del hidróxido de potasio con la N-nitrosometilurea para formar diazometano, dióxido de carbono y amoníaco.

El diazometano etéreo es un gas sumamente tóxico, pero es soluble en éter frío. Nunca retirar la solución etérea de diazometano de la campana de extracción sin tapón. A continuación se describe el proceso de preparación de diazometano etéreo:

- Medir en un matraz Erlenmeyer de 500ml, 3ml de una solución acuosa de KOH al 40% (peso/vol) y 15ml de éter etílico. Dejar el matraz en hielo durante unos minutos.
- Adicionar con precaución a la fase acuosa 1g de nitrosometilurea. El diazometano gaseoso se solubiliza en el éter. El recipiente conteniendo la nitrosometilurea puede ser enjuagado con un poco de éter etílico a 4°C.
- Decantar la fase etérea sobre otro matraz Erlenmeyer previamente enfriado, el cual debe contener algunas lentejas de KOH para eliminar la humedad. Esta solución puede utilizarse quince minutos después.

Para conservar la solución, tapar muy bien el matraz con un tapón de hule cubierto de papel aluminio y conservar entre 0-5°C. La solución es eficaz mientras conserve un color amarillento fuerte.

Apéndice II

MEMS and nanotechnology: Challenges and opportunities. The case of fight against tuberculosis.

López-Marín, L.; Contreras-Valeriano, Y.; Arenas, C.; Estrada, H.; y Castaño, V. (2011b).
MEMS and nanotechnology: Challenges and opportunities. The case of fight against tuberculosis.. Proc. of SPIE, 8031.

MEMS and nanotechnology: challenges and opportunities. The case of the fight against tuberculosis.

Luz M. Lopez-Marin^a, Yissel D. Contreras-Valeriano^a,
Concepcion Arenas^a, Horacio V. Estrada^b, Victor M. Castaño^a

^aCentro de Fisica Aplicada y Tecnologia Avanzada, Universidad Nacional Autonoma de Mexico,
Campus Juriquilla, 76230 Queretaro, Mexico,

^bCentro Nacional de Metrologia, Carretera a los Cues km 4.5, 76246 Queretaro, Mexico

ABSTRACT

Medicine is clearly becoming one of the major challenges in the field of Applied Physics. The development of novel pharmaceutical devices, such as diagnostics, drug carriers or vaccines is growingly dependant on nanotechnology processes. Nanotechnology and MicroElectroMechanical Systems (MEMS) applied to biological issues have given rise to unprecedented biomimetic designs, which are leading the development of innovative tools, including high-throughput platforms for combinatorial bioassays, or microfluidics-based systems for the detection of diseases. This talk will address the use of MEMS and nanotechnology as a powerful combination for improving Public Health items, specifically through novel diagnostic systems for a wide set of human diseases. Also, we herein present our work involving the use of this approach for the development of a point-of-care test to detect tuberculosis, an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, one of the most evasive germs considered as potential biological warfare agents.

Keywords: Biosensors, BioMEMS, *Mycobacterium tuberculosis*, Immunodiagnosis, Point-of-Care tests.

1. THE BASICS OF BIOMEMS

1.1 MEMS, nanotechnology and biomimetic self-assemblies

Created on silicon substrates, MicroElectroMechanical Systems (MEMS) emerged at the latest 1980s from the integration of electronics, sensors, actuators and mechanical elements. Very soon, interesting possibilities were appearing within the field of MEMS design, including mechanical structures, such as beams, gears, diaphragms, grooves, orifices, springs or suspensions, optical systems, and three dimensional fabrication processes. At present, a highly diverse set of technologies are being developed using MEMS, and complex structures are now feasible due to the addition of new structural layers in MEMS architecture. Micromirrors for projection, inkjet printer heads or microaccelerometers in crash air-bag systems represent some of the most popular uses of MEMS, to mention a few of them. Moreover, reliability and low-cost associated to MEMS batch processing have favored the expansion of this technology towards most areas of R&D.

Nanotechnology, the ability to manipulate matter at the atomic or molecular level is mutually dependent on MEMS. For instance, nanostructured films for MEMS surfaces are at the basis of many applications; similarly, MEMS devices, such as atomic force microscopes, are a requirement for multiple nanotechnology approaches. Over the course of the past fifteen years, MEMS technologies entered the Medicine arena. Examples of biological applications include: miniaturized biological tests for biomarker detection, drug testing, drug discovery, or combinatorial assays for both chemical synthesis and DNA or protein screening. Also, bioMEMS are expected to attain opportunities for *in vivo* applications, such as intelligent drug delivery systems, precision surgical tools or implantable scaffolds guiding neural regenerative processes. As bioMEMS design is continuing to progress towards compartmentalized practices, more challenging biological challenges are expected to be solved. For instance, the integration of biomarker monitoring and control of drug release may be exploited to control the exacerbated proliferation currently posed by stem cells during *in vivo* applications.

*meneses@unam.mx; phone +52 442 1927600; www.victorcastano.net

Interestingly, the integration of biological molecules in nanotechnology approaches, which are based on self-assembly naturally occurring processes, are accelerating the production of unprecedented biomimetic designs. Indeed, self-assembly of mammalian phospholipids, forming lipid monolayers and bilayers, represent excellent models of cell-surface¹. MEMS-supported model membranes may be doped with natural, recombinant or synthetic molecules, and used for basic research studies or biosensor applications. In a similar way, nucleic acid-based nanoassemblies are appearing as an amazing approach for constructing biomimetic arrays, or bioinspired tunable smart devices, such as DNA constructs giving precise 2D and 3D architecture², or functionalized RNA assemblies for a variety of applications, including targeted anti-cancer treatment³. Together, the availability of precise bioengineered structures and MEMS technology appear as a powerful tool, which is expected to deal with critical health problems at the preventive, diagnostic and therapeutic levels.

2. BIOMEMS FOR POINT-OF-CARE (POC) DIAGNOSTIC TOOLS

Diagnosis has been one of the most recalcitrant, sometimes neglected issues in medicine. Chronic and infectious diseases represent the 8 top causes of deaths worldwide, generating some 27 millions deaths by year (more than 45% of total deaths)⁴. Yet, although important achievements have been made in biomedical basic research, the burden of both communicable and chronic disorders has been growing during the last decades. Infectious diseases remain one of the major health concerns of the 21st century, where globalization has marked an accelerated transmission of germs worldwide. Unacceptably, each year more than 11 million deaths are caused by a handful of infectious diseases, most of them preventable through available therapies. Clearly, early diagnosis is one of the most important factors to control the spread of communicable diseases.

Point-Of-Care (POC), miniaturized, portable devices for medical diagnosis are extremely urgent to better control the spread of communicable diseases. Most cases of infectious diseases are associated to low-income settings, where susceptibility is increased by poverty-related conditions, and diagnosis is commonly limited by the lack of specialized facilities and trained personnel. In addition, easy-to-use diagnostic tools would have a significant impact in other diverse fields, such as for the assessment of pathological conditions in astronauts or to early detect biological warfare agents.

Biomedical principles commonly used for clinical diagnosis are susceptible to be translated to bioMEMS. A wide set of pathologies may be correlated to biological molecule production / accumulation (biomarkers). Other pathological forms have been correlated to physical changes, such as temperature increase associated to tumoral tissues. Fine sensing devices are commonly found in MEMS, and are already exploited for the development of autonomous devices, the so-called lab-on-a-chip systems. The introduction of MEMS-based biosensors may substantively impact access to health services worldwide.

At present, various diagnostic bioMEMS are in development or under field evaluation. Interesting examples include: glucose monitoring adapted to MEMS for affordable testing during diabetes, lab-on-a-chip devices to detect Dengue virus infection⁵, and pressure sensors located at heart valves to measure blood flow changes.

3. POC TESTS FOR TUBERCULOSIS DIAGNOSIS

3.1 Tuberculosis (TB), the leading single infectious killer worldwide

TB is a communicable infection, caused by the airborne microorganism *Mycobacterium tuberculosis*. Although a robust immune system is able to contain the causal agent, *M. tuberculosis*, a few proportion of infected people (5-10%) suffer the symptomatic, contagious form. The disease is typically characterized by severe lung affection, and is easily spread between humans by means of bacteria-containing air droplets, after coughing. The World Health Organization (WHO) declared TB as a global emergency since 2003. In 2009, an estimated 1.7 million people died from TB, making *M. tuberculosis* the single infectious killer worldwide. Worthy of concern, the rapid and easily transmission of *M. tuberculosis* places this pathogen as a potential biological weapon. In spite of this, common strategies for TB control, namely vaccination and diagnostics, have remained unchanged for about a century. Dealing with this problem, last March, for a second consecutive year, the WHO has prompted call for innovation in regard to TB control tools⁶.

3.2 The requirements for TB diagnosis

Without treatment, some 8 million people will die of TB between now and 2015. Low-income and marginalized groups are especially vulnerable to TB disease, since TB natural control is strongly dependent on a robust immune system. At these settings, a high proportion of TB infectious cases are thought to be undetected. Therefore, R&D towards diagnostic tools for broad health sectors must be prioritized.

Effective diagnostic tools are expected to meet a number of challenging criteria. Of particular importance, diagnostics must be able to give sensitive (few false negatives) and specific (few false positive) results. It is expected that novel technologies allow diagnostics tools affordable in prevalent settings, user-friendly, rapid and robust. For the particular case of TB, diagnostics must be delivered to those in need, and low-cost also represents an important requirement. From the technological point of view, POC tests may meet for these requirements.

One method with potential to cover these needs is immunodiagnosis. The technique is based on the detection of specific immune response of the host against *M. tuberculosis*. Tests are designed for detecting the response to bacterial products, namely through measurement of antibodies (proteins expressed by the host) during the disease process (Figure 1).

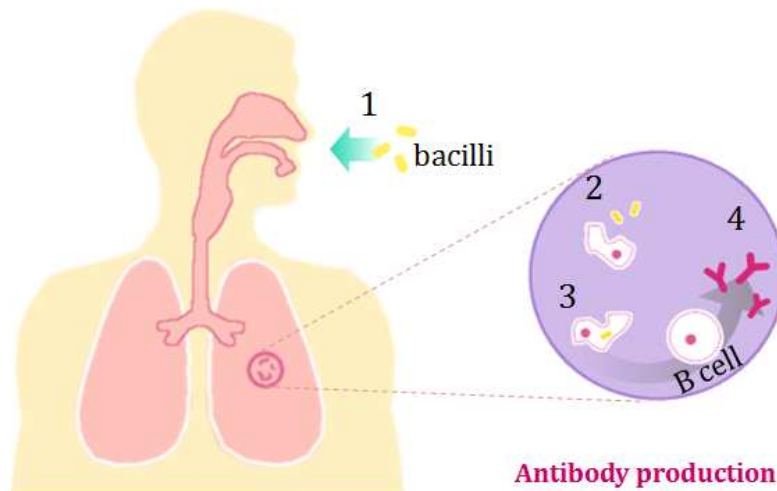


Figure 1. Immunodiagnosis of TB is based on the detection of antibodies specifically found during active disease. Infection of *M. tuberculosis* typically occurs through the respiratory tract (1); bacilli are detected as foreign entities by immune cells (2), then phagocytosed (3); after immune cellular processes, B-cells that specifically recognize components of the germ are activated and secrete antibodies associated to TB disease. Cell response leading to antibody production is shared by different non-pulmonary forms of TB.

Compared to other TB diagnostic methods, antibody-based tests present interesting advantages. For instance, antibodies may be screened under a variety of pathological manifestations, including pulmonary and non-pulmonary disease often encountered in children; the tests are based on serum samples or any other fluid from infected individuals, with no need for microbial or cell-culture facilities.

Up to now, various immunodiagnostic tests for TB have been developed. These assays are based on traditional immunodiagnostic tests for colorimetry measurements (ELISA and dipstick), and, more recently, on microfluidics-based lateral flow immunochromatography devices, which are POC tests developed by means of colored marks, such as secondary antibodies functionalized with colloidal gold nanoparticles⁷. Some of these POC tests for diagnosing TB have been already commercialized in TB endemic countries, whereas some others are under field assessment⁷. None of them had been validated by Health Institutions.

As expected when detection of a highly complex disease is to be considered, an important issue is the selection of antigens, *i.e.* the identity of selected diagnostic reagents. TB is characterized by distinct pathological conditions, which are commonly associated to different antibody patterns in an infected subject. Moreover, antigen recognition by serum

antibodies may be highly heterogeneous between individuals, a factor that has been attributed to both gene polymorphism of antigen-presenting molecules (implying different abilities between patients to react with a given antigen) and cross-reactivity between TB antigens and antibodies raised during vaccination against TB or through environmental exposure to mycobacteria other than TB. Finally, few studies have been performed to detect the distribution of useful antigens in distinct *M. tuberculosis* clinical isolates. For these reasons, antibody-based tests for TB must be evaluated in relevant samples, representative of populations for which a test is going to be applied. Some authors have demonstrated that tests that had been reported with a highly specificity may render extremely low performances when tested in TB endemic settings.

Based on the above presented data, immunodiagnosis of TB should be considered a powerful promising tool, though important pending issues are to be addressed. Optimal tests may result if people with multiple expertise work together to look for robust and reliable tests, which could be evaluated in pertinent infected and control samples.

4. BIOMEMS – THE INNOVATION TO FIGHT AGAINST TB

TB is a major worldwide problem, for which improved diagnostic tools are urgently needed. Currently, it is estimated that some 25% of *M. tuberculosis*-infected people remains undetected, thus favoring the spread of the pathogen. As it is the case for some other pathological conditions, diagnostic testing of TB may gain unique advantages through bioMEMS. Fabrication through microchip technologies allows the production of MEMS at large-scale volumes with minimized costs. BioMEMS diagnosis is based on nanosized detectors, compatible to the size of antigens and target antibodies, resulting in maximized sensitivity and specificity.

A BioMEMS multidisciplinary working group has been established in Mexico to take profit from different expertise domains. The field of microelectronics, robotics and nanotechnology is covered by participants from the MEMS-Mexico Web, an inter-institutional group working since 2009 for establishing MEMS R&D facilities in Mexico. In partnership with Sandia National Laboratories (NM), this MEMS group has adopted the Sandia ultraplanar multilevel MEMS technology (SUMMiT V), which uses 5 levels of poly Si and sacrificial oxide layers processed in various photolithography steps.

A biomedical branch from bioMEMS working group has been focused on the selection and purification of bioreagents (antigens) from bacterial origin. As expected, immunological assays have confirmed that optimal diagnostic performances are achieved only by targeting antibodies with an array of multiple antigens. According to our findings, the combination of antigens of distinct structural nature must be used for attaining diagnostic performances comparable to those found by sputum smear microscopy. In consequence, BioMEMS platforms are now being evaluated for immobilization of both protein and lipid antigens (Figure 2).

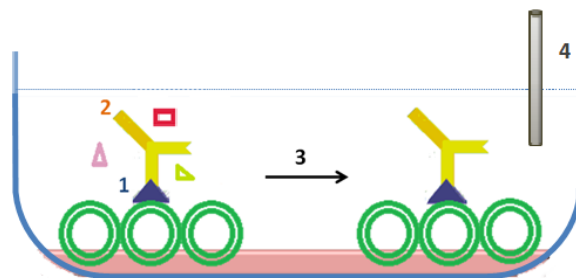


Figure 2. One BioMEMS platform for TB diagnosis uses antigens immobilized through SH-functionalized liposomes onto semiconductive material (1). Immunological assays to test the system start by incubating sera to capture specific antibodies (2); non-attached serum components are washed (3), and label-free microsensors are explored to detect antigen-antibody interaction. A free-label detection system may be based on amperometry measurements, since multi-ionic nature of captured antibodies is expected to induce electroconductive changes (4).

Apéndice III

Biochip contra el mayor asesino mundial

López-Marín, L.; Contreras-Valeriano, Y.; Arenas, C.; Estrada, H.; y Castaño, V. (2011a).
Biochip contra el mayor asesino mundial. Ciencia y Desarrollo.

LUZ M. LÓPEZ-MARÍN, YISSEL D. CONTRERAS-VALERIANO, CONCEPCIÓN ARENAS,
HORACIO ESTRADA Y VÍCTOR MANUEL CASTAÑO.

BIOCHIP

CONTRA EL MAYOR ASESINO MUNDIAL

Si de asesinos en serie hablamos, el que hoy en día aventaja a cualquier otro resulta ser un microorganismo que, como esta denominación lo indica, sólo mide unas cuantos micrómetros de longitud: el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*.

En la ciudad de Berlín, hace 129 años –un 24 de marzo, para ser exactos–, el famoso Robert Koch anunció el descubrimiento de esta bacteria, terminando así con una serie de mitos sobre el origen de la tuberculosis, y abriendo al mismo tiempo la esperanza de erradicarla. Seguramente, muchos hemos escuchado sobre la sintomatología de esta enfermedad crónica, que incluye tos constante, cansancio y falta de apetito; manifestaciones de una enfermedad que, mitológicamente, fue difundida en la Nueva Inglaterra del siglo XVIII como motivo de supersticiones vampirescas, y en la Europa del siglo XIX, como ícono de sensibilidades artísticas; aunque no hay que descartarla como barómetro de pobreza en la época contemporánea.

5. CONCLUSIVE REMARKS

Nanotechnology is making possible the manipulation of molecules at the nanoscale, including the integration of bioreagents onto immobilized systems within micro-electromechanical components (BioMEMS). MEMS technology for immunodiagnostic tools has been scarcely explored, though important advantages may be obtained, including label-free detection devices and minimized production costs. Antigen immobilization experiments are now conducted at macrosized level using platforms amenable to bioMEMS formats. To deal with biological activity testing, clinical evaluation of diagnostic reagents has also been performed in order to support bioMEMS prototype selection. TB is a disease causing important economic losses. Based on epidemic data, TB is thought to be underestimated in many countries, including ours. Extending our capabilities and expertise in microfabrication and nanotechnology issues may significantly accelerate the development of reliable and efficacious systems for the early detection of TB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank CONACyT (Mexico) for financial support to MEMS-Mexico Web. Victor M. Castaño is at a sabbatical leave at Universidad Autonoma de Queretaro.

REFERENCES

- [1] Tanaka, M. and Sackmann, E., "Polymer-supported membranes as models of the cell surface," *Nature* 437(7059), 656-663 (2005).
- [2] Willner, O. I., Weizmann, Y., Gill, R., Lioubashevski, O., Freeman, R. and Willner, I., "Enzyme cascades activated on topologically programmed DNA scaffolds," *Nat. Nanotechnol.* 4(4), 249-254 (2009).
- [3] Guo, P., "RNA nanotechnology: engineering, assembly and applications in detection, gene delivery and therapy," *J. Nanosci. Nanotechnol.* 5(12), 1964-1982 (2005).
- [4] http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310_2008.pdf
- [5] Tai, D.-F., Lin, C.-Y., Wu, T.-Z., Huang, J.-H. and Shu, P.-Y., "Artificial receptors in serologic tests for the early diagnosis of Dengue Virus infection," *Clin. Chem.* 52(8), 1486-1491 (2006).
- [6] http://www.stoptb.org/events/world_tb_day/2011/sos.html
- [7] http://www.stoptb.org/wg/new_diagnostics/assets/documents/BlueprintTB_annex_web.pdf

Ciertamente, se trata de una enfermedad relacionada con sistemas de defensa debilitados, como es el caso de organismos desnutridos, o que presentan cuadros de inmunosupresión. Por ello, no resulta sorprendente que, tratándose de una enfermedad relativamente controlada hasta los años ochentas del siglo pasado, ahora, en combinación con el sida, represente el agente patógeno que mayor número de muertes causa en todo el mundo.

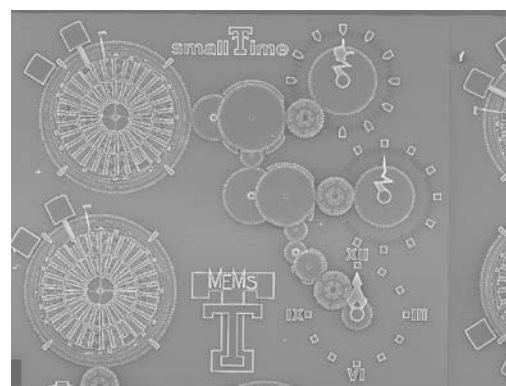
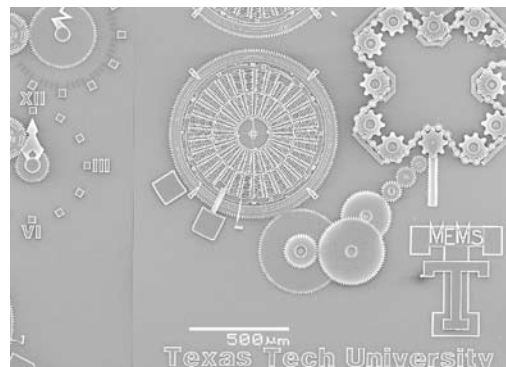
De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, unos 4,800 decesos pueden ser atribuidos a *Mycobacterium tuberculosis* cada día; ello significa que 16 personas, aproximadamente, habrán muerto por esta enfermedad, en el mundo, durante el tiempo que toma leer este artículo. Pero, paradójicamente, como si se dejara suelto a un asesino en serie, postergando su búsqueda, los métodos para detectar el bacilo tuberculoso y controlar su dispersión han sido relegados por décadas. Y en este escenario, nuestro laboratorio del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM, en Juriquilla, Querétaro, trabaja actualmente en el desarrollo de una tecnología innovadora que permita diagnosticar la tuberculosis en poco tiempo, mediante un sistema accesible a múltiples sectores de la población, sin que su aplicación dependa de infraestructura costosa ni de personal altamente especializado. Esta tecnología incluye tanto aspectos bioquímicos como de microelectrónica avanzada –este último aspecto, en colaboración con una interesante red nacional de investigación–.

El bacilo *Mycobacterium tuberculosis* transmite una de las enfermedades que cobra altos porcentajes de vidas en el mundo. La tuberculosis está asociada a sistemas de defensa debilitados y, por ende, a situaciones de pobreza

CONTRA LA TUBERCULOSIS: INNOVACIÓN

La tuberculosis es una enfermedad altamente contagiosa, que se transmite cuando individuos con infección activa tosen sin tomar precauciones higiénicas, y sabemos que, sin tratamiento, cada enfermo es capaz de infectar de 10 a 15 personas en un año.

Pero, ¿cómo detectarlo?: comúnmente, si un individuo es sospechoso de padecer tuberculosis, el diagnóstico disponible se basa en observar al micros-



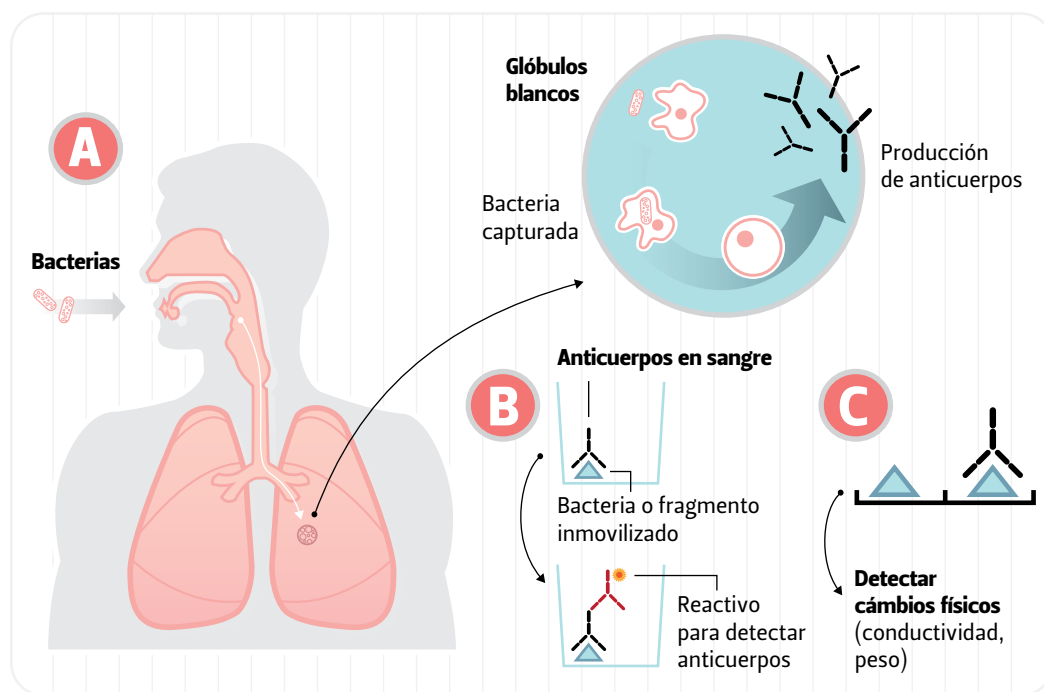
» **FIGURA 1. SISTEMAS MICRO-ELECTROMECÁNICOS (MEMS).** Son dispositivos que suelen contener engranes, membranas, agujeros, temporizadores y motores en miniatura capaces de abrir y cerrar válvulas para agregar reactivos en lapsos determinados. Estas imágenes, obtenidas mediante un microscopio electrónico de barrido, muestran un MEMS amplificado 18 (a) y 50 veces (b) a partir de su tamaño real.

copio una preparación con muestras de su esputo, en la cual se busca el bacilo que es teñido de manera específica. Este es un método de diagnóstico rápido; no obstante, entre 3 y 7 de cada 10 enfermos no pueden ser detectados. Ante tal incertidumbre, el siguiente paso para personas con sospecha de padecer la enfermedad, es colocar una muestra de esputo en un caldo de cultivo y observar el crecimiento del microorganismo. Sueno sencillo, y sería una buena alternativa, de no ser porque el microorganismo presenta un crecimiento extremadamente lento, ocasionando que el diagnóstico demore entre 6 y 8 semanas. En suma, el diagnóstico de la tuberculosis sigue basándose en tecnologías desarrolladas desde hace más de un siglo, y la innovación es el tema que este año ha sido seleccionado para la Campaña Mundial del Día de

FIGURA 2.

MÉTODOS DE INMUNODIAGNÓSTICO PARA TUBERCULOSIS Y SU ADAPTACIÓN A SISTEMAS RÁPIDOS DE DETECCIÓN

Al ingresar el bacilo al organismo, células del sistema inmune lo atrapan, y se desencadena una respuesta que incluye la producción de ciertas sustancias, como anticuerpos, cuya detección constituye la base del inmunodiagnóstico (a). Para detectar anticuerpos, éstos son capturados, mediante la utilización de la bacteria o fragmentos de ésta como reactivos de diagnóstico. En los sistemas actualmente disponibles, la detección de anticuerpos capturados se realiza mediante marcas conferidas por reactivos adicionales, tales como oro coloidal, moléculas fluorescentes o enzimas que catalizan la producción de alguna molécula colorida (b). En un MEMS es posible detectar cambios físicos, tales como peso o conducción de electricidad, inducidos por la captura de anticuerpos en el microsistema (c).



la Tuberculosis (cada 24 de marzo, en conmemoración del descubrimiento del bacilo).

IDONEIDAD DEL BIOCHIP EN DIAGNOSIS

Actualmente, existen métodos de diagnóstico que pueden arrojar resultados en un corto lapso, como los métodos moleculares, basados en detectar material genético del cromosoma bacteriano, o formas novedosas para detectar el crecimiento de una bacteria en un caldo de cultivo. Sin embargo, la aplicación de estos métodos requiere de equipo altamente sofisticado y personal experto; por ejemplo, el uso de métodos moleculares implica la amplificación de material genético y su detección con reactivos y equipo

especializados, mientras que el cultivo del patógeno, transmisible por vía aérea, sólo puede ser realizado en laboratorios con alto nivel de bioseguridad. Desgraciadamente, tal infraestructura no se encuentra al alcance de poblaciones desfavorecidas, como las comúnmente atacadas por tuberculosis y muchas otras enfermedades infecciosas.

En tal sentido, con la miniaturización de sistemas electrónicos, ha surgido la posibilidad de desarrollar herramientas bioquímicas a un bajo costo. En particular, es factible contar con sistemas de sólo unos cuantos milímetros, capaces de realizar pruebas de laboratorio de manera independiente; es decir, sistemas que constituyen –literalmente hablando– un

pequeño laboratorio y pueden ser transportados y utilizados con facilidad. En nuestro grupo hemos apostado por el desarrollo de uno de estos sistemas para detectar tuberculosis: los biochips.

LOS MEMS

Los biochips con los que trabajamos consisten en sistemas electromecánicos miniaturizados o MEMS (por sus siglas en inglés: *MicroElectroMechanical Systems*). Los MEMS son estructuras electromecánicas micrométricas capaces de generar y responder a señales tanto eléctricas como térmicas.

Estos dispositivos cuentan con partes móviles diseñadas con la tecnología de los *chips* –circuitos integrados de computadora–, por lo que, al igual que en los chips, el principal material para su fabricación es el silicio cristalino (más silicio policristalino, en la tecnología específica que nos interesa). Mecánicamente, el silicio es un material casi ideal, que se puede procesar para lograr patrones geométricos con gran precisión dimensional. Cabe destacar que el silicio amorfo, el carburo de silicio y algunos metales como el níquel, también pueden ser utilizados para el mismo fin.

A diferencia de los circuitos integrados, los dispositivos MEMS tienen la capacidad de responder a señales eléctricas, así como a señales térmicas, ópticas, magnéticas y mecánicas. Estos sistemas son una muestra de cómo un proceso de diseño para sistemas totalmente electrónicos permite producir con gran precisión engranes, membranas, espejos, agujeros e, incluso, micromáquinas (actuadores) en miniatura que pueden mover micro y nanopartículas, bioorganismos o mover fluidos con un volumen de nanolitros, así como regular flujos a través de microválvulas confeccionadas con el mismo material –silicio– (figura 1).

Debido a varias características, tales como su bajo costo de fabricación, reducida demanda de energía y facilidad en su ensamblaje, los MEMS son, actualmente, partes comunes de controladores de vuelo y de elementos miniaturizados en emisores de radio, así como de teléfonos celulares, bocinas o televisores. Recientemente, los MEMS han comenzado a ser explorados también para múltiples aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, algunos grupos se interesan en desarrollarlos para detectar moléculas cuya abundancia de un fluido biológico se encuentra relacionada con enfermedades metabólicas. Entre ellos destacan, por su avance, aquéllos enfocados a de-

tectar glucosa en la sangre de personas diabéticas, o sistemas para la medición, en suero, de metabolitos que se acumulan en individuos con fibrosis hepática.

PROYECTO INTERINSTITUCIONAL MEMS

Ante la importancia de esta investigación, se conjuntaron esfuerzos por consolidar la tecnología de los MEMS en México; en 2009, el Conacyt apoyó la creación de una red interinstitucional, en torno al Programa Nacional para el Diseño y Fabricación de Módulos MEMS, conocido en forma breve, como Programa MEMS-México, en el que participan, de manera conjunta e interdisciplinaria: el Centro Nacional de Metrología (donde labora el Coordinador de la Red, el doctor Horacio Estrada), la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, el Instituto Politécnico Nacional, el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica, la Universidad Veracruzana y la UNAM. En varios de esos centros existe una importante experiencia en el diseño, fabricación y uso de MEMS, y la idea de esta red es conjuntar esfuerzos y capacidades. En diciembre de 2009 se formalizó un convenio mediante el cual se obtuvo el apoyo de los Sandia National Laboratories, en Nuevo México, EUA, uno de los centros más avanzados en el desarrollo de MEMS a nivel mundial. La idea es adoptar esta tecnología, formar estudiantes de licenciatura y posgrado y desarrollar conjuntamente MEMS con estas instituciones, así como con la industria en México. Entre los varios proyectos que se tiene considerados, se enfatizan las aplicaciones médicas, las cuales son ciertamente importantes.

DESARROLLO DE BIOCHIPS

Nuestro proyecto está centrado en la implementación –dentro de un MEMS– de sistemas capaces de captar anticuerpos dirigidos contra el microorganismo productor de tuberculosis y de generar, a través del mismo dispositivo, una señal visible a simple vista. Hasta este momento, hemos seleccionado y purificado un producto de la bacteria que servirá como reactivo de diagnóstico, una vez demostrado que los anticuerpos presentes en la sangre de los infectados, reaccionan ante este producto.

Así mismo, las estructuras de los MEMS permiten medir con facilidad un fenómeno ampliamente utilizado para diagnosticar enfermedades: la interacción entre un reactivo de diagnóstico y componentes de fluidos biológicos especialmente abundantes en una determinada patología. Por ejemplo, un reactivo diagnóstico puede ser fijado en una superficie

Luz M. López-Marín

es investigadora en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada-UNAM. Sus trabajos para identificar nuevos reactivos de inmunodiagnóstico para tuberculosis fueron distinguidos con el Premio Universitario “Leon Bialik” de Innovación Tecnológica, en 2005. Es miembro del SNI, nivel 1.

Yissel D. Contreras-


Valeriano es estudiante de la Licenciatura en Tecnología de la UNAM, primera generación, campus Juriquilla. Como parte de su formación realiza una estancia en la cual se ha integrado activamente al proyecto de desarrollo de biochips para inmunodiagnóstico.

Concepción Arenas

es investigadora del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México y miembro del SNI. Su investigación está enfocada en la síntesis de polímeros conductores nanoestructurados para aplicaciones diversas.

Actualmente, diagnosticar la tuberculosis no es muy accesible, debido sus requerimientos técnicos, por lo que el desarrollo de una herramienta bioquímica transportable y de bajo costo, como puede ser un pequeñísimo laboratorio, resulta sumamente atractivo y eficaz: el biochip

de silicio, metal o polímero semiconductor de un MEMS; si dicho reactivo es reconocido por algún componente plasmático, el soporte sufrirá cambios físicos medibles, tales como la capacidad para conducir electricidad o el peso sobre el soporte. En un MEMS, la medición de estos cambios es un proceso común –ya que puede dar cabida a celdas electroquímicas para medir conductividad– o a componentes que generen una señal ante variaciones de peso –como cristales de cuarzo, cuyas propiedades ópticas son sensibles a cambios mínimos en el peso soportado–. Así, una de las mayores ventajas de monitorear reacciones biológicas en un MEMS es la posibilidad de prescindir de marcadores secundarios específicos para poner en evidencia una reacción, lo cual reduce de manera significativa el costo de la medición.

El desarrollo de este biochip para detectar tuberculosis permitirá cubrir una de las necesidades más urgentes en materia de salud pública, el diagnóstico rápido de esta enfermedad, ante la cual unas 58 personas resultan diariamente expuestas en nuestro país. Por otro lado, el estudio sentará las bases para, posteriormente, aplicar los protocolos de este diseño al diagnóstico de otras enfermedades, tales como sida, dengue, influenza, cirrosis o síndrome metabólico. 

LECTURA RECOMENDADA:

>> New Diagnostics Working Group of the Stop TB Partnership. Pathways to Better Diagnostics for Tuberculosis. *A Blueprint for the Development of TB Diagnostics*. Switzerland, World Health Organization, 2009, 151 pp. [http://www.stoptb.org/wg/new_diagnostics/assets/documents/BluePrintTB_annex_web.pdf <http://www.stoptb.org/wg/new_diagnostics/assets/documents/BluePrintTB_annex_web.pdf>]

AGRADECIMIENTOS:

>> Este trabajo forma parte de los esfuerzos de la red Conacyt “Programa MEMS-México”. Los autores agradecen a Sandia National Laboratories (EUA) las facilidades para el desarrollo de MEMS, y a Alicia del Real (UNAM) por las micrografías electrónicas.

Horacio Estrada es

coordinador científico del Centro Nacional de Metrología. Coordina el proyecto Programa Nacional para el Diseño y Fabricación de Módulos MEMS. Después de 25 años en la Universidad de Carolina del Norte (UNC-Charlotte) y 2 años en Goodrich Corp. (Aerospace Sensors Division, MN), ha logrado amplia experiencia en el diseño, fabricación y caracterización de dispositivos MEMS.

Víctor Manuel Castaño es

investigador y director fundador del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México. Ha sido pionero en México en nanotecnología e ingeniería de nuevos materiales. Es uno de los investigadores mexicanos más prolíficos y ha recibido numerosos reconocimientos en México y en el extranjero. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores, nivel 3.