



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

NANOENSAMBLAJES SUPRAMOLECULARES PARA CAPTURA DE  
ANTICUERPOS EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

## TESIS:

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:  
LIC. JUAN PATIÑO CÁRDENAS

TUTOR PRINCIPAL:  
DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

COMITÉ TUTOR:  
DR. PEDRO SALAS CASTILLO  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA  
DR. EDEN MORALES NARVAEZ  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ÓPTICA, CONACyT

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, NOVIEMBRE, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## Agradecimientos Institucionales

*Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada y al Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales que me han dado la oportunidad de realizar mi formación como Maestro en Ciencia e Ingeniería de Materiales.*

*Agradezco a mi asesora de tesis, la Dra Luz María López Marín por compartir conmigo sus conocimientos, por su paciencia y por su apoyo para realizar esta tesis.*

*A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Pedro Salas Castillo y el Dr. Eden Morales Narvaez, quienes durante estos dos años me apoyaron y brindaron sus conocimientos a través de sus comentarios para llevar a buen fin este trabajo.*

*Agradezco a la Mtra. Lourdes Palma Tirado (Instituto de Neurobiología) por los análisis en microscopía electrónica de transmisión, y al Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales, en especial al Dr. Manuel Aguilar Franco, por los análisis de microscopía electrónica de barrido.*

*Agradezco al personal Administrativo del CFATA. A Concepción Arellano Andrade por guiarme y brindarme toda la información para la realización de los trámites administrativos.*

*Agradezco a CONACYT por la beca de maestría, que con su apoyo económico he podido dedicarme tiempo completo a mis estudios de maestría, y por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo, a través del proyecto CF2019-53395.*

*Agradezco al equipo de trabajo del laboratorio de nanobio-óptica, M. en C. Armando Becerra Hernández, M. en C. Carlos Manuel Valdemar Aguilar y Dr. Alejandro Magallanes Puebla, que siempre estuvieron para apoyarme.*

*Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (Proyecto IT200421). Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.*

## Agradecimientos Personales

*Agradezco a mi familia.*

*A mis padres, Adela y Alejandro, que siempre han confiado en mí.*

*A Teresa y Miguel que me han apoyado tanto, antes durante la licenciatura y ahora en la maestría.*

*A Alejandra y Jonathan que me han apoyado para poder iniciar este proyecto.*

*A Rosario y Elena por su apoyo emocional y su confianza.*

*A mis hermanos Carmelo, Ángel y Gualo que, aun estando lejos, siempre están disponibles para ayudar.*

*A Lucero que apoyándonos mutuamente hemos alcanzado nuestras metas.*

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>3</b>
2.1. Antígenos lipídicos y proteicos de <i>M. tuberculosis</i> . . . . .	3
2.2. Química supramolecular . . . . .	5
2.2.1. Bicapas lipídicas y liposomas . . . . .	5
2.3. Diagnóstico y detección . . . . .	6
2.3.1. Pruebas rápidas y futuras propuestas: el uso de biosensores . . . . .	8
2.3.2. Sistemas de diagnóstico asistidos por inteligencia artificial (IA) . . . . .	9
2.4. Técnicas experimentales . . . . .	11
2.4.1. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) . . . . .	11
2.4.2. Cromatografía en capa fina (TLC) . . . . .	15
2.4.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM) . . . . .	16
2.4.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) . . . . .	18
2.4.5. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) . . . . .	18
2.4.6. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) . . . . .	22
2.4.7. Producción de suero hiperinmune . . . . .	23
<b>3. Justificación</b>	<b>26</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>27</b>

<b>5. Objetivos</b>	<b>28</b>
5.1. Objetivo General . . . . .	28
5.2. Objetivos Particulares . . . . .	28
<b>6. Esquema experimental</b>	<b>29</b>
6.1. Materiales y reactivos . . . . .	30
6.2. Métodos . . . . .	31
6.2.1. Sueros hiperinmunes . . . . .	31
6.2.2. Purificación de diacil trealosa (DAT) . . . . .	31
6.2.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) . . . . .	32
6.2.4. Preparación de liposomas unilaminares (LUVs) . . . . .	32
6.2.5. Inmunoensayo modificado sobre tereftalato de polietileno recubierto con óxido de estaño e indio (PET-ITO) . . . . .	33
6.2.6. Identidad química del antígeno DAT . . . . .	35
<b>7. Resultados y discusión</b>	<b>37</b>
7.1. Purificación del antígeno DAT . . . . .	37
7.2. Caracterización del antígeno DAT . . . . .	38
7.2.1. Identidad cromatográfica . . . . .	38
7.2.2. Análisis de componentes individuales . . . . .	39
7.3. Control de calidad del suero utilizado . . . . .	44
7.3.1. Esquema de inmunización utilizado . . . . .	44
7.3.2. Titulación del suero . . . . .	45
7.4. Diseño del sistema coloidal para desplegar el antígeno DAT . . . . .	45
7.5. Caracterización de liposomas . . . . .	47
7.6. Bioactividad de los liposomas con DAT . . . . .	48
<b>8. Conclusiones y perspectivas</b>	<b>53</b>
8.1. Conclusiones . . . . .	53

8.2. Perspectivas . . . . .	53
<b>9. Referencias</b>	<b>55</b>

## Resumen

El desarrollo de métodos de diagnóstico para la detección temprana de enfermedades, a bajo costo y sin necesidad de equipos especiales, constituye una necesidad para la aplicación oportuna de tratamientos y estrategias de prevención. Actualmente, uno de los mayores retos de salud pública mundial es la detección de tuberculosis, enfermedad causante de 1.6 millones de muertes al año. *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la enfermedad, destaca por su riqueza en antígenos no hidrosolubles. A este respecto, mientras varias metodologías se ocupan de la inmovilización de antígenos de naturaleza proteica para dispositivos miniaturizables, hasta ahora no se dispone de herramientas para explotar antígenos no hidrosolubles. En este trabajo, el glicolípido diacil-trealosa (DAT), molécula reconocida como uno de los mejores antígenos para el diagnóstico serológico de tuberculosis, fue desplegado en liposomas unilaminares compuestos por fosfatidilcolina, el antígeno anfipático, y dodecanotiol para su eventual inmovilización en superficies metálicas. Las vesículas formadas presentaron tallas promedio ( $\pm$ SD) de  $234 \pm 18.9$  nm, de acuerdo con análisis por microscopía electrónica de transmisión. Para explorar la actividad del antígeno en su formato coloidal se realizó un inmunoensayo enzimático con los liposomas inmovilizados sobre óxido de estaño e indio y sueros de conejo inmunizados con DAT. Estos análisis mostraron que las vesículas son capaces de capturar anticuerpos anti-DAT de manera específica, confirmándose el despliegue exitoso del antígeno en la superficie de los liposomas, así como su bioactividad. Queda por establecerse la utilidad del material para la captura de anticuerpos humanos, así como el desarrollo de un sistema de diagnóstico amigable basado en el mismo.

## Abstract

The development of diagnostic methods for the early detection of diseases, at a low price and without the need for special equipment, constitutes a need for the prompt application of treatments and prevention strategies. At present, one of the major challenges in world public health is the detection of tuberculosis, a disease responsible of 1.6 million deaths annually. *Mycobacterium tuberculosis*, the causal agent of the disease, stands out for its abundance in non-hydrosoluble antigens. In this regard, while various methodologies have been set for the immobilization of protein antigens for miniaturizable devices, no tools are currently available for exploiting non-hydrosoluble ones. In this work, the glycolipid diacyl-trehalose (DAT), a molecule recognized as one of the best antigens for serological diagnosis of tuberculosis, was displayed within unilamellar liposomes composed by phosphatidylcholine, the amphipathic antigen, and dodecanethiol for their eventual immobilization on metal surfaces. The so-prepared vesicles showed mean ( $\pm$ SD) sizes of  $234 \pm 18.9$  nm, according to transmission electron microscopy analyses. To explore the activity of the antigen within its colloidal form, an enzymatic immunoassay was performed with the liposomes immobilized on indium tin oxide and sera from DAT-immunized rabbits. This analysis showed the vesicles were able to specifically capture anti-DAT antibodies, thus confirming the successful display of the antigen on the surface of liposomes, as well as their bioactivity. More research will be needed to establish the usefulness of our material for capturing human antibodies, and to develop a friendly, DAT-based diagnostic system.

# Capítulo 1

## Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica infecciosa, anteriormente conocida como tisis, causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (Zaman, 2010). El proceso de infección comienza cuando la bacteria Mtb ingresa al cuerpo por la vía respiratoria hasta llegar a los pulmones. Bajo condiciones de inmunosupresión Mtb provoca una infección activa conocida como TB pulmonar, la cual se puede extender a otros órganos. Para el 2021 la TB fue la principal causa de muerte provocada por un agente infeccioso, con 1.6 millones de muertes, y se estima que aproximadamente un cuarto de la población mundial está infectada por Mtb (World Health Organization (WHO), 2022).

Las características de Mtb han dificultado el control de la enfermedad. Algunas de estas características son: la gran parte de lípidos de su membrana que le confieren una gran resistencia a la mayoría de antimicrobianos (Jackson, 2014; Batt et al., 2020); su comportamiento polivalente que le permite entrar en un estado silencioso, que puede coincidir en el tiempo en que se llevan a cabo revisiones médicas (Caminero Luna, 2007); presentar un estado de latencia (infección latente) durante el cual puede resistir a un ataque inmune por días e incluso años, para después reactivarse cuando el sistema inmune se desequilibra, y pasar a ser una enfermedad contagiosa (Ernst, 2012).

La gran cantidad de lípidos que contiene Mtb es una característica de interés, ya que algunos de ellos son específicos de la bacteria (Smith, 2003). Sin embargo, debido a la hidrofobicidad que

presentan los lípidos, se ha dificultado su uso en sistemas de diagnóstico. Pese a su hidrofobicidad estas moléculas lipídicas pueden ser utilizadas como antígenos para la captura de anticuerpos presentes en fluidos corporales. Ya que las metodologías actuales se basan principalmente en el uso de proteínas para la captura de anticuerpos (Golichenari et al., 2019), el uso de moléculas anfipáticas se muestra como una opción novedosa.

La nanotecnología y la ciencia de materiales nos permiten aprovechar las propiedades fisicoquímicas de los materiales (Nikolova et al., 2018). En el caso de métodos diagnósticos, el control de materiales a nivel molecular nos permite la construcción de estructuras mesocelulares con la capacidad de modificación de sus superficies, y con una mayor área superficial (Nsairat et al., 2022). Estas características son muy útiles para la captura de moléculas de interés que permitan obtener un diagnóstico (Sut et al., 2021).

Por lo tanto, en este trabajo se propone el uso de la molécula anfipática diacil trealosa (DAT), glicolípido que no ha sido utilizado en dispositivos de diagnóstico, para su despliegue en estructuras supramoleculares para la captura de anticuerpos. La propuesta consiste en la producción de una estructura biomimética, en donde el antígeno quede expuesto en una bicapa de lípidos dentro de un formato coloidal.

## Capítulo 2

# Antecedentes

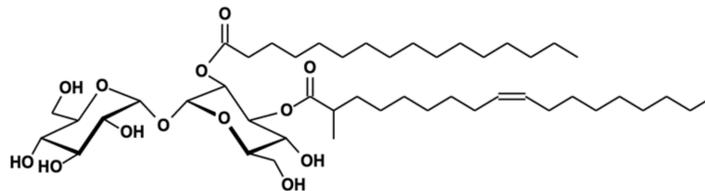
### 2.1. Antígenos lipídicos y proteicos de *M. tuberculosis*

Los antígenos más estudiados para la detección de infección por el bacilo Mtb son de naturaleza proteica y corresponden a las proteínas secretadas por el mismo bacilo como lo son Ag85a, ESAT6, CFP10, 38kDa, MDP1 (Maekura et al., 2019; Mohiuddin, 2020) y LAM, este último utilizado principalmente en la población infantil (Togun et al., 2018). Sin embargo, se ha observado una variación en las reactividades para distintos pacientes al utilizar cada uno de esos antígenos, es decir, con una respuesta serológica incapaz de discriminar entre individuos sanos e individuos con TB (Kunnath-Velayudhan et al., 2010). Ante esta problemática se ha propuesto el uso combinado de distintos antígenos, con la intención de mejorar el serodiagnóstico de la TB al aumentar su sensibilidad y especificidad, propuesta que se ha llevado a cabo también con el diseño de moléculas de fusión (Akhter et al., 2020; Sulman et al., 2021). Esta incursión en el uso de moléculas de fusión que contienen en su estructura dos o más antígenos abre paso a construir otras moléculas que contengan tres o más antígenos de Mtb. (Yaqoob et al., 2022; Afzal et al., 2015).

Una característica interesante de Mtb es la gran cantidad de lípidos contenidos en su superficie celular que, además, juegan papeles importantes en la interacción del patógeno con el huésped (virulencia) (Karakousis et al., 2004). Se observa esta cantidad de lípidos ya que,

para *Mtb*, 200 genes son dedicados al metabolismo de lípidos (6% del total) y, si se compara con otras bacterias como *Escherichia coli*, es 4 veces mayor (Smith, 2003). Para aprovechar la existencia de estos lípidos, algunos con estructuras atípicas, se ha propuesto su uso como antígenos. Se han realizado estudios (Steingart et al., 2009; Saad et al., 1996) donde antígenos de naturaleza lipídica, como el DAT, el TAT o el factor cuerda, han sido comparados contra antígenos proteicos, obteniéndose resultados que muestran que los lípidos son reconocidos por sueros de pacientes con especificidades tan buenas o mejores que las asociadas a proteínas. Para el caso de DAT, se ha observado que reacciona con suero de pacientes durante TB activa (Muñoz et al., 1997).

Los glicolípidos están formados por un motivo de azúcares y el aglicón, en este caso una parte lipídica. En el caso del DAT, la parte de carbohidratos está formada por un disacárido denominado trealosa, que consiste en dos anillos de glucosa unidos por sus oxígenos anoméricos (ver figura 2.1), y dos acilos grasos unidos a uno de los azúcares mediante enlaces tipo éster. La trealosa es un azúcar característico en micobacterias, el cual junto con la variedad de ácidos grasos, da origen a una de las familias más icónicas de *Mtb*, las aciltrealosas (Asensio et al., 2006).



**Figura 2.1** Estructura de la di-2,3-O-aciltrealosa (DAT). En esta representación la trealosa está esterificada con ácido palmítico y ácido oleico ramificado.

Recientemente se ha reportado el uso de aptámeros, que son oligonucleótidos de ADN o ARN monocatenarios, para su uso en métodos diagnósticos. Estas moléculas tienen la capacidad de mimetizar a los antígenos, reaccionando así con anticuerpos de individuos infectados, por lo que muestran un potencial para el diagnóstico de TB, además de otras ventajas como su menor costo y tiempo de producción (Srivastava et al., 2021).

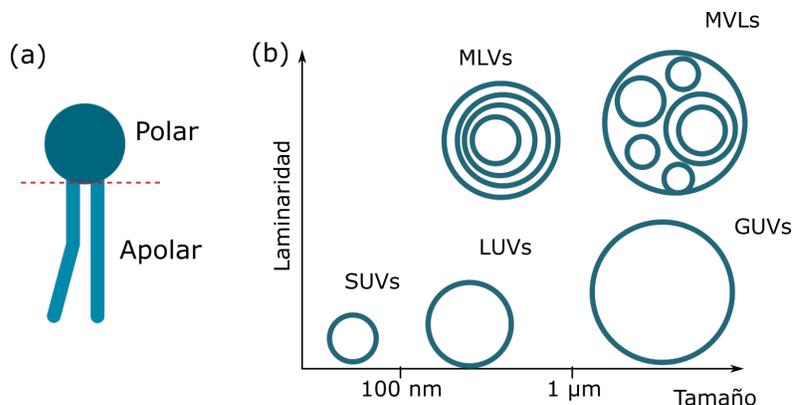
## 2.2. Química supramolecular

A diferencia de la química tradicional que se enfoca principalmente en los enlaces primarios, las interacciones entre electrones de la capa más externa de dos átomos, la química supramolecular se enfoca principalmente en las interacciones no covalentes (más débiles) de las moléculas. La química supramolecular se encarga del estudio y las funciones de las supermoléculas que resultan de la organización intermolecular de moléculas menos complejas por medio de enlaces no covalentes (Mohanty et al., 2017).

El autoensamblaje molecular es un proceso espontáneo en el cual componentes moleculares individuales se organizan sin ninguna intervención externa en estructuras ordenadas a través de interacciones no covalentes (Kumaraswamy et al., 2014). Una estrategia emergente, en cuestión de moléculas que se autoensamblan, es el uso de péptidos que han demostrado capacidad en la liberación de fármacos, bioimagen, ingeniería de tejidos y diagnóstico (Zhang et al., 2022). Un ejemplo en el uso de péptidos para diagnóstico se muestra en el trabajo de Liu *et. al.* (Liu et al., 2022a), en el cual desarrollaron una molécula de interés para la captura de antígenos proteicos fusionando péptidos específicos a un dímero que actúa como anticuerpo (del inglés *affibody*) (proteína de andamiaje que consiste de 58 amino ácidos, en tres hélicas alfa de una sola cadena y que exhibe una gran afinidad y especificidad a una proteína específica). Los péptidos, de naturaleza anfipática, fusionados con los anticuerpos, forman agregados activos de anticuerpos que muestran una gran afinidad a alfa-fetoproteína o AFP, un biomarcador asociado a cancer primario de hígado. Al utilizar los agregados en inmunoensayos lograron una mayor sensibilidad, ya que capturaron una mayor cantidad de anticuerpos marcados al contar con una mayor superficie en un agregado, lo cual les permitió una mayor señal colorimétrica.

### 2.2.1. Bicapas lipídicas y liposomas

Las bicapas lipídicas sintéticas son biointerfaces que imitan la membrana celular y que están compuestas comúnmente por fosfolípidos. Estas bicapas pueden ser biofuncionalizadas para permitir la unión y captura del analito que se quiera detectar (Sut et al., 2021).



**Figura 2.2** (a) Representación de una molécula anfipática con su sección polar (hidrofílica) y su parte apolar (hidrofóbica) y (b) clasificación de las distintas vesículas por su laminaridad y tamaño (adaptada de (Liu et al., 2022b)).

Descubiertos en 1964 (Bangham and Horne, 1964), los liposomas son estructuras esféricas coloidales hechos de lípidos anfifílicos en solución que se autoensamblan en bicapas. Ya sea unilaminares pequeños (SUVs), unilaminares grandes (LUV), multilaminares (MLV) o gigantes (GUV) (ver Figura 2.2), los liposomas están compuestos por bicapas lipídicas y, dada su capacidad de modificación de los componentes de esta bicapa, son atractivos para aplicaciones biomédicas ya que rodean un núcleo acuoso, importante para la contención y entrega de medicamentos (Guimarães et al., 2021). Estos pueden ser utilizados en metodologías como inmunoensayos o biosensores para detectar distintos analitos ya que se puede aprovechar su gran área superficial para capturar una mayor cantidad de moléculas de señalización ya sea hidrofóbicas o hidrofílicas (Hamano and Negishi, 2022; Mazur et al., 2017).

### 2.3. Diagnóstico y detección

La presencia de síntomas es el primer recurso utilizado para la detección de la TB. Ya que los pulmones son los órganos a los que ingresa directamente el bacilo de Mtb, son también el lugar en el que se multiplica cuando el sistema inmunitario se encuentra comprometido y no puede contener al bacilo. Esta infección activa es conocida como TB pulmonar y presenta signos clínicos fáciles de confundirse con otras afecciones, como tos por varias semanas, dolor en el

pecho, pérdida de peso y de apetito, debilidad y cansancio (Farajnia et al., 2019).

Por otro lado, la infección controlada (no activa) de Mtb no causa enfermedad ni es transmisible. La técnica más utilizada para la detección de esta infección latente por Mtb es la llamada prueba de Mantoux o prueba de la tuberculina. Esta prueba toma como base una hipersensibilidad que se desarrolla a antígenos de Mtb cuando ya se ha tenido una infección. Esta hipersensibilidad es aprovechada en esta técnica al inyectar de forma intradérmica antígenos de Mtb que, al provocar una reacción inflamatoria en la piel, señala un resultado positivo a la infección (Schlossberg, 2017).

Actualmente, en la mayor parte del mundo, la baciloscopía se mantiene como la primer técnica de diagnóstico de TB activa. La desventaja de esta técnica es la relativa falta de sensibilidad por lo que la OMS recomienda la exploración y uso de técnicas con mayor eficiencia como primer acercamiento en la detección de TB (Rimal et al., 2022; World Health Organization (WHO), 2020). La técnica estándar para la confirmación de TB es mediante el cultivo del bacilo; sin embargo, esta técnica requiere de infraestructura especial, es de alto costo y lleva varias semanas para la obtención de un resultado, lo que dificulta su uso en las zonas de mayor incidencia de la enfermedad (World Health Organization (WHO), 2020).

En el caso de los niños, el tener un diagnóstico preciso se dificulta aún más, principalmente por la falta de una confirmación microbiológica, ya que la obtención de esputo de niños menores a 10 años se complica y sus muestras suelen contener un número de bacilos muy bajo (Lamb and Starke, 2017). Recientemente se ha propuesto el uso de la metabolómica como potencial herramienta de diagnóstico para identificar nuevos marcadores de infección de la TB. Ya que Mtb afecta varias rutas metabólicas de proteínas, lípidos y carbohidratos, Magdalena *et.al.* (Magdalena et al., 2022) encontraron que cambios en la leucina y kinurenina permiten identificar infección por Mtb, sin embargo, aún se requiere mayor investigación para continuar el desarrollo y analizar la viabilidad de este método.

El serodiagnóstico, o diagnóstico por medio de reacciones provocadas en el suero sanguíneo o por el suero sanguíneo del paciente, se muestra como una de las opciones más atractivas como método de detección ya que tiene la ventaja de ser simple, rápida, de bajo costo y que no

requiere medidas de seguridad como las que se requieren al manejar bacilos vivos (Mohiuddin, 2020). Esta técnica permite además obtener muestras de la población infantil, a diferencia de la obtención de esputo.

Cada etapa de infección por Mtb, ya sea como latente, activa o de reactivación, produce una expresión génica distinta en el bacilo, resultando en variaciones en la expresión de los antígenos del bacilo, y de esta forma obteniendo un serodiagnóstico distinto en cada etapa (Sutherland et al., 2013) por lo que se puede aprovechar para diferenciar la etapa en que se encuentra la infección. Es de importancia mencionar que los antígenos de naturaleza proteica y lipídica presentan diferencias en su capacidad para ser usados en el serodiagnóstico, mostrando para los antígenos lipídicos una mayor sensibilidad y especificidad que los de naturaleza proteica en el diagnóstico de TB activa (Kunnath-Velayudhan et al., 2010).

### **2.3.1. Pruebas rápidas y futuras propuestas: el uso de biosensores**

La organización mundial de la salud (OMS) ha aprobado el uso de pruebas rápidas en las que incluye recomendaciones para su uso (World Health Organization (WHO), 2020). Existe hasta el momento una única plataforma de identificación rápida de TB y resistencia a rifampicina aprobada por la FDA, el ensayo GeneXpert MTB/RIF (Armstrong et al., 2021). Otras pruebas rápidas para la detección de la TB tienen una baja sensibilidad y especificidad por lo que su uso no está recomendado por la OMS ya que puede provocar se obtengan falsos negativos que obstaculicen la contención de la enfermedad. En su lugar, el organismo exhorta a que se desarrollen nuevas pruebas con una mayor exactitud en los resultados, con la obtención del resultado de forma rápida, sin la necesidad de personal especializado y adaptable a las condiciones con la mínima infraestructura (World Health Organization (WHO), 2022).

Los biosensores son dispositivos analíticos que comprenden un componente de biorreconocimiento, que puede ser una enzima, antígeno-anticuerpo, ácidos nucleicos, por mencionar algunos, y un biotransductor que pueda medir las señales en muestras como orina, sangre, esputo o saliva. Los métodos de transducción de la señal pueden ser por métodos electroquímicos, magnéticos, ópticos o basados en masa.

Para el diagnóstico a nivel molecular nano-biosensores pueden ser integrados en tecnologías como *lab-on-a-chip* que pueden ser mejoradas con el uso de nanopartículas (Tsai et al., 2017; Zou et al., 2017; Sun et al., 2017). Además, tomando ventaja de la reciente integración de múltiples disciplinas que colaboran mutuamente en proyectos, se pueden integrar varios procesos en una única plataforma para poder llevar a cabo un diagnóstico *point-of-care*. Esta nueva modalidad está avanzado y perfeccionándose, dando la posibilidad de reducir la brecha en cuanto el tiempo de detección de la infección por TB y de la atención médica necesaria. Esta oportunidad es particularmente importante para las regiones que más lo necesitan, que son aquellas que se encuentran en las condiciones más precarias y que es donde prevalece la enfermedad (Gupta and Kakkar, 2018).

Un ejemplo de dispositivo *point-of-care* para diagnóstico de TB es la inmunocromatografía de lipoarabinomanano (LAM) en orina para adultos con pruebas positivas para VIH. El LAM es un lipopolisacárido presente en la superficie celular de Mtb, útil para la detección de Mtb en un estado de TB activa en personas VIH-positivas (Shah et al., 2016; Minion et al., 2011). Esta prueba ha permitido la reducción en mortalidad en hasta 8 semanas al permitir a una gran cantidad de pacientes comenzar el tratamiento anti-TB en un menor tiempo de espera (Peter et al., 2016). Además de su bajo costo, se ha mostrado ser rentable su uso en entornos de recursos limitados (Reddy et al., 2019).

### **2.3.2. Sistemas de diagnóstico asistidos por inteligencia artificial (IA)**

El uso de radiografías de tórax o CXR (del inglés *chest X-ray*) ha sido promovido como una herramienta útil para una detección sistemática temprana de TB y para el desarrollo de algoritmos de triaje. Además, CXR permite identificar a aquellos que necesitan pruebas de laboratorio confirmatorias, ya que se ha mostrado en estudios que 40-79% de personas que no mostraban signos clínicos de infección activa por Mtb solo fueron diagnosticados mediante análisis de rayos-X (Onozaki et al., 2015). Aunque CXR presenta una gran sensibilidad, su uso se ve reducido por su baja reproducibilidad, modesta especificidad y un entrenamiento substancial para su interpretación (Pinto et al., 2013).

La facilidad para realizarse una radiografía ha aumentado pero no el acceso a personal calificado para su lectura, especialmente en áreas rurales. Para poder sobreponerse a esta dificultad se ha propuesto la detección asistida por computadora, o CAD (del inglés *computer-aided detection*), que hace uso de la IA para analizar CRX en busca de anomalías compatibles con TB (Khan et al., 2017). El resultado de salida de un CAD implica un mapa de calor con un puntaje numérico que, basado en un puntaje de corte ajustable, señala la existencia o ausencia de TB. Algunos softwares tienen incluso la capacidad de reportar la presencia de anomalías como calcificaciones, cavidades, masas, inflamación de nódulos linfáticos (Qin et al., 2021).

La IA ha atraído interés en el sector del cuidado de la salud, principalmente el desarrollo de redes neuronales de aprendizaje profundo. Las redes neuronales profundas son un conjunto de algoritmos organizados en nodos y capas que imitan funciones cognitivas humanas capaces de inferir reglas e imitar patrones (Qin et al., 2019). El principio de su funcionamiento se basa en la mejora de su propio rendimiento y el aumento de su capacidad a medida que es expuesto a ejemplos que permiten su entrenamiento, lo que se ve traducido en una mejora en el diagnóstico y atención del paciente (Nash et al., 2020).

El uso de CAD para la detección de TB, en casos de TB previamente confirmados, ha mostrado buenos resultados (Qin et al., 2019; Pande et al., 2016), por lo que su investigación y desarrollo ha ido en aumento. Para el 2017 solo existía un software comercialmente disponible, el CAD4TB de Delft Imaging Systems, mientras que para el 2020 existían ya 8 productos CAD específicos para detección de TB y otros más en fase de validación (Qin et al., 2021; Khan et al., 2017). Gran parte de su éxito se debe a los algoritmos de la IA que han demostrado una capacidad sobresaliente en reconocimiento de imágenes, por lo que ha sido reconocida como una solución prometedora para ayudar en los países con altos índices de TB que utilizan CXR para detección y triaje de TB. Esta tecnología CAD está prevista para ser utilizada de forma combinada con la nueva generación de dispositivos portátiles de rayos-X a batería, con la intención de llevar a cabo análisis a pacientes en zonas con mínimos requerimientos de funcionamiento (Qin et al., 2021).

La reciente tendencia del uso de la IA como apoyo para diagnóstico no proviene de una idea

nueva pues se ha analizado su uso por más de 10 años con la intención de sobreponerse a las dificultades de los equipos de gran costo, necesarios para realizar una radiografía, y de la falta de profesionales que puedan interpretar las imágenes de las radiografías (Pande et al., 2016).

## **2.4. Técnicas experimentales**

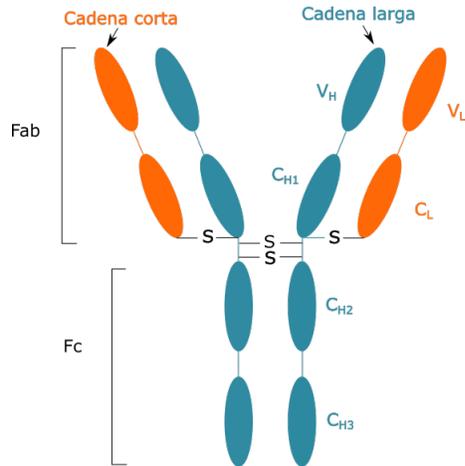
### **2.4.1. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

Un antígeno es cualquier sustancia a la cual las células inmunitarias reconocen como ajeno o diferente a las células propias. Si el antígeno es capaz de provocar una respuesta inmunológica, entonces este antígeno se conoce como inmunógeno. Durante un proceso de inmunización, un inmunógeno es inyectado en un animal con la intención de que se produzcan anticuerpos capaces de unirse al inmunógeno de interés mediante enlaces no covalentes. Estos anticuerpos son creados para reconocimiento de antígenos y como sistema de defensa.

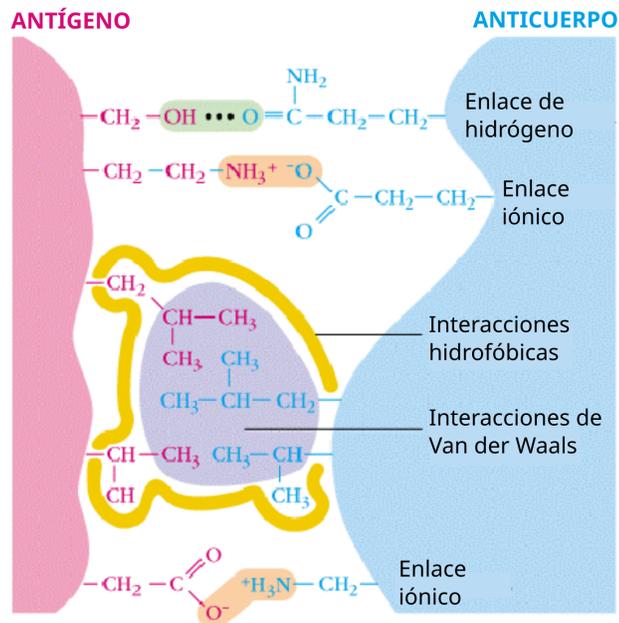
Los anticuerpos son glicoproteínas (perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas) cuya estructura básica consiste en dos cadenas polipeptídicas “pesadas” emparejadas con dos cadenas “cortas” más ligeras, que forman una estructura en forma de Y, como se representa en la figura 2.3. Las cadenas están unidas mediante enlaces disulfuros y divididas en dominios, diferenciables en zona Fab (fragmento de unión al antígeno) y Fc (fragmento constante) (Liddell, 2013).

La zona Fab es la zona del anticuerpo que se une al antígeno. El mecanismo de unión consiste en la suma de una serie de interacciones no covalentes entre grupos funcionales de ambas moléculas (antígeno y anticuerpo) (Figura 2.4).

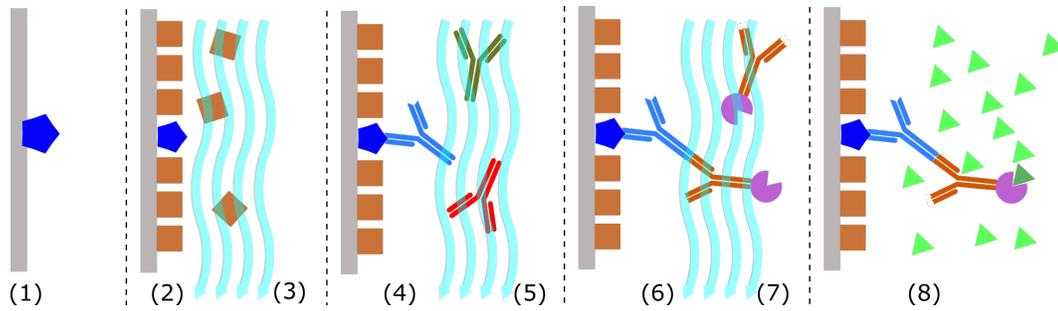
La zona variable de anticuerpos,  $V_L$  y  $V_H$ , resultan de linfocitos B distintos, que en un humano se estiman en un número de al menos  $10^{10}$ . Cada una de estas células tiene la capacidad de producir un anticuerpo con distinta especificidad de antígeno, es decir, capaz de reconocer a un antígeno específico. Dicho potencial de producción de anticuerpos será utilizado únicamente cuando un linfocito B dado sea expuesto a su antígeno específico (Liddell, 2013). De esta manera, es posible que un individuo genere anticuerpos capaces de reconocer sustancias específicas de un patógeno.



**Figura 2.3** Representación de un anticuerpo y los llamados dominios funcionales en que está dividido.



**Figura 2.4** Interacciones no covalentes entre anticuerpo y antígeno. Adaptado de (Kim et al., 2004).



**Figura 2.5** Proceso de un ELISA indirecto que incluye los pasos: (1) captura del antígeno, (2) bloqueo de sitios inespecíficos, (3) lavado, (4) incubación de primer anticuerpo, (5) segundo lavado, (6) incubación del segundo anticuerpo conjugado a una enzima, (7) tercer lavado, (8) incubación con sustrato y lectura de señal.

Por su parte, la zona Fc permanece constante en todos los anticuerpos humanos. De los distintos tipos de anticuerpos que existen, los anticuerpos IgG son los más abundantes, y los que presentan una mayor afinidad a su epítipo (parte de la molécula que reconocida por un anticuerpo). Los anticuerpos IgG son los más ampliamente utilizados/detectados en inmunoensayos debido a que son producidos con mayor rendimiento en respuesta a la inmunización, se une con mayor afinidad a su epítipo y tiene distintos sitios funcionales para acoplamiento químico (He, 2013; Liddell, 2013).

Un inmunoensayo es una prueba utilizada para detectar biomoléculas (denominadas analitos), como lo pueden ser anticuerpos, glicoproteínas, proteínas, hormonas o, como se mostrará en este trabajo, glicolípidos. Para lograr la detección de estos se hace uso del complejo formado entre un anticuerpo con su antígeno específico. Una configuración utilizada para realizar un inmunoensayo es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*), el cual, en su formato indirecto, utiliza una superficie recubierta con el antígeno para la captura y detección de anticuerpos.

El procedimiento para realizar un inmunoensayo indirecto, y que se representa en la figura 2.5, se resume en los siguientes pasos (He, 2013; Peaper and Landry, 2014):

1. **Captura del antígeno:** La fijación del antígeno se lleva a cabo dentro de los pozos de microplacas que tienen una superficie de poliestireno, el cual muestra una hidrofobicidad natural (no polar) permitiendo la interacción con la región no polar del antígeno, formando

enlaces no covalentes pero estables (Sullivan et al., 2001). Esta conformación permite que la parte hidrofílica de la molécula esté orientada hacia la parte externa, y la parte hidrofóbica hacia la placa.

2. **Bloqueo:** Para evitar el enlace no específico por parte de los anticuerpos primarios o secundarios en los sitios no ocupados por el antígeno, estos sitios se bloquean con una sustancia inerte, evitando así enlaces no específicos en los siguientes pasos. Las sustancias de bloqueo utilizadas incluyen proteínas purificadas o leche desgrasada que se une a los sitios potenciales de interacción no específica, sin afectar los epítopes del antígeno.
3. **Lavado:** Después de la incubación se debe realizar el lavado de los pozos para retirar el material biológico en la muestra que pueda interferir en los siguientes pasos. Se recomienda realizar de 3 a 5 lavados manteniendo humectada la superficie entre cada lavado.
4. **Primer anticuerpo:** En este paso, en el que los anticuerpos a detectar se enlazan a los antígenos, la muestra que contiene los anticuerpos se incuba en los pozos, para permitir el enlace específico antígeno-anticuerpo. Las diluciones de la muestra se realizan en soluciones de pH controlado y con una pequeña cantidad del agente de bloqueo para reducir el ruido de fondo.
5. **Lavado:** Se repiten de 3 a 5 lavados de los pozos para retirar los anticuerpos no enlazados de manera específica que puedan afectar la señal.
6. **Segundo anticuerpo:** Se incuba en los pozos la dilución que contiene al anticuerpo secundario conjugado a una enzima. Este anticuerpo debe ser capaz de reaccionar únicamente con la parte Fc de los anticuerpos capturados.
7. **Lavado:** Se repite el lavado para retirar excedente del segundo anticuerpo.
8. **Enzima y sustrato:** La enzima que se conjuga al segundo anticuerpo más utilizada es la peroxidasa de rábano negro o HRP (del inglés *horseradish peroxidase*). Esta enzima puede ser detectada por técnicas colorimétricas utilizando 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio (ABTS).

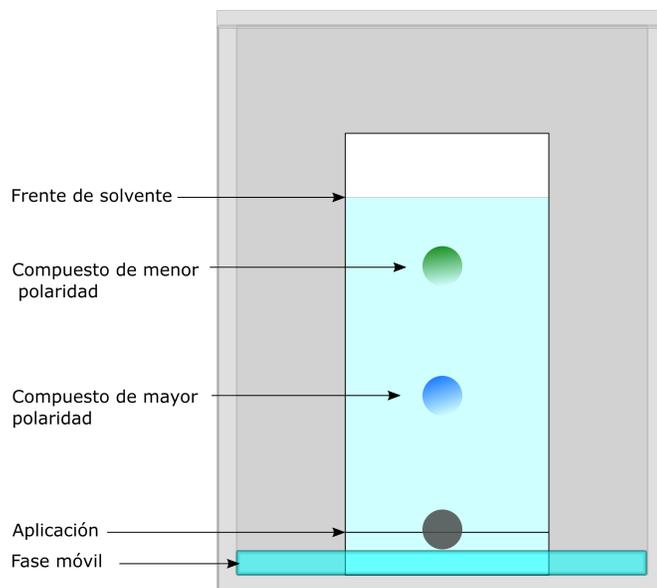
### 2.4.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

La técnica de cromatografía en capa fina (TLC del inglés *Thin Layer Chromatography*) es una técnica de separación de los componentes en una mezcla por su afinidad entre dos fases. El propósito de esta técnica es separar el analito de interés de los demás compuestos. En general, una mezcla de sustancias es colocada en un soporte de gel de sílice (fase estacionaria) y, al paso de un solvente, cada componente será acarreado según su afinidad entre ambas fases: el solvente (o fase móvil) y el gel de sílice.

El proceso para realizar una TLC es el siguiente (Spangenberg et al., 2011):

- Se traza una línea a 1 cm de la parte superior sin retirar el material adsorbente con puntos marcados cada 1.5 cm.
- Se preparan las muestras diluidas en solvente no polar y volátil, y se colocan de forma dosificada en cada punto marcado sobre la línea.
- Se prepara una mezcla de los solventes elegidos y se coloca dentro de la cámara de cromatografía junto con la placa, de forma que la placa esté cubierta por la fase móvil a una altura de al menos 1 mm.
- Terminado el desarrollo de la placa, cuando la fase móvil ha alcanzado una altura adecuada, se dejan evaporar los solventes de la placa dentro de una campana de extracción de gases.
- Para la detección, se utiliza el reactivo que permita la visualización, por reaccionar con el analito.

El principio de funcionamiento para la separación se basa en que cada componente tiene una afinidad individual tanto a la fase móvil como a la fase estacionaria (ver figura 2.6). Si la afinidad de un componente con la fase móvil es alta, entonces este viaja sobre la fase estacionaria. Si la afinidad del componente es alta con la fase estacionaria entonces esta viajará lentamente, más retenida a la fase estacionaria. Una vez que la separación ocurre, los componentes separados



**Figura 2.6** Representación de TLC sobre un soporte polar.

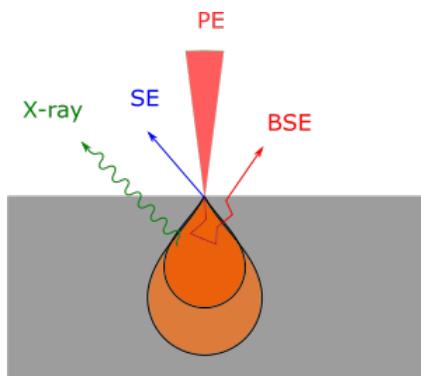
**Tabla 2.1** Reactivos utilizados en TLC para la detección de componentes de membranas lipídicas.

Reactivo	Descripción	Referencias
Ácido fosfomolibdico	Revelador general de moléculas orgánicas Calentar de 105-120°C	(Jork et al., 1990)
Antrona	Para detección de azúcares Calentar a 105-120°C	(Jork et al., 1990)
Azul de molibdeno	Para detección de fosfolípidos y derivados de ácido fosfórico	(Paquot et al., 1987)

pueden ser visualizados como puntos en la placa. Los principales reactivos utilizados para este fin se muestran en la tabla 2.1.

### 2.4.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Un microscopio electrónico de barrido (SEM del inglés *Scanning electron microscope*) es un instrumento que se basa en el uso de electrones para analizar y crear imágenes superficiales de un espécimen en una atmósfera de vacío. Una fuente de electrones como puede ser de tungsteno o LaB<sub>6</sub> se calienta hasta emitir los electrones, los cuales son acelerados en un campo eléctrico. Ya que los electrones son emitidos de forma radial, se utilizan lentes condensadores, deflectores



**Figura 2.7** Diferentes señales emitidas durante la interacción del haz de electrones con la muestra. PE: electrones principales, SE: electrones secundarios, BSE: electrones retrodispersados, X-ray: rayos-X.

y objetivos que concentran el haz de electrones en un punto específico que permita sondear la muestra. La muestra a la vez se coloca sobre una plataforma que permita su movimiento en las tres dimensiones, para focalizar la sección a muestrear. Un rayo focalizado de electrones, al interactuar con la superficie del espécimen, genera varias señales que pueden ser captadas por detectores específicos, dependiendo el tipo de señal a analizar (figura 2.7). Los detectores se encuentran en un ángulo tal que el haz de electrones maximiza la detección. Los electrones secundarios, de menor energía, entregan información acerca de la morfología de la superficie. Los electrones retrodispersados, un poco más energéticos, permiten conocer un poco más de la composición de la superficie, ya que elementos más pesados permiten una mayor dispersión de los electrones, viéndose como superficies más claras.

Durante el proceso de transferencia de energía, los átomos que están dentro del volumen de interacción con el haz de electrones emiten rayos-X los cuales, al ser específicos de cada elemento, permiten realizar un análisis elemental de la muestra mediante espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS: *energy-dispersive X-ray spectroscopy* (Okano, 2018)).

Para muestras no conductoras, tales como elementos orgánicos, se puede llevar a cabo el análisis con SEM sin necesidad de recubrir la muestra; para ello se utiliza un bajo vacío y un voltaje de aceleración menor de los electrones del rayo incidente.

#### 2.4.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Al igual que en SEM, en un microscopio electrónico de transmisión (TEM, del inglés *transmission electron microscope*) se generan electrones que bombardean la muestra para iluminarla. En TEM, múltiples lentes y aperturas confinan y dirigen el haz de electrones a la muestra. Durante la interacción con la muestra, los electrones son dispersados de forma elástica e inelástica a diferentes ángulos. Después de abandonar la muestra y haber sido difractados, los electrones interfieren con el plano focal posterior de un lente objetivo, para formar patrones de difracción de electrones e imágenes de la muestra. Estas imágenes son producidas por la interferencia de fuentes puntuales en el plano de difracción, y magnificadas por un sistema de proyección (Tao et al., 2018).

Diferentes detectores se pueden utilizar para la obtención de imágenes. Los detectores que se encuentran sobre la muestra pueden ser de electrones secundarios, de electrones retrodispersados y elemental. Debajo de la muestra pueden encontrarse algunos detectores, como el de campo claro (BF: *bright-field*), el de campo oscuro (DF: *dark-field*), de patrones de difracción u otros, como el de campo oscuro anular de gran ángulo (HAADF: *high-angle annular dark-field*). Los más utilizados son el detector BF, que aprovecha distintos rayos difractados, incluyendo el haz principal, y el detector DF, que utiliza un número de rayos difractados sin incluir el rayo principal.

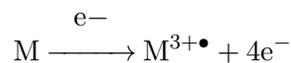
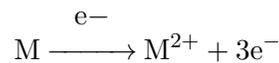
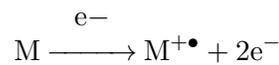
#### 2.4.5. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

La técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS: *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*) es una técnica de identificación que se basa en separar componentes volátiles de una mezcla, y fragmentarlos por impacto electrónico a fin de generar rupturas características de las estructuras analizadas.

Dado el funcionamiento de un GC, la muestra debe ser volátil y estable, por lo que aquellas moléculas de interés como son azúcares, ácidos grasos, nucleótidos, que tienen poca volatilidad, deben someterse previamente a procesos mediante reacciones químicas de derivatización que reducen su polaridad y aumenta su volatilidad y su estabilidad térmica (Yip and Chan, 2013).

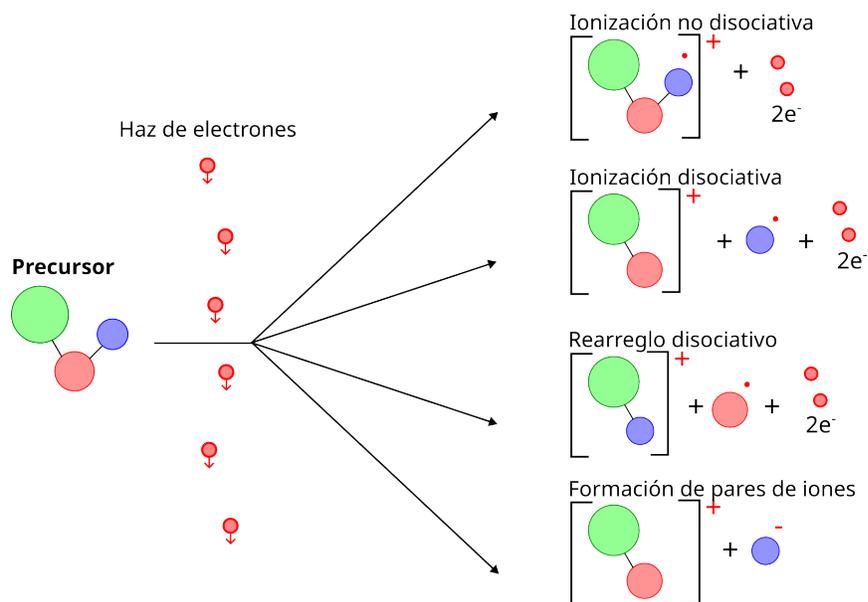
La muestra volátil es calentada y evaporada para ser inyectada usando un inyector en la fase móvil que es un gas acarreador inerte, como nitrógeno o helio. La fase móvil se encarga de transferir la muestra evaporada a la columna para su separación cromatográfica y detección. La columna tiene un diámetro interno de tamaño submilimétrico y longitud de hasta 100 m. En cromatografía gas-líquido las paredes internas de la columna están recubiertas con un material inerte adsorbente, como la sílice, que actúa como soporte para la fase estacionaria que es líquida. Si el componente es más soluble en la fase estacionaria entonces viajará más lento y tardará un tiempo mayor en salir de la columna; si el componente es menos soluble este viajará más rápido, saliendo de la columna en un tiempo menor. La columna es interpuesta en el horno que regula la temperatura de toda la columna y puede ser constante o con gradiente, afectando directamente la estabilidad y solubilidad del gas, así como el tiempo de retención de la muestra en la columna. Los resultados son mostrados en un cromatograma (Akash and Rehman, 2020a).

Después de haber sido analizada por el cromatógrafo de gases, cada uno de los componentes de la muestra que han sido separados se transfieren al espectrómetro de masas por medio de la columna de cromatografía. En el espectrómetro de masas, al impactar estas moléculas de carga neutral de la muestra (que se encuentra en estado gaseoso) con electrones con energía de varios electronvolts, se da lugar a la ionización de las moléculas, formando iones radicales positivos. Dependiendo de la molécula a ionizar y de la energía de ionización, pueden observarse iones de una, dos o tres cargas (siendo los iones de una carga los predominantes):



De la interacción de los iones con las moléculas neutras, distintos tipos de iones se pueden

producir (Gross, 2017), como se observa en la figura 2.8. Se pueden producir iones moleculares mediante una ionización no disociativa en la cual no se afecta la masa de la molécula precursora. La molécula precursora puede sufrir una ionización disociativa, resultando en iones de fragmentos producidos en patrones específicos de fragmentación. Se pueden presentar rearrreglos disociativos, es decir, fragmentaciones en las cuales un átomo o parte de la molécula se transfieran a un sitio distinto en la molécula. También se puede dar el caso de la formación de pares de iones.



**Figura 2.8** Procesos de ionización con electrones (Gross, 2017).

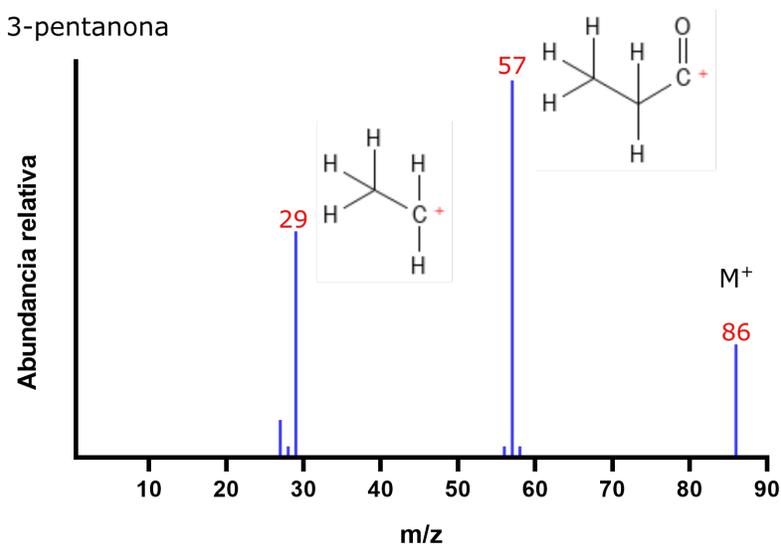
Cada uno de los cationes  $i$  de masa  $m$ , producidos durante el proceso de ionización, pasan a través de un campo eléctrico de energía  $eV$ , lo que los acelera hasta una velocidad señalada por la ecuación

$$Energy\ eV = \frac{1}{2}m_i v_i^2$$

Cada uno de los iones acelerados pasan a través de un analizador de masas, el cual separa los iones con base en la relación de su masa entre su carga ( $m/z$ ) utilizando campos magnéticos o eléctricos (Akash and Rehman, 2020b). Los iones seleccionados por el analizador de masas son captados por un multiplicador de electrones. El impacto electrónico genera señales para cada

ion de distinta masa, cuantificables debido a la carga específica de cada ion y cuya abundancia relativa es representada en la intensidad de cada pico en un espectro de masas.

Como un ejemplo de un espectro de masas se observa en la figura 2.9 el espectro correspondiente a la molécula de 3-pentanona. En un espectro de masas, cada ion es representado por su posición en el eje X y, ya que la carga de los iones es predominantemente de 1 e, este usualmente corresponde al peso del ion. El ion molecular ( $M^+$  o  $M^-$ ) corresponde al pico de mayor peso, que corresponde a 86 para este caso, mientras que los picos de menor peso, como lo son los picos en 29 y 57, corresponde a iones de fragmentos de la 3-pentanona. La magnitud de cada pico indica la abundancia relativa de cada ion, mostrándose la molécula de mayor abundancia como aquella de mayor intensidad relativa (100%) al compararse con los demás picos, en este caso el pico en 57.

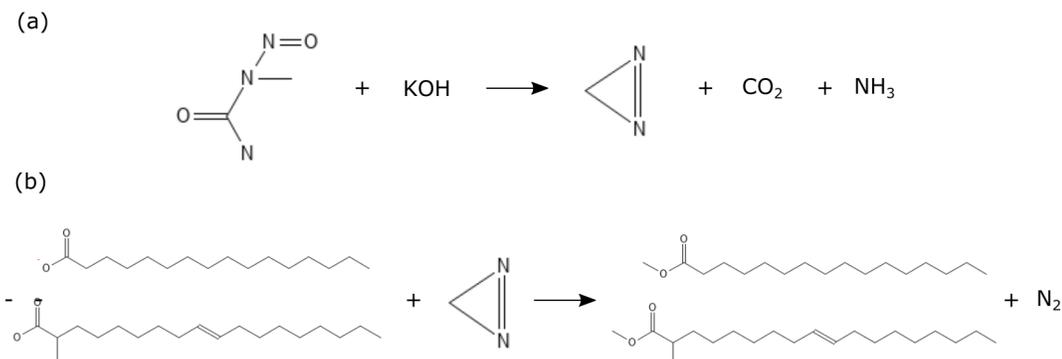


**Figura 2.9** Espectro de masas de 3-pentanona.

Por último, todas las moléculas analizadas por esta técnica deben ser volátiles, por lo que se recurrió a técnicas de derivatización.

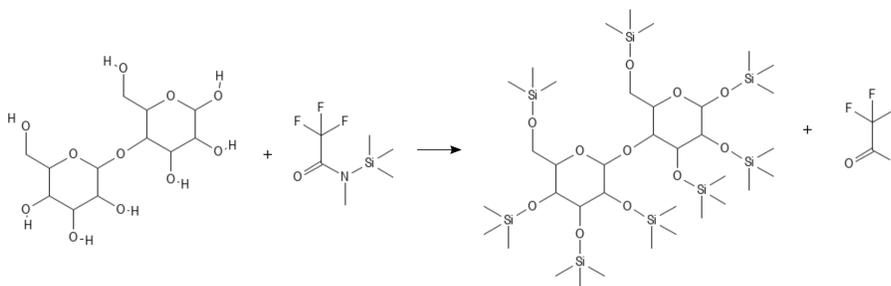
Para ser analizados en el cromatógrafo de masas, los ácidos grasos deben someterse a un proceso de metilación utilizando diazometano ( $CH_2N_2$ ), obteniendo ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs, del inglés *fatty acid methyl ester*) que se volatilizan para poder pasar en GC,

proceso representado en la Figura 2.10.



**Figura 2.10** (a) Reacción para obtención de diazometano y (b) proceso para metilar los ácidos grasos.

Para poder analizar la parte con el componente sacarídico, se lleva a cabo un proceso de derivatización de los grupos hidroxilo (-OH). Para ello se utiliza una solución de *N*-Metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) que, al reaccionar con el MSTFA, los hidrógenos de los grupos OH son sustituidos por trimetilsililos ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ) (Figura 2.11).



**Figura 2.11** Sililación de cada grupo OH de la molécula trealosa.

#### 2.4.6. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR del inglés *Fourier transform infrared spectroscopy*) es una técnica que utiliza la espectroscopía infrarroja, la cual trata el estudio de las interacciones de la energía electromagnética infrarroja con la materia, y a cuya señal obtenida se describe su análisis en sus componentes de frecuencia constituyentes mediante la técnica matemática conocida como transformada de Fourier.

El infrarrojo es parte del espectro electromagnético, correspondiendo a la región entre el visible y las microondas, es decir entre  $13,000$  y  $10\text{ cm}^{-1}$ . La zona de mayor interés para realizar el análisis químico es la del infrarrojo medio, que corresponde a los  $4,000$  y  $400\text{ cm}^{-1}$ , ya que la mayor parte de las frecuencias vibracionales de las moléculas corresponden a este espectro (Alvarez-Ordóñez and Prieto, 2012). Las medidas de absorción usualmente están señaladas como número de onda ( $\tilde{\nu}$ ) o como longitud de onda ( $\lambda$ ), siendo  $\text{cm}^{-1}$  y  $\mu\text{m}$  sus unidades recomendadas respectivamente, relacionadas por la siguiente ecuación (Alvarez-Ordóñez and Prieto, 2012):

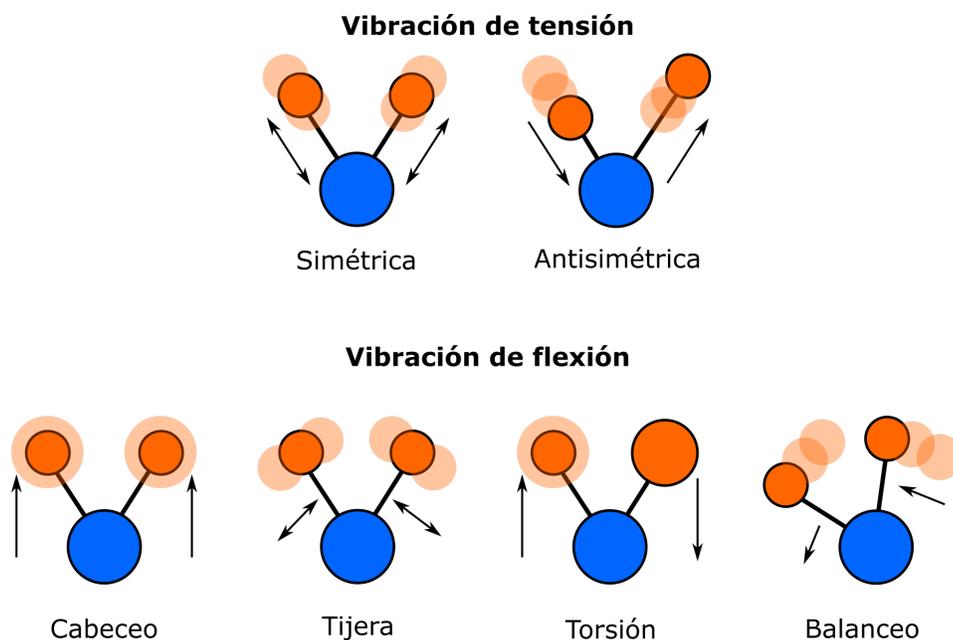
$$\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\mu\text{m})} \times 10^4 \quad (2-1)$$

Cuando el haz infrarrojo interactúa con la muestra, la energía es absorbida por los enlaces químicos, lo que causa vibraciones de los enlaces químicos, es decir, cambios en el momento dipolar (cambio en la distancia del enlace químico entre dos átomos). Para que la molécula absorba la radiación, la frecuencia de la radiación infrarroja debe ser igual a la frecuencia de la vibración, la cual está relacionada al tipo de enlace químico que se analiza (como puede ser C-H, O-H, C=O) y al tipo de vibración (como pueden ser estiramiento simétrico, estiramiento asimétrico, y flexión simétrica) (Abidi, 2021). La energía asociada a la radiación absorbida por la molécula es convertida en varios tipos de movimientos rotacionales y vibracionales (Alvarez-Ordóñez and Prieto, 2012).

Aunque existen múltiples vibraciones posibles en una molécula poliatómica, son los tipos de vibración de tensión y de flexión (ver figura 2.12) los que producen un cambio en el momento dipolar (Nielsen, 2017).

#### 2.4.7. Producción de suero hiperinmune

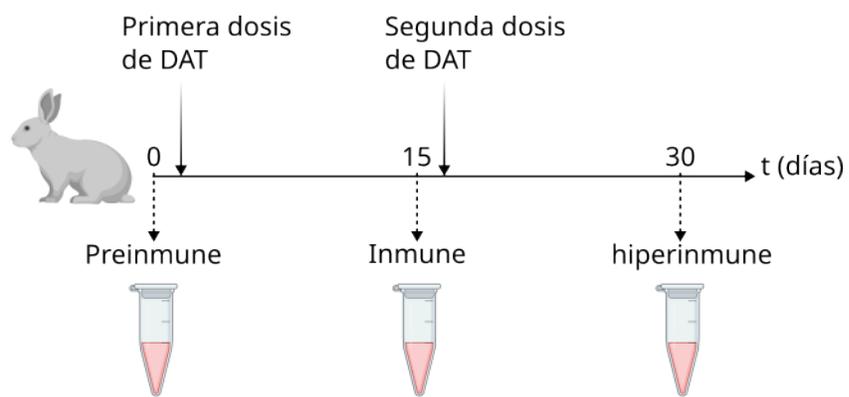
Para la realización de pruebas antígeno-anticuerpo se debe contar con anticuerpos que reaccionen específicamente con el antígeno DAT. Los anticuerpos son producidos en un modelo animal realizando una serie de inmunizaciones con el inmunógeno. En la Figura 2.13 se muestra el esquema de inmunización que se utiliza para la obtención de este suero. Los conejos se inmu-



**Figura 2.12** Modos vibracionales comunes de enlaces químicos. Imagen adaptada de (Cameron et al., 2020)

nizaron con 6.1 mg de fracción acetónica de lípidos antigénicos de un extracto de lípidos libres de *M. fortuitum* (entre los que se encuentra DAT) dispersados en 610  $\mu\text{L}$  de PBS 1x estéril y 610  $\mu\text{L}$  de adyuvante de Freund.

La obtención del suero preinmune se realizó sangrando al conejo, previa inoculación con los lípidos. La primer inmunización se realizó aplicando una dosis de los lípidos mediante inyección subcutánea en el lomo del conejo. La obtención del suero inmune se realizó 15 días después de la primer inmunización. La segunda inmunización se realizó aplicando una segunda dosis de los lípidos después de haber obtenido el suero inmune. El suero hiperinmune se obtuvo a los 9 días de la segunda inoculación.



**Figura 2.13** Proceso para obtención de suero preinmune y suero hiperinmune.

## Capítulo 3

# Justificación

TB es la enfermedad a la que se le atribuye la mayor cantidad de muertes causadas por un agente infeccioso. Debido a la complejidad de la enfermedad y de las condiciones de las personas que más la sufren (relacionada principalmente a condiciones de pobreza), la OMS ha recomendado el desarrollo de nuevos métodos que permitan un diagnóstico de forma rápida, sin la necesidad de personal entrenado y que sea adaptable a las condiciones con la menor infraestructura, permitiendo así la aplicación de tratamiento y evitando el esparcimiento de la enfermedad.

Ya que la TB es una enfermedad crónica, la detección de anticuerpos es una opción prometedora. Para ello es necesaria la propuesta de una plataforma biorreceptora basada en antígenos altamente específicos. Una biomolécula antigénica prometedora es la molécula anfipática diacil trealosa (DAT), que ha mostrado reaccionar con anticuerpos específicos durante la TB activa.

El carácter no hidrosoluble del DAT ha impedido su desarrollo para ser utilizado en dispositivos de diagnóstico. Por lo tanto, en este proyecto se propone el desarrollo de una plataforma nanotecnológica capaz de desplegar al DAT en un formato coloidal mediante el uso de bicapas lipídicas (liposomas) capaces de transducir la señal de la reacción DAT-anticuerpos.

## Capítulo 4

# Hipótesis

El antígeno micobacteriano DAT, de naturaleza anfipática, puede ser desplegado en una construcción coloidal, basada en bicapas lipídicas, y capaz de capturar anticuerpos anti-DAT.

# Capítulo 5

## Objetivos

### 5.1. Objetivo General

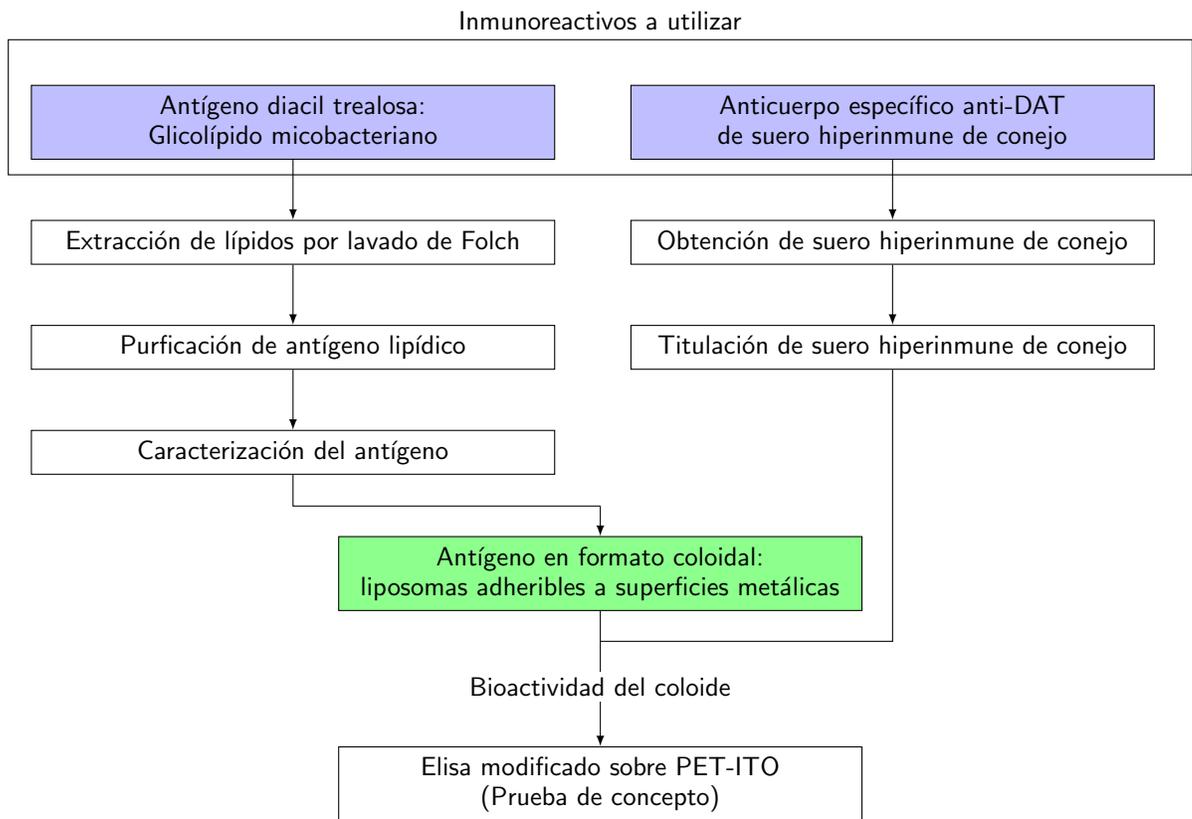
Obtener una construcción coloidal que despliegue el antígeno DAT para la captura de anticuerpos anti-DAT.

### 5.2. Objetivos Particulares

- Producir bicapas lipídicas que desplieguen el antígeno anfipático DAT.
- Realizar una prueba de concepto para demostrar la captura de anticuerpos por el sistema desarrollado.

## Capítulo 6

# Esquema experimental



## 6.1. Materiales y reactivos

En la tabla 6.1 se listan los reactivos y material utilizados.

**Tabla 6.1** Material y reactivos utilizados.

Reactivos	
<i>Reactivo</i>	<i>Descripción</i>
BSA	Albumina de suero bovino CAS:9048-46-8 de Sigmr
ABTS	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub> -(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Roche:10102946001
Ácido cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> CAS:77-92-9 de Sigma-Aldrich
Ácido cloroáurico	HAuCl <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O CAS:16961-25-4 de Sigma-Aldrich
Cianoacrilato	Adhesivo a base de cianoacrilato Kola Loka en gotero
Anticuerpo secundario	Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano ab97200 de Abcam
Antrona	Antrona al 2% en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Azul de molibdeno	Reactivo en aerosol azul de molibdeno de Sigma-Aldrich M1942
Citrato de sodio	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O CAS:6132-04-03 de SIGMA
Cloroformo	CHCl <sub>3</sub> CAS:67-66-3 J. T. Baker
Dodecanotiol	1-Dodecanotiol, C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> S CAS:112-55-0 de Aldrich
Fosfatidilcolina	L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de soya CAS:8002-43-5
Hidróxido de sodio	NaOH CAS:1310-73-2 J. T. Baker
Metanol	CH <sub>3</sub> OH CAS:67-56-1 J. T. Baker
Peroxido de hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de Jaloma
Materiales	
<i>Material</i>	<i>Descripción</i>
Columna de purificación Sep-Pak	Cartuchos para extracción en fase sólida Sep-Pak Vac 6cc 500mg WAT0403400 de Waters
Membranas porosas	Membranas de policarbonato Nuclepore con poros de 400 nm (WHA800282) y 1 $\mu$ m (WHA800309) de Whatman
Microplaca 8x12	Placa de microtitulación de 96 pozos PolySorp Nunc:475094 de Sigma-Aldrich
Microplaca 4x6 PET-ITO	Placas para cultivo celular de 24 pozos con fondo plano NEST Película de tereftalato de polietileno recubierta con óxido de indio y estaño 636303 Aldrich
Placas de cromatografía	Placas de vidrio para cromatografía en capa fina (TLC) de 20 x 20 cm y de 10 x 20 cm con tamaño de poro de 60 angstroms e indicador fluorescente F254 de Merck
Rejillas para TEM	Rejillas de soporte Formvar/Carbon, malla 200, cobre Prod:01800-F Ted Pella
Tubos de baja adherencia	Tubos de microcentrífuga de polipropileno DNA LoBind Eppendorf 1.5 mL

## 6.2. Métodos

### 6.2.1. Sueros hiperinmunes

La obtención de los sueros hiperinmunes se llevó a cabo de manera previa a este trabajo. Se utilizaron sueros hiperinmunes de conejo, los cuales fueron obtenidos por inmunización de conejos Nueva Zelanda de 2 meses de edad con una fracción de lípidos de la especie *M. fortuitum* enriquecida con el glicolípido DAT. La titulación del suero fue realizada por ELISA como se menciona en la sección 7.3 comparando la reactividad de DAT puro entre el suero hiperinmune y suero de un conejo no inmunizado (suero preinmune).

### 6.2.2. Purificación de diacil trealosa (DAT)

La purificación del antígeno se realizó como previamente se detalla por Escamilla *et. al.* (Escamilla et al., 1996). Brevemente, lípidos de *M. fortuitum* fueron extraídos del bacilo vivo utilizando  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (1:2, vol/vol) por 4 días y después con  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1,vol/vol). La fase orgánica se lavó con agua antes de secado. Los extractos crudos de lípidos de *M. fortuitum* se disolvieron en volumen mínimo de  $\text{CHCl}_3$  y aplicados a una columna de Florisil, Malla 60 a 100. Las eluciones se realizaron con  $\text{CHCl}_3$  seguido de concentraciones crecientes de  $\text{CH}_3\text{OH}$  en  $\text{CHCl}_3$  (5:95, 10:90, 15:85, 20:80 y 30:70, vol/vol) para la purificación de las trealosas aciladas. Realizando un monitoreo con TLC de las distintas fracciones, se observó que la fracción al 15 % contenía la diacil trealosa al visualizar los compuestos en la placa al rociar las placas con antrona disuelta en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 2 % y calentar a 110°C.

La fracción 85:15 ( $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ , vol/vol) que contenía el DAT se concentró en un evaporador giratorio para después purificarse en una columna pequeña de purificación SepPak. La columna fue irrigada sucesivamente con  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  en concentraciones cada vez mayores de  $\text{CH}_3\text{OH}$  (100:0, 90:10, 87.5:12.5, 85:15 y 80:20, vol/vol) con 24 ml de cada eluyente. Los efluentes fueron recogidos y examinados con TLC utilizando antrona disuelta en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 2 % para la detección de DAT. Las fracciones purificadas de DAT fueron agrupadas para su utilización en inmunoensayos.

### 6.2.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*) se llevó a cabo en microplacas de 8x12 pocillos. Los pocillos fueron sensibilizados con 1  $\mu\text{g}$  de DAT purificado, diluido en 100  $\mu\text{L}$  de n-hexano:etanol (1:1, vol/vol), dejando secar 4 horas a 37°C dentro de una campana de extracción de gases. Los pozos fueron saturados con 200  $\mu\text{L}$  de solución de BSA diluido al 3%(peso/vol) en solución tamponada de fosfatos 1x (PBS 1x) (PBS con BSA 3%) a 37°C por 1 hora y lavada 3 veces con PBS con BSA 0.3%. Las muestras de suero fueron diluidas en PBS con BSA 0.3% para obtener diluciones 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 y 1/3200 (vol/vol). Las diluciones seriadas se agregaron a los pocillos de la microplaca por triplicado y se incubaron por 1 hora a 37 °C. Después de 5 lavados con PBS con BSA 0.3%, 100  $\mu\text{L}$  de una solución de anticuerpos secundarios anti-Fc de conejo conjugados con peroxidasa, diluidos en PBS con BSA 0.3% (en proporción 1:15,000, vol/vol), fueron incubados por 1 hora a 37°C. Después de 5 lavados con PBS con BSA 0.3%, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de sustrato ABTS, y la reacción enzimática fue incubada por 30 minutos a 37°C al abrigo de la luz. Se realizó la medición de densidad óptica en cada pocillo utilizando un lector de microplacas BIO-RAD iMark a 415 nm. El sustrato ABTS se preparó de la siguiente manera:

- Se preparó una solución amortiguadora de citratos mezclando 980.2 mg de ácido cítrico y 1.44 g de citrato de sodio en 80 mL de agua destilada. Se ajustó el pH de la solución con NaOH y/o HCl a 4.4. Ajustado el pH se aforó a 100 mL.
- Se disolvieron 25 mg de ABTS en 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada, sin exponer a la luz
- Se preparó el sustrato ABTS mezclando 19.58 mL del amortiguador de citratos, 400  $\mu\text{L}$  de ABTS disuelto en agua y 20  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno al 30%.

### 6.2.4. Preparación de liposomas unilaminares (LUVs)

Para la preparación de liposomas se utilizaron dos tipos de mezclas lipídicas: (a) liposomas control con fosfatidilcolina de soya:dodecanotiol (70:30 mol/mol) y, (b) liposomas antigénicos

con fosfatidilcolina de soya:dodecanotiol:DAT (20:30:50, mol/mol/mol). Los lípidos fueron disueltos y mezclados en cloroformo-metanol (9:1, vol/vol), y secados bajo corriente de nitrógeno y en desecador al vacío. Posteriormente, por cada mg de lípido se agregó 1 ml de agua milli-Q a 50°C, promoviendo el autoensamblaje de bicapas de lípidos por pasaje de la muestra a través de una aguja calibre 21. Las vesículas obtenidas fueron en su mayoría vesículas multilaminares, vesículas que contienen dentro de sí vesículas de menor tamaño, y en menor medida vesículas unilaminares. Ya que se busca tener un tamaño homogéneo que permita obtener solo liposomas unilaminares, los liposomas fueron extruidos a través de poros de 1  $\mu\text{m}$  y después por poros de 400 nm, repitiendo cada extrusión 10 veces. Esta serie de extrusiones permitió obtener LUVs, ya que al ser de un tamaño <400 nm se impide la formación de vesículas multilaminares.

#### **6.2.5. Inmunoensayo modificado sobre tereftalato de polietileno recubierto con óxido de estaño e indio (PET-ITO)**

Para analizar la bioreactividad del antígeno desplegado en bicapas lipídicas (proceso que requiere lavados con soluciones acuosas) se llevó a cabo un inmunoensayo modificado sobre PET-ITO, es decir se procedió a inmovilizar los liposomas sobre esta superficie, aprovechando la unión estable de grupos tiol del dodecanotiol y superficies de ITO (Yan et al., 2000).

Para ello, se utilizaron liposomas a una concentración de 0.1 mg de lípido por ml, es decir una dilución 1/10 (vol/vol) de los liposomas preparados. Se prepararon láminas de PET-ITO, cortando cuadros de 1  $\text{cm}^2$  que pudieran ser introducidos en placas de 24 pocillos. De manera previa a la funcionalización, los cuadros fueron raspados del lado del PET, a fin de crear una superficie rugosa que fuera fácilmente adherida a superficies plásticas (en este caso, pocillos de microtitulación).

Para inmovilizar los liposomas, los cuadros de PET-ITO fueron incubados en suspensiones de liposomas (0.5 ml), colocando la cara de ITO en contacto con la suspensión de liposomas, y teniendo cuidado de que no se formaran burbujas en la interfaz. Este arreglo se incubó por 30 min a 37°C.

Una vez los liposomas inmovilizados, los cuadros de PET-ITO fueron pegados con cuidado

en el fondo de los pocillos, utilizando el adhesivo cianoacrilato (Zheng et al., 2022), el cual se dejó secar por 10 min dentro de una campana de flujo laminar libre de partículas.

Las superficies de ITO con bicapas lipídicas adheridas fueron subsecuentemente utilizadas para realizar incubaciones y lavados del inmunoensayo modificado, tal como se detalla a continuación:

1. Lavado de la superficie con bicapas lipídicas: las láminas de PET-ITO se sumergieron 5 veces en un frasco con PBS-BSA al 0.3%, y 5 veces más en un segundo frasco con la misma solución. Se dejaron secar los cuadros por 5 minutos.
2. Bloqueo de sitios activos con BSA: a fin de bloquear con una proteína inerte todos los sitios activos, tanto en el ITO funcionalizado, como en las paredes del pocillo, se incubó el ITO funcionalizado con una solución de BSA al 3% en PBS (0.5 ml), dejando incubar por 1 h a 37°C.
3. Lavados: al final del bloqueo, la superficie fue lavada con cuidado (utilizando micropipeta), con PBS-BSA al 0.3%, teniendo cuidado de no tocar el material. El lavado fue realizado 5 veces.
4. Reacción antígeno-anticuerpo: los sueros fueron agregados en las diluciones deseadas, utilizando volúmenes de 300  $\mu$ l e incubando por una noche a 4°C. En este ensayo, los sueros (preimmune e hiperimmune) fueron diluidos 1/100 en PBS-BSA al 0.3%.
5. Unión de un segundo anticuerpo unido a enzima: después de haber realizado 5 lavados con PBS-BSA al 0.3%, se agregó un segundo anticuerpo (300  $\mu$ l por pozo), para lo cual se utilizaron anticuerpos secundarios anti-Fc de conejo unidos a peroxidasa de rábano negro (Abcam Cat. ab97200), diluidos 1/30,000 en PBS-BSA al 0.3%. Esta reacción se dejó incubando por 1 h a 37°C.
6. Lavados: los anticuerpos en exceso fueron lavados 5 veces con PBS-BSA al 0.3%.
7. Revelado con sustrato enzimático: se agregaron 300  $\mu$ l del sustrato ABTS (preparado

como se mencionó en la sección 6.2.3, y se dejó incubando por 30 min a 37°C al abrigo de la luz.

8. Lectura del ensayo: Para la medición de la densidad óptica obtenida en cada pocillo, se transfirieron 200 µl del líquido sobrenadante a pocillos de una microplaca con 96 pocillos, la cual fue analizada en un espectrofotómetro de microplacas a 415 nm.

### **6.2.6. Identidad química del antígeno DAT**

#### **Desacilación de DAT**

Se realizó la desacilación de la molécula de DAT para el posterior análisis de sus componentes lipídicos y glicosídicos individuales. Para ello se colocó 1 mg de DAT disuelto en 1 ml de cloroformo-metanol (2:1, v/v) y se agregó 1 ml de NaOH 0.2 M. Después de haber incubado la muestra por 30 min a 37°C. Se añadieron unas gotas de ácido acético glacial, hasta neutralización de la muestra, se dejó secar bajo corriente de nitrógeno y se procedió a realizar un lavado de Folch (Folch et al., 1957) para separación de los componentes polares (azúcares), en la fase acuosa, y lipídicos, en la fase orgánica. El lavado se realizó añadiendo a la muestra cloroformo, metanol y agua en una proporción 4:2:1 (vol/vol/vol). Cada una de las fases fue secada bajo corriente de nitrógeno y conservada hasta la formación de derivados volátiles.

#### **Preparación de derivados volátiles y análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).**

Todos los procesos de derivatización química fueron realizados dentro de una campana de extracción de gases. 15 mL de éter etílico (cubierto para evitar evaporación) y un matraz erlenmeyer de 500 mL se dejaron enfriar por 15 minutos en hielo. Se preparó en un matraz erlenmeyer 3 mL de solución acuosa al 40% de KOH en agua. Se agregaron los 3 mL de la solución con KOH y los 15 mL de éter al matraz de 500 mL. En un frasco erlemeyer de 250 mL se agregaron 4 “lentejas” de KOH (para eliminar la humedad) y se dejó enfriando en hielo.

Se pesó 1 g de nitrosometilurea y se agregó la solución acuosa agitando hasta obtener una

coloración amarilla. Se decantó la parte superior que contenía el diazometano gaseoso (soluble en el éter) en el frasco erlenmeyer previamente enfriado con las “lentejas” de KOH. Después de 15 minutos incubando a temperatura ambiente, se agregaron 10 gotas de la solución etérea de diazometano a las muestras de ácidos grasos proveniente del DAT. Dentro de una campana de extracción de gases, se sumergió el tubo de ensayo en agua caliente por intervalos de un segundo, hasta evaporación total. La muestra (que contenía los derivados de ésteres metílicos de ácidos grasos) fue disuelta en hexano, y trasvasada a un vial ámbar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Las condiciones que se utilizaron para llevar a cabo la caracterización fueron para  $1\ \mu\text{L}$  de cada muestra de ácidos grasos. El gas acarreador utilizado fue nitrógeno con un flujo constante de  $0.6\ \text{ml}/\text{min}$ . La temperatura inicial fue de  $150^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, un aumento de  $12^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $200^{\circ}\text{C}$  por 17 minutos y un aumento de  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $252^{\circ}\text{C}$  por 6.5 minutos. La fuente de ionización fue de  $70\text{eV}$  a  $230^{\circ}\text{C}$ . Se seleccionaron los iones de McLafferty a 74 u 88 amu.

Los azúcares se derivatizaron al agregar  $200\ \mu\text{L}$  de *N*-Metil-*N*-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MTSFA) en el frasco con tapa que contenía los azúcares, agitando ligeramente hasta que la muestra se diluyó. La muestra disuelta se trasvasó a un nuevo vial ámbar a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su análisis.

Se repitieron las condiciones utilizadas para llevar a cabo la caracterización de los azúcares con la única diferencia de la temperatura. La temperatura inicial fue de  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, un aumento de  $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $200^{\circ}\text{C}$  y un aumento de  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $300^{\circ}\text{C}$ .

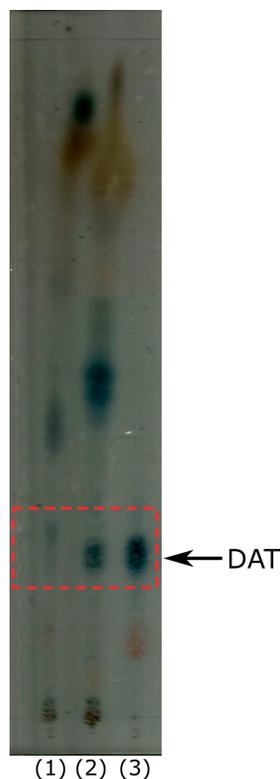
## Capítulo 7

# Resultados y discusión

### 7.1. Purificación del antígeno DAT

Para mostrar la distribución del antígeno DAT en *Mtb* y *M. fortuitum*, se realizó una TLC de extractos de ambos bacilos, comparando con una muestra purificada de DAT (Figura 7.1). Como se puede observar en el carril 1 y 2, ambos extractos muestran un compuesto positivo a la reacción con antrona, de movilidad cromatografía consistente con el DAT. De acuerdo con la literatura, la estructura del DAT de *M.fortuitum* es bastante cercana a la del DAT de *Mtb* (Gautier et al., 1992; Besra et al., 1992; Hamid et al., 1993), así como su capacidad para ser reconocido por anticuerpos de individuos con TB activa (Escamilla et al., 1996; Julián et al., 2004). *M. fortuitum* fue, por lo tanto, seleccionada como la especie de partida para la obtención de este antígeno micobacteriano. El análisis de la Figura 7.1 también señala que la especie *M. fortuitum* (carril 2) produce DAT en una proporción mucho mayor, con respecto a los lípidos totales, mientras que *Mtb* sintetiza una mayor variedad de lípidos donde el DAT resulta un componente minoritario (carril 1).

La purificación del DAT a partir del extracto de *M. fortuitum* se realizó eluyendo con mezclas de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  en proporciones 100:0, 90:10, 87.55:12.5, 85:15 y 80:20 (v:v). En la Figura 7.2 se pueden observar perfiles de lípidos de las fracciones obtenidas. Se observa que la fracción en el carril 3 que corresponde al eluyente  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (90:10) contenía DAT en una mayor



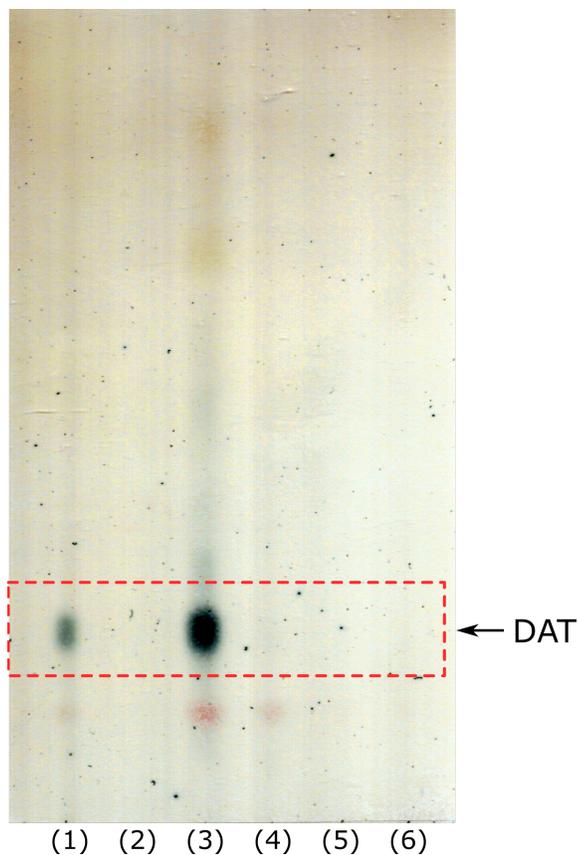
**Figura 7.1** TLC sobre gel de sílice de extractos de lípidos totales de Mtb (1), *M. fortuitum* (2) y de un estándar del antígeno DAT (3). Eluyente:  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (9:1 v/v). Revelado: antrona/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $110^\circ\text{C}$

cantidad. Los carriles restantes no presentaron ninguna señal, indicando la pureza del extracto utilizado.

## 7.2. Caracterización del antígeno DAT

### 7.2.1. Identidad cromatográfica

Para confirmar la estructura del lípido DAT que se purificó como se señala en la sección 7.1, en este trabajo se realizó el análisis de sus componentes individuales, azúcares y ácidos grasos, después de haber sido liberados por solvólisis alcalina a partir de la molécula purificada. La estrategia se encuentra esquematizada en la Figura 7.3, y consistió en romper los enlaces éster para liberar los acilos grasos, obteniéndose también los azúcares. Enseguida, cada componente fue transformado en derivados volátiles, a fin de ser posteriormente analizados por cromatografía



**Figura 7.2** TLC sobre gel de sílice de un estándar del antígeno DAT (1) y de fracciones obtenidas de un extracto de *M. fortuitum* utilizando los eluyentes  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  en proporciones 100:0 (2), 90:10 (3), 87.55:12.5 (4), 85:15 (5) y 80:20 (6) (v:v). Eluyente:  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (9:1 v/v). Revelado: antrona/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $110^\circ\text{C}$

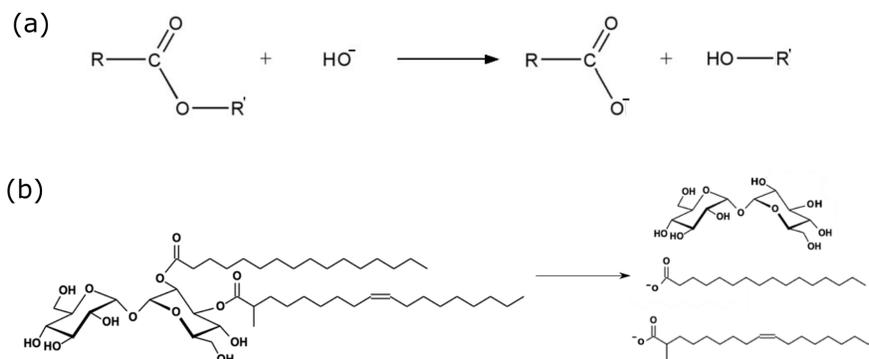
de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC/MS).

## 7.2.2. Análisis de componentes individuales

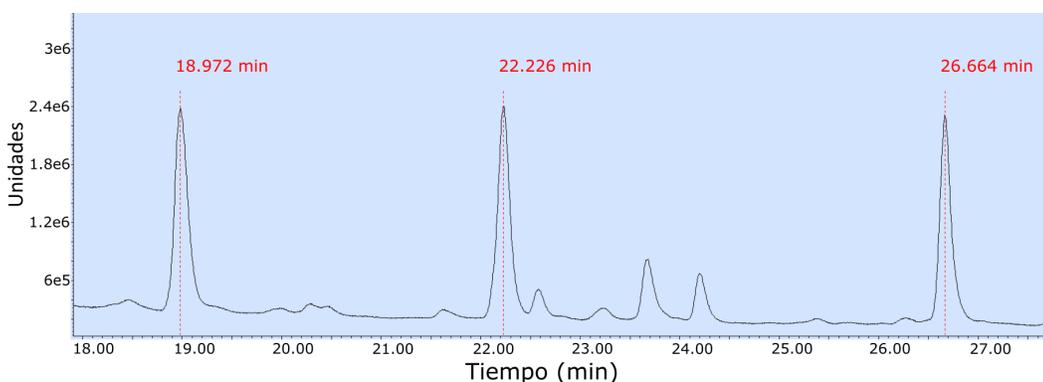
### Ácidos grasos

Para ser analizados en el cromatógrafo de masas, los ácidos grasos pasaron por un proceso de metilación como se explicó en la sección 2.4.5. Los resultados del análisis de ácidos grasos se muestran en la Figura 7.4. El análisis cromatográfico mostró tres picos principales, con tiempos de elución de 18.97, 22.22, y 26.66 minutos.

Para cada molécula separada se obtuvo el espectro de masas. En la Figura 7.5 se observa el



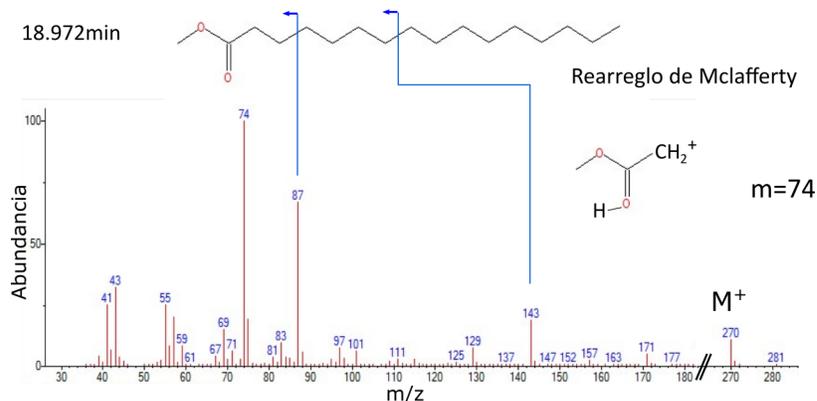
**Figura 7.3** (a) Proceso simplificado de desacilación y (b) resultado de desacilación de la molécula DAT.



**Figura 7.4** Análisis cromatográfico de los ácidos grasos de DAT.

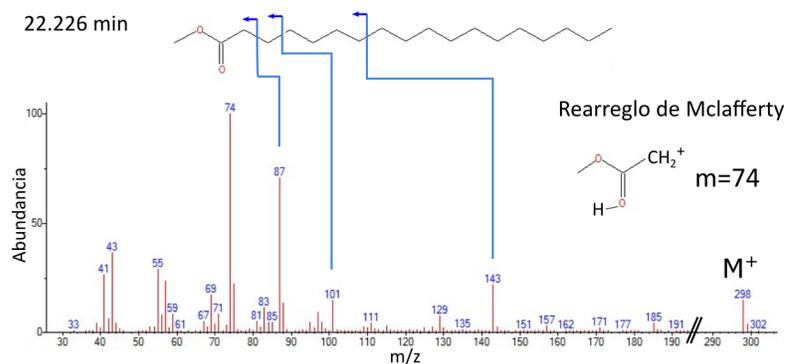
espectro de masas del pico eluido a los 18.97 minutos. La molécula propuesta es un ácido methylhexadecanoico  $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$ , cuya masa es de 270, masa del ion molecular ( $\text{M}^+$ ). Esta molécula cumple con las condiciones para que, al ser ionizado en el cromatógrafo, se lleve a cabo un arreglo de McLafferty. Durante este arreglo, la cadena de carbonos se rompe entre el primer y segundo carbono, el doble enlace se convierte en un enlace sencillo y el oxígeno adquiere una carga positiva, además de enlazar un hidrógeno. Este rearrreglo provoca la formación del ion de masa 74 uma que se observa como el pico de mayor intensidad. Para el pico de 87 uma se debe producir un corte entre el carbono 2 y 3 que da como resultado un ion con masa 87 uma y para el ion en 143 uma debe darse un corte entre el carbono 7 y 8, explicando así los picos de mayor intensidad que se observan en el espectro y confirmando la existencia del ácido hexadecanoico.

Para el pico obtenido en el minuto 22.22, el espectro de masas se presenta en la Figura 7.6.



**Figura 7.5** Espectro de la fracción obtenida a los 18.972 minutos del análisis cromatográfico de la muestra de ácidos grasos de DAT.

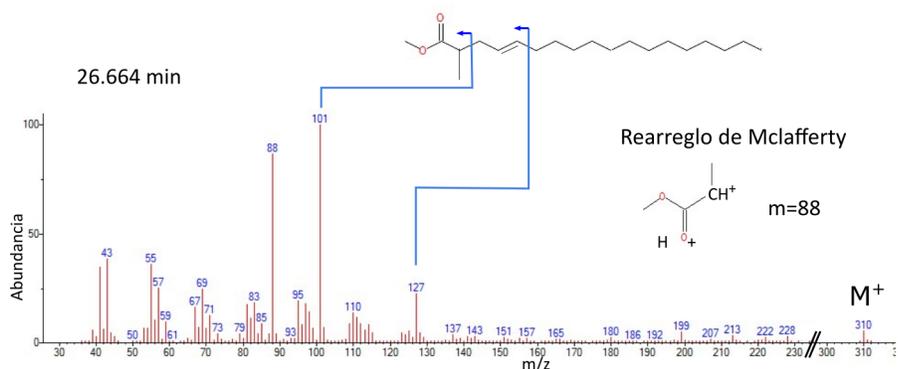
La molécula propuesta es un metil estearato  $C_{19}H_{38}O_2$  con una masa de 298 uma, que es la masa del ion molecular, y que igualmente se presenta como el pico con mayor masa por carga ( $M^+$ ). La molécula cumple de igual forma para que se lleve a cabo un arreglo de McLafferty, provocando la formación de un ion de masa 74 uma. Para el pico en 87 uma se debe dar un corte entre el segundo y tercer carbono. Para el pico en 101 uma el corte debe darse entre el tercer y cuarto carbono. Y para el pico en 143 uma debe darse el corte entre el sexto y séptimo carbono.



**Figura 7.6** Espectro de la fracción obtenida a los 22.226 minutos del análisis cromatográfico de la muestra de ácidos grasos de DAT.

Para el pico que se obtuvo en el minuto 26.66 el espectro de masas se observa en la Figura 7.7. La molécula propuesta es un ácido metil-octadecenoico  $C_{20}H_{38}O_2$  con una masa de 310

una, con un metilo en el segundo carbono y un doble enlace entre el tercer y cuarto carbono. Para esta molécula se lleva a cabo un rearrreglo de McLafferty obteniendo el ion con masa 88 uma. Para obtener el pico en 101 uma se obtiene una molécula cortando entre el segundo y tercer carbono. Para obtener el pico que se observa en 127 uma se obtuvo un corte entre el carbono 4 y 5.



**Figura 7.7** Espectro de la fracción obtenida a los 26.664 minutos del análisis cromatográfico de la muestra de ácidos grasos de DAT.

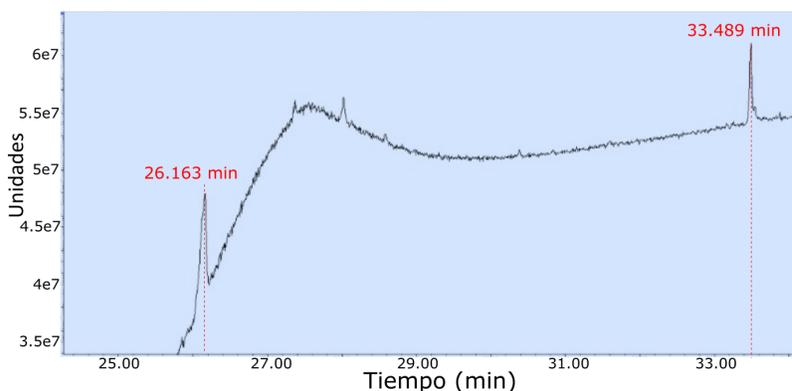
Se observa que para los ácidos grasos de cadenas más largas, el tiempo de retención es mayor, lo mismo para aquellos que tienen enlaces dobles. Estas características se han observado previamente en FAMES (Manzano et al., 2011), y las moléculas propuestas concuerdan tanto en los resultados de GC como en su perfil de fragmentación por impacto electrónico.

La composición obtenida

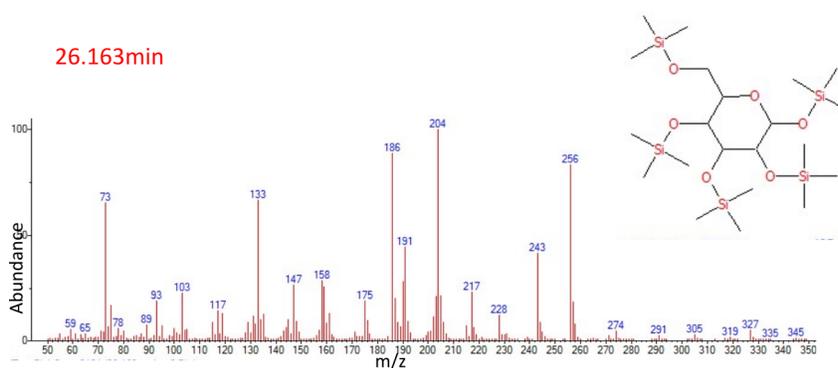
### Componentes sacarídicos

Para poder analizar la parte compuesta por una molécula de trealosa, se llevó a cabo un proceso de derivatización como se mencionó en la sección 2.4.5. Los resultados del cromatógrafo de gases para la trealosa derivatizada se muestran en la Figura 7.8. El mayor pico que se observa y que eluye al minuto 26.16 es analizado en el espectro de la Figura 7.9. La molécula propuesta para este espectro es una glucosa cuyos hidrógenos en cada uno de sus grupos hidroxilos han sido sustituidos por un  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . Se observa un pico en 73 uma que corresponde en peso al ion de trimetilsilil. Se ha observado en un estudio previo (Goulart et al., 2014) que los picos 204,

191, 217 se asocian a la molécula de glucosa trimetilsililada. Esta molécula se encuentra debido a que la trealosa es un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa.



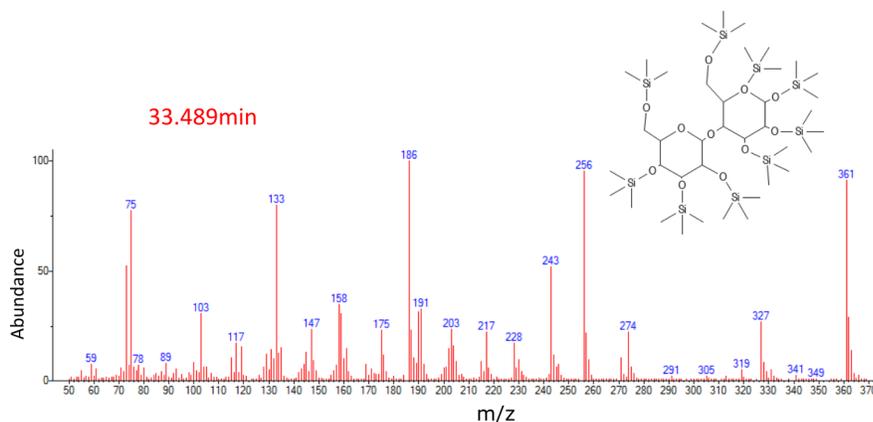
**Figura 7.8** Análisis cromatográfico de la trealosa obtenida del DAT.



**Figura 7.9** Espectro de la fracción obtenida a los 26.163 minutos del análisis cromatográfico de la muestra de la trealosa obtenida del DAT.

Para el espectro de masas correspondiente al disacárido conformado por 2 moléculas de glucosa (Figura 7.10), se propone la molécula trealosa en la que cada hidrógeno del grupo OH ha sido sustituido por un grupo  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$  con una masa molar de 919. Se propone esta molécula debido a que presenta los picos 73, 147, 191, 243 y 361 que se han observado en moléculas trimetilsililadas de trealosa al ser ionizadas (Füzfai et al., 2008).

Los resultados demostraron que la composición corresponde a ácidos grasos de cadenas largas que presentan en algunos casos insaturaciones y metilaciones y también de un disacárido compuesto de dos moléculas de glucosa, lo cual corresponde a los resultados obtenidos para la



**Figura 7.10** Espectro de la fracción obtenida a los 33.489 minutos del análisis cromatográfico de la muestra de la trealosa obtenida del DAT.

molécula de DAT, ambos resultados correspondientes para la molécula de DAT reportado en trabajos previos (Ariza and Valero-Guillén, 1994; Saavedra et al., 2001). La estructura compuesta por los ácidos grasos que conforman la parte hidrofóbica y de la trealosa que conforma la parte hidrofílica resalta su naturaleza anfipática, la cual será de utilidad para su disposición en el diseño del sistema coloidal que se mostrará en la sección 7.4.

El equipo utilizado para llevar a cabo la GC-MS, para los ácidos grasos, como para los componentes sacarídicos, fue un inyector de muestras líquidas Agilent 7683B, un cromatógrafo de gas Agilent Technologies 6890N, un detector selectivo de masas Agilent 5975 y una columna capilar de sílice fundida de 100 m x 0.25 mm Varian CP7489.

## 7.3. Control de calidad del suero utilizado

### 7.3.1. Esquema de inmunización utilizado

Dado que el montaje de un nuevo método requiere la realización de múltiples ensayos, era necesario contar con anticuerpos de un lote homogéneo para las pruebas antígeno-anticuerpo. Por esta razón se utilizó un suero de conejo hiperinmune, es decir un suero proveniente de un conejo inmunizado con el antígeno DAT (el cual fue obtenido de manera previa en nuestro laboratorio). El proceso de obtención del suero hiperinmune se encuentra mencionado previamente

en la sección de técnicas experimentales.

### **7.3.2. Titulación del suero**

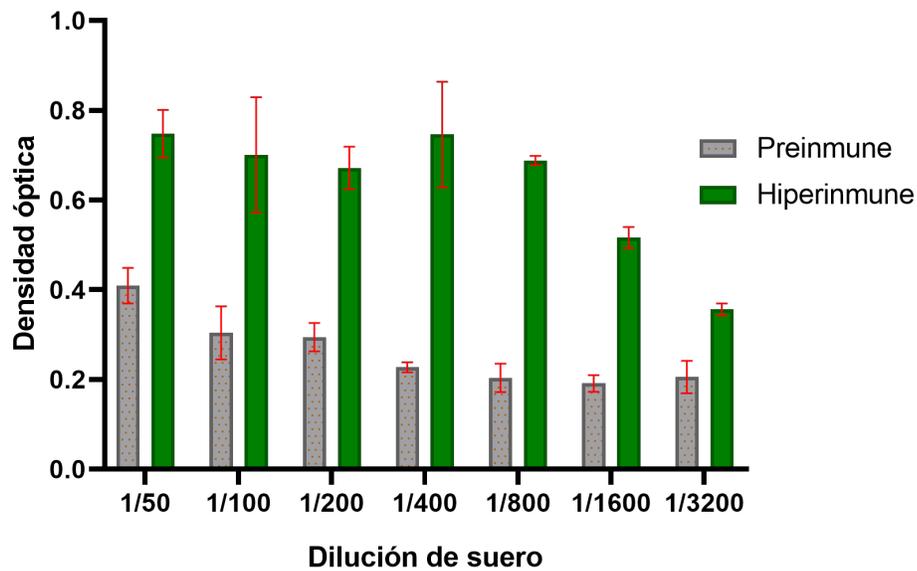
A fin de determinar si el suero hiperinmune tiene anticuerpos contra el antígeno purificado para este trabajo, se realizó un inmunoensayo enzimático ELISA con el DAT purificado como antígeno, y el suero hiperinmune diluido de manera serial. Como control se utilizó un suero de conejo no inmunizado.

Como puede observarse en la Figura 7.11, la reactividad de anticuerpos presentes en el suero hiperinmune es claramente mayor que la encontrada con el suero control, y la respuesta es dependiente de la dosis (a mayor dilución del suero, menos anticuerpos anti-DAT son capturados por el DAT, generándose menor señal colorimétrica). Si bien podemos observar que en el suero control se encuentra una reactividad al DAT, probablemente debido a la presencia de anticuerpos con reacción cruzada en los animales, que no fueron criados en condiciones libres de gérmenes, la diferencia de reactividades entre el animal inmunizado y el control es alta. De acuerdo con algunos autores, el título del suero hiperinmune es el recíproco de la dilución a la cual se obtiene una respuesta superior a la del suero control (Frey et al., 1999). Además, se considera una respuesta superior al control por 0.2 unidades de densidad óptica (Ramadass et al., 2008; Law and Marks, 1985) o del doble del valor del control negativo (Zylberman et al., 2020) (Figura 7.11), el título del suero hiperinmune anti-DAT es de 1600.

## **7.4. Diseño del sistema coloidal para desplegar el antígeno DAT**

El antígeno DAT es un glicolípido anfipático insoluble en soluciones acuosas. Dada su naturaleza anfipática, el DAT se encuentra en la superficie de Mtb autoensamblado en la micromembrana, es decir en la membrana externa de la pared celular de la bacteria. En este trabajo se exploró el uso de bicapas de lípidos (liposomas) para desplegar en ellas el DAT. Para ello, las bicapas fueron diseñadas con la siguiente composición:

- Un 50 % molar de DAT, para desplegar así el antígeno en grandes cantidades, mimetizando



**Figura 7.11** Inmunoensayo enzimático realizado para estimar el título del suero hiperimmune de conejo dirigido contra DAT. Se muestran los promedios de las densidades ópticas obtenidas con suero preimmune e hiperimmune, y la desviación estándar de 3 experimentos.

la superficie de Mtb en cuanto a su despliegue de este lípido basado en trealosa.

- Un 30 % de dodecanotiol, lípido que a través de su grupo tiol (-SH) tiene la capacidad de unirse a superficies metálicas. El dodecanotiol puede ser utilizado para unirse a oro gracias a la fuerte interacción que existe entre el azufre y el oro (Thanh and Green, 2010) principalmente por fisisorción (Inkpen et al., 2019). También se ha observado que puede formar enlaces bastante fuertes como el que forma con óxido de indio y estaño (Cerruti et al., 2007). Para los liposomas con DAT se eligió este porcentaje molar de dodecanotiol, tal como ha sido recomendado para otros liposomas bioactivos soportados en oro coloidal (Nie et al., 2021).
- Un glicerofosfolípido de amplia distribución en biomembranas, la fosfatidilcolina, como constituyente del restante 20 % molar.

## 7.5. Caracterización de liposomas

Los liposomas obtenidos fueron observados por microscopía electrónica de transmisión. Para promover la obtención de liposomas de una sola bicapa de lípidos, los liposomas multilaminares, formados de manera natural por autoensamblaje, fueron sometidos a una extrusión a través de membranas con poros de 400 nm, tamaño al cual un liposoma no podría contener múltiples capas, debido a la limitación en la curvatura de una bicapa de lípidos. Como puede observarse en la Figura 7.12, las vesículas obtenidas fueron de una talla de alrededor de 200 nm, es decir de una talla mucho menor a la esperada con el uso de poros de 400 nm. Esta característica es probablemente influenciada por la geometría del lípido principal de estas vesículas, el DAT, específicamente a la curvatura que el DAT impone en las bicapas lipídicas. Para los objetivos posteriores a este trabajo, consistentes en la preparación de un híbrido compuesto por liposomas con DAT soportados sobre nanopartículas de oro, una talla de 200 nm es conveniente, dado que las bicapas serían suficientes para recubrir nanopartículas de tallas menores a 100 nm. Cabe mencionar que los mecanismos propuestos de adherencia de bicapas sobre soportes sólidos consisten en la ruptura de liposomas, al contacto con la superficie, y dependen de varios factores, destacándose la interacción entre las vesículas y el soporte (Richter et al., 2003, 2006; Spustova, 2021). En el caso de los liposomas con DAT, la condición de una fuerte interacción entre vesículas y soporte estará dada por la afección del ITO y oro por el grupo tiol (Cerruti et al., 2007; Thanh and Green, 2010; Inkpen et al., 2019).

Otro método empleado para la caracterización de las vesículas fue la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Se obtuvieron los espectros FTIR de cada uno de los componentes lipídicos de los liposomas (fosfatidilcolina, dodecanotiol y el antígeno DAT), así como de los liposomas obtenidos. En la Figura 7.13 se pueden observar que los espectros de cada componente individual muestran las bandas de absorción esperadas, de acuerdo con los grupos funcionales de los compuestos.

El pico observado en  $3350\text{ cm}^{-1}$  así como  $3307\text{ cm}^{-1}$  indican vibración de tensión para grupos hidroxilo (-OH) encontrados en la glucosa de DAT (Louise Nybacka, 2016; Nandiyanto et al.,

2019). Para  $2920\text{-}2922\text{ cm}^{-1}$  y  $2850\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$  corresponden respectivamente a vibraciones de tensión antisimétrica y simétrica de grupos metileno ( $>\text{CH}_2$ ) observadas en los tres precursores, así como el pico en  $2953\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a vibración de tensión antisimétrica de grupos metilo ( $-\text{CH}^3$ ) (Jayabharathi et al., 2017; Louise Nybacka, 2016; Nandiyanto et al., 2019)

Para DAT, el pico observado en  $1648\text{ cm}^{-1}$  es indicativo de la presencia de enlaces éster  $\alpha, \beta$  insaturado pertenecientes a glicolípidos (Gautier et al., 1992) y el pico en  $1035\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibraciones correspondientes a C-O y C-C de la glucosa en DAT (Louise Nybacka, 2016). Estos resultados reafirman los obtenidos del análisis por cromatografía de masas de la sección 7.2.2 para los componentes sacarídicos, donde se obtuvo como componente al disacárido trealosa, compuesto por dos unidades de glucosa, y ácidos grasos específicos en sus cadenas hidrofóbicas. En conjunto, estos análisis confirman la estructura de la molécula DAT: que está conformada por estas estructuras unidas por enlaces éster.

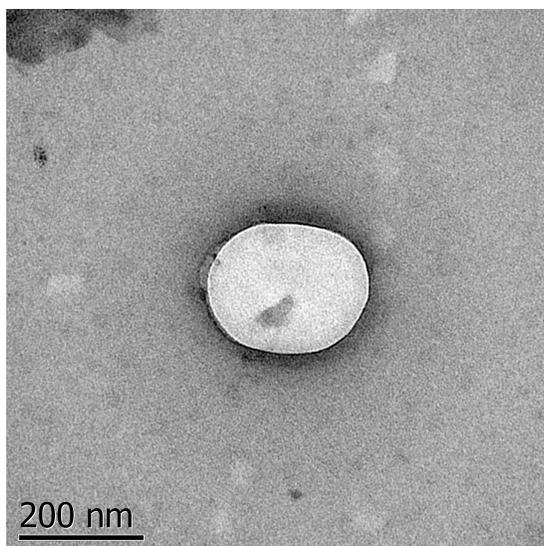
En el caso de la fosfatidilcolina, el pico a  $1735\text{ cm}^{-1}$  señala el enlace C=O de los enlaces éster; el pico en  $1245\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración antisimétrica y las señales a  $1067$  y  $1097\text{ cm}^{-1}$  a las vibraciones simétricas en  $\text{PO}_2$  del grupo fosfato; la banda a  $974\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la contribución de  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  de la colina (Derenne et al., 2013).

En el espectro del dodecanotiol resaltan los picos en  $2576\text{ cm}^{-1}$  de vibraciones de tensión simétrica en S-H y en  $721\text{ cm}^{-1}$  de C-S (Nandiyanto et al., 2019).

Finalmente, el espectro FTIR de los liposomas mostró la presencia de bandas de cadenas grasas, pero también de cada uno de los grupos funcionales específicos de cada componente ( $-\text{OH}$  del antígeno DAT,  $\text{PO}_2$  y  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  de la fosfatidilcolina, C-S del dodecanotiol). Se confirma así que los liposomas obtenidos contienen los tres precursores lipídicos.

## 7.6. Bioactividad de los liposomas con DAT

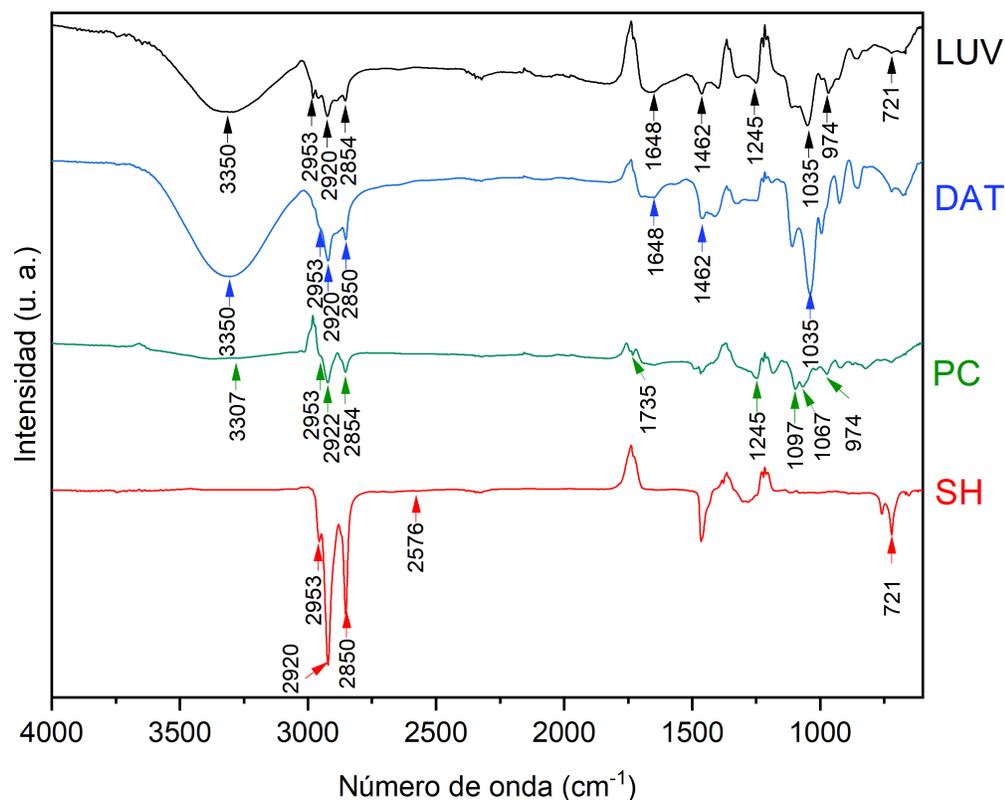
Para determinar si el antígeno DAT desplegado por los liposomas era capaz de atrapar anticuerpos dirigidos contra él, se utilizó el siguiente esquema experimental como prueba de concepto:



**Figura 7.12** LUVs de DAT/PC/SH teñidos con acetato de uranilo observados con TEM.

- I. Los liposomas con DAT fueron inmovilizados sobre una superficie de óxido de estaño e indio (ITO), lo cual fue posibilitado por el contenido de dodecanotiol en las vesículas. Dicha inmovilización resultaba necesaria, dado que la diversidad de biomoléculas presentes en el suero deben ser lavadas antes de revelar la presencia de anticuerpos unidos de manera específica. Sin inmovilización a una superficie, los lavados de liposomas habrían requerido de pasos de ultracentrifugación para los cuales no disponemos de equipamiento.
- II. Los pasos convencionales de un inmunoensayo enzimático fueron realizados utilizando como antígeno los liposomas inmovilizados y anticuerpos presentes en el suero de conejo hiperinmune (título 100). Así mismo, se utilizaron anticuerpos secundarios unidos a la enzima peroxidasa de rábano negro. Como sustrato correspondiente se utilizó ABTS.

En la Figura 7.14 (a) se puede observar una imagen de SEM de una película de ITO y en la Figura 7.14 (b) una imagen SEM de ITO sobre la que se han inmovilizado liposomas. Se puede observar que en la superficie de ITO con liposomas (la cual ha sido lavada con una solución acuosa), se encuentran vesículas de unos 400 nm de diámetro que corresponderían a los liposomas. Para determinar mejor la forma que estas bicapas lipídicas presentan sobre el ITO quedan pendientes análisis por métodos más apropiados, tales como la microscopía de fuerza

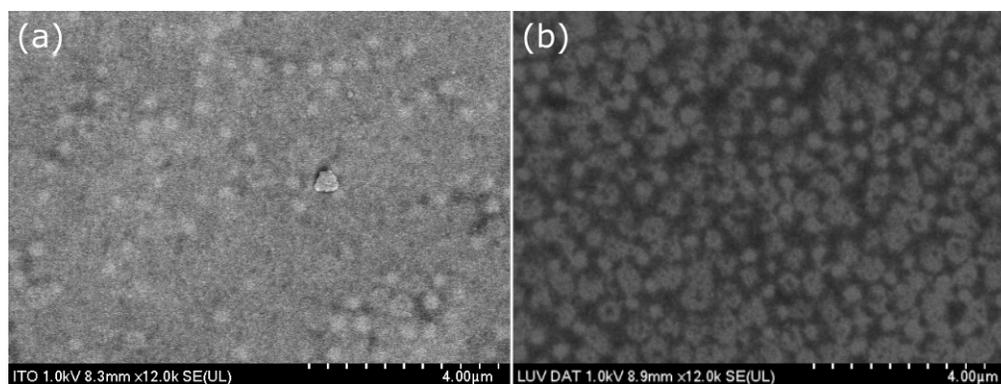


**Figura 7.13** Espectros FTIR de cada uno de los componentes de vesículas: fosfatidilcolina (PC), dodecanotiol (SH) y diacil trealosa (DAT), así como de los propios liposomas (LUV).

atómica (Richter et al., 2003; Spustova, 2021). Sin embargo, la observación de vesículas sobre esta superficie apoya la presencia de las bicapas lipídicas sobre el ITO.

Para el inmunoensayo enzimático, se decidió utilizar las variables del ensayo que se muestran en la Tabla 7.1.

Los resultados, expresados en densidad óptica (derivada del color inducido por la actividad enzimática de la peroxidasa), pueden observarse en la Figura 7.15a. De acuerdo con un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) realizado con el software GraphPad Prism (versión 8), 3 de estos ensayos son equivalentes, y únicamente la respuesta colorimétrica del ensayo con liposomas bioactivos (liposomas con DAT) en presencia de un suero hiperinmune con anticuerpos anti-DAT es significativamente superior a los ensayos control.



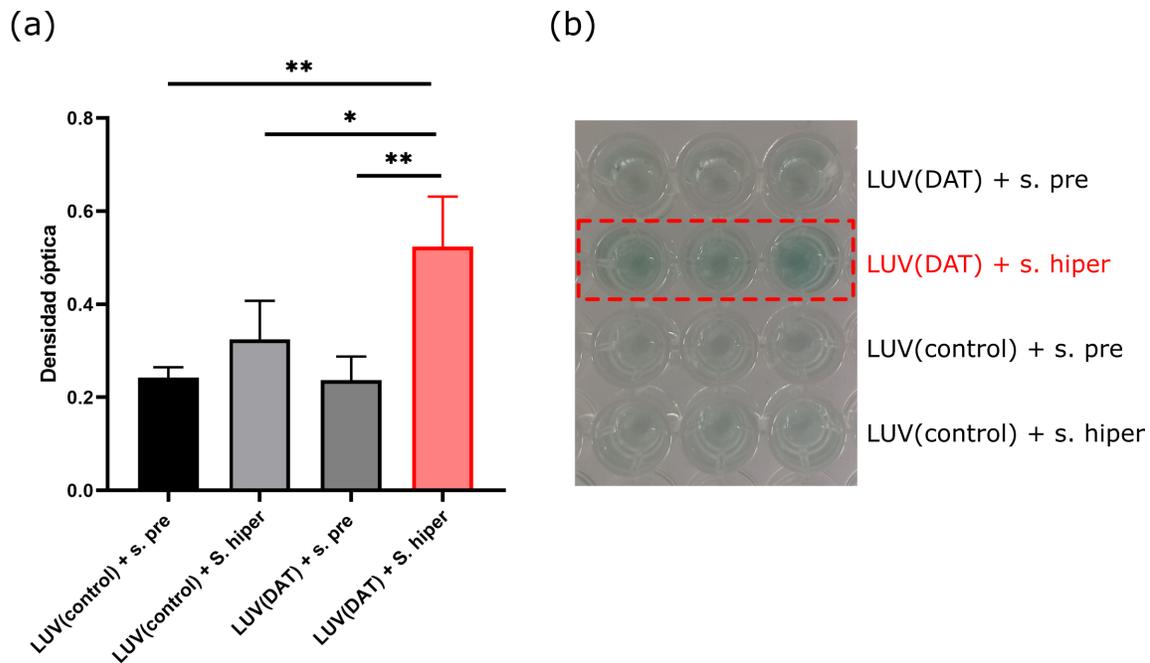
**Figura 7.14** Imágenes SEM de (a) la superficie de ITO y (b) la superficie de ITO después de haber incubado los LUVs.

**Tabla 7.1** Variables utilizadas para llevar a cabo los ensayos y resultados esperados de sus combinaciones.

Material obtenido	Características antigénicas	Anticuerpos	Bioactividad esperada
Material control	Liposomas sin antígeno	Suero control	-
Material control	Liposomas sin antígeno	Suero hiperinmune	-
Material bioactivo	Liposomas con DAT	Suero control	-
Material bioactivo	Liposomas con DAT	Suero hiperinmune	+++

En la Figura 7.15b se muestra una imagen del color desarrollado en los 4 inmunoensayos, encontrándose una diferencia clara en la coloración del ensayo correspondiente a anticuerpos atrapados por liposomas bioactivos.

En resumen, estos resultados muestran que los liposomas que despliegan DAT sí fueron capaces de capturar anticuerpos anti-DAT presentes en el suero hiperinmune de conejo. Queda pendiente el determinar si esta bioactividad se mantiene presente al contacto con anticuerpos anti-DAT humanos, así como desarrollar un sistema híbrido de liposomas-oro coloidal que pudiera generar un método de inmunodiagnóstico basado en mediciones ópticas.



**Figura 7.15** Resultados de inmunoensayo modificado con liposomas inmovilizados sobre ITO, expresadas en (a) densidad óptica en la que cada barra representa el promedio  $\pm$  SD de un experimento que se realizó por triplicado. [Prueba ANOVA de dos factores, seguido de comparaciones múltiples por prueba Tukey  $*P>0.0421$   $**P>0.0067$  y (b) color observado en cada inmunoensayo.

## Capítulo 8

# Conclusiones y perspectivas

### 8.1. Conclusiones

Para este trabajo se ha propuesto la producción de un sistema coloidal capaz de atrapar de forma específica anticuerpos en contra de la biomolécula diacil trealosa (DAT) obtenida de *M. fortuitum*.

Se ha realizado la purificación del antígeno DAT a partir de un extracto de la especie *M. fortuitum*, y se ha verificado su identidad mediante técnicas cromatográficas, reactividad química y análisis de sus componentes sacarídicos y ácidos grasos.

Se ha logrado el despliegue del antígeno DAT en bicapas lipídicas (liposomas), sistema que permite al antígeno su presentación en un formato coloidal en medio acuoso.

Se ha confirmado, mediante una prueba de concepto, que el material producido permite la captura de anticuerpos anti-DAT, demostrando así que los liposomas despliegan eficazmente al antígeno y que son bioactivos.

### 8.2. Perspectivas

El sistema ha mostrado un desempeño favorable como sistema de detección de anticuerpos. Sin embargo, aún queda por mejorar y optimizar el sistema, así como definir la especificidad y sensibilidad de este. Actualmente se está llevando a cabo investigación para su optimización y

su aplicación en sistemas *label-free*.

El éxito en la aplicación del sistema muestra un nuevo sistema a ser utilizado con biomoléculas anfipáticas con características antigénicas para ser usadas de igual forma con un enfoque diagnóstico para la captura de anticuerpos específicos.

El uso de nanoestructuras metálicas y el aprovechamiento de sus propiedades fisicoquímicas es una opción prometedora que permitirá mejorar la capacidad del sistema, tal es el caso de nanopartículas de oro y cuyo uso ya se ha comenzado a investigar. Con estas nanoestructuras se espera desarrollar una metodología de detección combinada con el uso de liposomas, aprovechando la bioactividad de los liposomas mostrada en este trabajo y su afinidad a la superficie de oro. La creación de híbridos de nanopartículas de oro y liposomas bioactivos se muestra como una posible aplicación en sistemas de diagnóstico por medio de captura de antígenos, que pueden entregar una señal mejorada al aprovechar el efecto Raman o de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR), por lo que queda pendiente el desarrollo de tales híbridos y su estudio.

De manera interesante, un reciente estudio describe que el antígeno DAT tiene también aplicaciones potenciales como componente de vacunas (Reijneveld et al., 2021), por lo que el sistema coloidal aquí reportado podría ser también explotado para tales fines.

# Bibliografía

Abidi, N. (2021). *FTIR Microspectroscopy*.

Afzal, M., Khurshid, S., Khalid, R., Paracha, R. Z., Khan, I. H., and Akhtar, M. W. (2015). Fusion of selected regions of mycobacterial antigens for enhancing sensitivity in serodiagnosis of tuberculosis. *Journal of Microbiological Methods*, 115:104–111.

Akash, M. S. H. and Rehman, K. (2020a). *Gas Chromatography*, pages 185–193. Springer Singapore, Singapore.

Akash, M. S. H. and Rehman, K. (2020b). *Mass Spectrometry*, pages 121–136. Springer Singapore, Singapore.

Akhter, M., Arif, S., Khaliq, A., un Nisa, Z., Khan, I. H., and Akhtar, M. W. (2020). Designing fusion molecules from antigens of Mycobacterium tuberculosis for detection of multiple antibodies in plasma of TB patients. *Tuberculosis*, 124(August):101981.

Alvarez-Ordóñez, A. and Prieto, M. (2012). *Fourier transform infrared spectroscopy in food microbiology*.

Ariza, M. A. and Valero-Guillén, P. L. (1994). Delineation of molecular species of a family of diacyltrehaloses from Mycobacterium fortuitum by mass spectrometry. *FEMS Microbiology Letters*, 119(3):279–282.

Armstrong, D. T., Tacheny, E. A., Olinger, G., Howard, R., Lemmon, M. M., Dasgupta, D., Ei-

- semann, E., and Parrish, N. (2021). Sars-cov-2 supply shortages and tuberculosis diagnostics: Current issues requiring immediate solutions. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(12).
- Asensio, J. G., Maia, C., Ferrer, N. L., Barilone, N., Laval, F., Soto, C. Y., Winter, N., Daffe, M., Gicquel, B., Martín, C., and Jackson, M. (2006). The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(3):1313–1316.
- Bangham, A. D. and Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, 8(5):660–668.
- Batt, S. M., Minnikin, D. E., and Besra, G. S. (2020). The thick waxy coat of mycobacteria, a protective layer against antibiotics and the host’s immune system. *Biochemical Journal*, 447(10):1983–2006.
- Besra, G. S., McNeil, M. R., Brennan, P. J., Bolton, R. C., Simpson, K. E., Minnikin, D. E., Ridell, M., Glushka, J., and van Halbeek, H. (1992). Structural Elucidation of a Novel Family of Acyltrehaloses from *Mycobacterium Tuberculosis*. *Biochemistry*, 31(40):9832–9837.
- Cameron, J. M., Bruno, C., Parachalil, D. R., Baker, M. J., Bonnier, F., Butler, H. J., and Byrne, H. J. (2020). Chapter 10 - Vibrational spectroscopic analysis and quantification of proteins in human blood plasma and serum. In Ozaki, Y., Baranska, M., Lednev, I. K., and Wood, B. R., editors, *Vibrational Spectroscopy in Protein Research*, pages 269–314. Academic Press.
- Caminero Luna, J. A. (2007). La vieja batalla entre la especie humana y el bacilo de Koch. ¿Es posible soñar con erradicar la tuberculosis? *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(SUPPL. 2):163–180.
- Cerruti, M., Rhodes, C., Losego, M., Efremenko, A., Maria, J. P., Fischer, D., Franzen, S., and Genzer, J. (2007). Influence of indium-tin oxide surface structure on the ordering and

- coverage of carboxylic acid and thiol monolayers. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40(14):4212–4221.
- Derenne, A., Claessens, T., Conus, C., and Goormaghtigh, E. (2013). *Infrared Spectroscopy of Membrane Lipids*, pages 1074–1081. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Ernst, J. D. (2012). The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(8):581–591.
- Escamilla, L., Mancilla, R., Glender, W., and Lopez-Marin, L.-M. (1996). Mycobacterium fortuitum glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154(6):1864–1867.
- Farajnia, S., Ansarin, K., and Sahebi, L. (2019). Effectiveness of bacillus Calmette–Guerin vaccination history on pulmonary tuberculosis symptoms. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 17:100126.
- Folch, J., Less, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 226(1):497 – 509.
- Frey, A., Canzio, J., and Zurakowski, D. (1999). A statistically defined endpoint titer determination method for Immunoassays. *Journal of immunological methods*, 221:35–41.
- Füzfai, Z., Boldizsár, I., and Molnár-Perl, I. (2008). Characteristic fragmentation patterns of the trimethylsilyl and trimethylsilyl–oxime derivatives of various saccharides as obtained by gas chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1177(1):183–189.
- Gautier, N., Marín, L. M. L., Lanéelle, M. A., and Daffé, M. (1992). Structure of mycoside F, a family of trehalose-containing glycolipids of Mycobacterium fortuitum. *FEMS Microbiology Letters*, 98(1-3):81–87.

- Golichenari, B., Nosrati, R., Farokhi-Fard, A., Faal Maleki, M., Gheibi Hayat, S. M., Ghazvini, K., Vaziri, F., and Behravan, J. (2019). Electrochemical-based biosensors for detection of Mycobacterium tuberculosis and tuberculosis biomarkers. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(8):1056–1077.
- Goulart, L. A., Teixeira, A. R. L., Ramalho, D. A., Terezo, A. J., and Castilho, M. (2014). Development of an analytical method for the determination of tert-butylhydroquinone in soybean biodiesel. *Fuel*, 115(September):126–131.
- Gross, J. H. (2017). *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer International Publishing.
- Guimarães, D., Cavaco-Paulo, A., and Nogueira, E. (2021). Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 601(March).
- Gupta, S. and Kakkar, V. (2018). Recent technological advancements in tuberculosis diagnostics – A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 115(May):14–29.
- Hamano, N. and Negishi, Y. (2022). Liposome-based Biosensors and Diagnosis Imaging Agents. 34(3):961–970.
- Hamid, M. E., Fraser, J. L., Wallace, P. A., Besra, G. S., Goodfellow, M., Minnikin, D. E., and Ridell, M. (1993). Antigenic glycolipids of Mycobacterium fortuitum based on trehalose acylated with 2-methyloctadec-2-enoic acid. *Letters in Applied Microbiology*, 16(3):132–135.
- He, J. (2013). Chapter 5.1 - Practical Guide to ELISA Development. In Wild, D., editor, *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, pages 381–393. Elsevier, Oxford, fourth edition.
- Inkpen, M. S., Liu, Z., Li, H., Campos, L. M., Neaton, J. B., and Venkataraman, L. (2019). Non-chemisorbed gold–sulfur binding prevails in self-assembled monolayers. *Nature Chemistry*, 11(4):351–358.
- Jackson, M. (2014). The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(10).

- Jayabharathi, J., Sundari, G. A., Thanikachalam, V., Jeeva, P., and Panimozhi, S. (2017). A dodecanethiol-functionalized Ag nanoparticle-modified ITO anode for efficient performance of organic light-emitting devices. *RSC Advances*, 7(62):38923–38934.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., and Burns, D. T. (1990). Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods. Physical and chemical detection methods: fundamentals, reagents I. Volume 1a: VCH, Weinheim, 1990 (ISBN 3-527-27834-6). xv+ 464 pp. Price DM 148.00.
- Julián, E., Matas, L., Alcaide, J., and Luquin, M. (2004). Comparison of Antibody Responses to a Potential Combination of Specific Glycolipids and Proteins for Test Sensitivity Improvement in Tuberculosis Serodiagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(1):70–76.
- Karakousis, P. C., Bishal, W. R., and Dorman, S. E. (2004). Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response. *Cellular Microbiology*, 6(2):105–116.
- Khan, F. A., Pande, T., Tessema, B., Song, R., Benedetti, A., Pai, M., Lönnroth, K., and Denking, C. M. (2017). Computer-aided reading of tuberculosis chest radiography: Moving the research agenda forward to inform policy. *European Respiratory Journal*, 50(1).
- Kim, S., Shin, K.-R., and Zhang, B.-T. (2004). Molecular immunocomputing with application to alphabetical pattern recognition mimics the characterization of ABO blood type. In *2003 Congress on Evolutionary Computation, CEC 2003 - Proceedings*, volume 4, pages 2549 – 2556 Vol.4.
- Kumaraswamy, P., Sethuraman, S., Yakhmi, J. V., and Krishnan, U. M. (2014). *Handbook of Nanomaterials Properties*.
- Kunnath-Velayudhan, S., Salamon, H., Wang, H. Y., Davidow, A. L., Molina, D. M., Huynh, V. T., Cirillo, D. M., Michel, G., Talbot, E. A., Perkins, M. D., Felgner, P. L., Liang, X., and Gennaro, M. L. (2010). Dynamic antibody responses to the Mycobacterium tuberculosis proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33):14703–14708.

- Lamb, G. S. and Starke, J. R. (2017). Tuberculosis in Infants and Children. *Microbiology Spectrum*, 5(2):553–557.
- Law, B. J. and Marks, M. I. (1985). Age-related prevalence of human serum IgG and IgM antibody to the core glycolipid of Escherichia coli strain J5, as measured by ELISA. *The Journal of infectious diseases*, 151(6):988–994.
- Liddell, E. (2013). *Antibodies*. Elsevier, fourth edi edition.
- Liu, J., Jiang, Y., Chen, X., Chen, L., Zhang, X., Cui, D., Li, Y., Liu, Z., Zhao, Q., and Diao, A. (2022a). Development of active affibody aggregates induced by a self-assembling peptide for high sensitive detection of alpha-fetoprotein. *Chemical Engineering Journal*, 436(29):135208.
- Liu, P., Chen, G., and Zhang, J. (2022b). A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules*, 27(4).
- Louise Nybacka (2016). FTIR spectroscopy of glucose. *Uppsala University*, page p.19.
- Maekura, R., Kitada, S., Osada-Oka, M., Tateishi, Y., Ozeki, Y., Fujicawa, T., Miki, M., Jyun-ko, O., Mori, M., and Matsumoto, S. (2019). Serum antibody profiles in individuals with latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbiology and Immunology*, 63(3-4):130–138.
- Magdalena, D., Michal, S., Marta, S., Magdalena, K.-P., Anna, P., Magdalena, G., and Rafał, S. (2022). Targeted metabolomics analysis of serum and Mycobacterium tuberculosis antigen-stimulated blood cultures of pediatric patients with active and latent tuberculosis. *Scientific Reports*, 12(1):1–13.
- Manzano, P., Arnáiz, E., Diego, J. C., Toribio, L., García-Viguera, C., Bernal, J. L., and Bernal, J. (2011). Comprehensive two-dimensional gas chromatography with capillary flow modulation to separate FAME isomers. *Journal of Chromatography A*, 1218(30):4952–4959.
- Mazur, F., Bally, M., Städler, B., and Chandrawati, R. (2017). Liposomes and lipid bilayers in biosensors. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249(January):88–99.

- Minion, J., Leung, E., Talbot, E., Dheda, K., Pai, M., and Menzies, D. (2011). Diagnosing tuberculosis with urine lipoarabinomannan: Systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*, 38(6):1398–1405.
- Mohanty, J., Choudhury, S. D., Barooah, N., Pal, H., and Bhasikuttan, A. (2017). *Mechanistic Aspects of Host–Guest Binding in Cucurbiturils: Physicochemical Properties*, volume 1. Elsevier, second edition.
- Mohiuddin, M. (2020). Tuberculosis–burden and serodiagnosis. *IMC Journal of Medical Science*, 14(1):59–69.
- Muñoz, M., Lanéelle, M. A., Luquin, M., Torrelles, J., Julián, E., Ausina, V., and Daffé, M. (1997). Occurrence of an antigenic triacyl trehalose in clinical isolates and reference strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 157(2):251–259.
- Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., and Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret ftir spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4(1):97–118.
- Nash, M., Kadavigere, R., Andrade, J., Sukumar, C. A., Chawla, K., Shenoy, V. P., Pande, T., Huddart, S., Pai, M., and Saravu, K. (2020). Deep learning, computer-aided radiography reading for tuberculosis: a diagnostic accuracy study from a tertiary hospital in India. *Scientific Reports*, 10(1):1–10.
- Nie, D., Guo, D., Huang, Q., Guo, W., Wang, J., Zhao, Z., and Han, Z. (2021). A novel insight into fluorescent sensor for patulin detection using thiol-terminated liposomes with encapsulated coumarin-6 as signal probe. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 345(June):130366.
- Nielsen, S. S. (2017). *Food Analysis*. Food Science Text Series. Springer International Publishing.
- Nikolova, M., Slavchov, R., and Nikolova, G. (2018). *Nanotechnology in Medicine*, pages 1–14. Springer International Publishing, Cham.
- Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., and Alshaer, W. (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, 8(5):e09394.

- Okano, Y. (2018). *Scanning Electron Microscopy*, pages 563–569. Springer Singapore, Singapore.
- Onozaki, I., Law, I., Sismanidis, C., Zignol, M., Glaziou, P., and Floyd, K. (2015). National tuberculosis prevalence surveys in Asia, 1990-2012: An overview of results and lessons learned. *Tropical Medicine and International Health*, 20(9):1128–1145.
- Pande, T., Cohen, C., Pai, M., and Ahmad Khan, F. (2016). Computer-aided detection of pulmonary tuberculosis on digital chest radiographs: A systematic review. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 20(9):1226–1230.
- Paquot, C., Hautfenne, A., and Others (1987). *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*, volume 73. Blackwell scientific publications Oxford.
- Peaper, D. R. and Landry, M. L. (2014). Laboratory diagnosis of viral infection. *Handbook of clinical neurology*, 123:123–147.
- Peter, J. G., Zijenah, L. S., Chanda, D., Clowes, P., Lesosky, M., Gina, P., Mehta, N., Calligaro, G., Lombard, C. J., Kadzirange, G., Bandason, T., Chansa, A., Liusha, N., Mangu, C., Mtafya, B., Msila, H., Rachow, A., Hoelscher, M., Mwaba, P., Theron, G., and Dheda, K. (2016). Effect on mortality of point-of-care, urine-based lipoarabinomannan testing to guide tuberculosis treatment initiation in HIV-positive hospital inpatients: A pragmatic, parallel-group, multicountry, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet*, 387(10024):1187–1197.
- Pinto, L. M., Pai, M., Dheda, K., Schwartzman, K., Menzies, D., and Steingart, K. R. (2013). Scoring systems using chest radiographic features for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in adults: A systematic review. *European Respiratory Journal*, 42(2):480–494.
- Qin, Z. Z., Naheyan, T., Ruhwald, M., Denking, C. M., Gelaw, S., Nash, M., Creswell, J., and Kik, S. V. (2021). A new resource on artificial intelligence powered computer automated detection software products for tuberculosis programmes and implementers. *Tuberculosis*, 127:102049.

- Qin, Z. Z., Sander, M. S., Rai, B., Titahong, C. N., Sudrungrot, S., Laah, S. N., Adhikari, L. M., Carter, E. J., Puri, L., Codlin, A. J., and Creswell, J. (2019). Using artificial intelligence to read chest radiographs for tuberculosis detection: A multi-site evaluation of the diagnostic accuracy of three deep learning systems. *Scientific Reports*, 9(1):1–10.
- Ramadass, P., Parthiban, M., Thiagarajan, V., Chandrasekar, M., Vidhya, M. N., and Raj, G. D. (2008). Development of single serum dilution ELISA for detection of infectious bursal disease virus antibodies. *Veterinarski Arhiv*, 78(1):23–30.
- Reddy, K. P., Gupta-Wright, A., Fielding, K. L., Costantini, S., Zheng, A., Corbett, E. L., Yu, L., van Oosterhout, J. J., Resch, S. C., Wilson, D. P., Horsburgh, C. R., Wood, R., Alufandika-Moyo, M., Peters, J. A., Freedberg, K. A., Lawn, S. D., and Walensky, R. P. (2019). Cost-effectiveness of urine-based tuberculosis screening in hospitalised patients with HIV in Africa: a microsimulation modelling study. *The Lancet Global Health*, 7(2):e200–e208.
- Reijneveld, J. F., Holzheimer, M., Young, D. C., Lopez, K., Suliman, S., Jimenez, J., Calderon, R., Lecca, L., Murray, M. B., Ishikawa, E., Yamasaki, S., Minnaard, A. J., Moody, D. B., and Van Rhijn, I. (2021). Synthetic mycobacterial diacyl trehaloses reveal differential recognition by human T cell receptors and the C-type lectin Mincle. *Scientific Reports*, 11(1):1–10.
- Richter, R., Mukhopadhyay, A., and Brisson, A. (2003). Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study. *Biophysical Journal*, 85(5):3035–3047.
- Richter, R. P., Bérat, R., and Brisson, A. R. (2006). Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir*, 22(8):3497–3505.
- Rimal, R., Shrestha, D., Pyakurel, S., Poudel, R., Shrestha, P., Rai, K. R., Ghimire, G. R., Rai, G., and Rai, S. K. (2022). Diagnostic performance of GeneXpert MTB/RIF in detecting MTB in smear-negative presumptive TB patients. *BMC Infectious Diseases*, 22(1):1–7.
- Saad, M. H. F., Kritski, A. L., Werneck-Barroso, E., Cavalcante, S., Ferreira, M. A. S., and De Souza Fonseca, L. (1996). Use of the 2,3-Diacyl-trehalose and the Purified Protein Derivative

- in the Serodiagnosis of Tuberculosis in AIDS. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(1):97–100.
- Saavedra, R., Segura, E., Leyva, R., Esparza, L. A., and López-Marín, L. M. (2001). Mycobacterial Di-O-acyl-trehalose inhibits mitogen- and antigen-induced proliferation of murine T cells in vitro. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(6):1081–1088.
- Schlossberg, D. L. (2017). *Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections*. John Wiley & Sons.
- Shah, M., Hanrahan, C., Wang, Z. Y., Dendukuri, N., Lawn, S. D., Denkinger, C. M., and Steingart, K. R. (2016). Lateral flow urine lipoarabinomannan assay for detecting active tuberculosis in HIV-positive adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(5).
- Smith, I. (2003). Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3):463–496.
- Spangenberg, B., Poole, C. F., and Weins, C. (2011). *Theoretical Basis of Thin Layer Chromatography (TLC)*, pages 13–52. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Spustova, K. (2021). *Membranous Protocell Superstructures*. PhD thesis, University of Oslo.
- Srivastava, S., Abraham, P. R., and Mukhopadhyay, S. (2021). Aptamers: An Emerging Tool for Diagnosis and Therapeutics in Tuberculosis.
- Steingart, K. R., Dendukuri, N., Henry, M., Schiller, I., Nahid, P., Hopewell, P. C., Ramsay, A., Pai, M., and Laal, S. (2009). Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: A meta-analysis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(2):260–276.
- Sullivan, B. M., Simon, K. D., Nanda, S. K., Pocius, J., and Scholz, W. K. (2001). Assay Development in High Density MicroWell® Plates: Use of Well Geometries, Format, Surface Modification and Optical Properties to Achieve Optimal Assay Performance. *JALA - Journal of the Association for Laboratory Automation*, 6(2):47–52.

- Sulman, S., Shahid, S., Khaliq, A., Ambreen, A., Khan, I. H., Cooper, A. M., and Akhtar, M. W. (2021). Enhanced serodiagnostic potential of a fusion molecule consisting of Rv1793, Rv2628 and a truncated Rv2608 of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*, 16(11 November):1–16.
- Sun, W., Yuan, S., Huang, H., Liu, N., and Tan, Y. (2017). A label-free biosensor based on localized surface plasmon resonance for diagnosis of tuberculosis. *Journal of Microbiological Methods*, 142(August):41–45.
- Sut, T. N., Yoon, B. K., Jeon, W. Y., Jackman, J. A., and Cho, N. J. (2021). Supported lipid bilayer coatings: Fabrication, bioconjugation, and diagnostic applications. *Applied Materials Today*, 25:101183.
- Sutherland, J. S., Lalor, M. K., Black, G. F., Ambrose, L. R., Loxton, A. G., Chegou, N. N., Kassa, D., Mihret, A., Howe, R., Mayanja-Kizza, H., Gomez, M. P., Donkor, S., Franken, K., Hanekom, W., Klein, M. R., Parida, S. K., Boom, W. H., Thiel, B. A., Crampin, A. C., Ota, M., Walzl, G., Ottenhoff, T. H. M., Dockrell, H. M., Kaufmann, S. H. E., and the GCGH Biomarkers for TB consortium (2013). Analysis of Host Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Antigens in a Multi-Site Study of Subjects with Different TB and HIV Infection States in Sub-Saharan Africa. *PLOS ONE*, 8(9):null.
- Tao, J., Wang, R., and Zhang, H. (2018). *Electron/Ion Optics*, pages 1–33. Springer Singapore, Singapore.
- Thanh, N. T. and Green, L. A. (2010). Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*, 5(3):213–230.
- Togun, T. O., MacLean, E., Kampmann, B., and Pai, M. (2018). Biomarkers for diagnosis of childhood tuberculosis: A systematic review. *PLoS ONE*, 13(9):1–19.
- Tsai, T. T., Huang, C. Y., Chen, C. A., Shen, S. W., Wang, M. C., Cheng, C. M., and Chen, C. F. (2017). Diagnosis of Tuberculosis Using Colorimetric Gold Nanoparticles on a Paper-Based Analytical Device. *ACS Sensors*, 2(9):1345–1354.

- World Health Organization (WHO) (2020). *Operational handbook on tuberculosis*.
- World Health Organization (WHO) (2022). *Global tuberculosis report 2022*.
- Yan, C., Zharnikov, M., Götzhäuser, A., and Grunze, M. (2000). Preparation and characterization of self-assembled monolayers on indium tin oxide. *Langmuir*, 16(15):6208–6215.
- Yaqoob, C., Shahid, S., Khaliq, A., un Nisa, Z., Khan, I. H., and Akhtar, M. W. (2022). Designing Fusion Molecules from Antigens of Mycobacterium tuberculosis to Enhance Serodiagnostic Sensitivity in Latent TB Infection and Active TB State. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28(1):1–12.
- Yip, L. Y. and Chan, E. C. Y. (2013). Chapter 8 - Gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomics. In Issaq, H. J. and Veenstra, T. D., editors, *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery (Second Edition)*, pages 133–147. Academic Press, Boston, second edition.
- Zaman, K. (2010). Tuberculosis: A global health problem. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 28(2):111–113.
- Zhang, Y., Yu, Y., and Gao, J. (2022). Supramolecular Nanomedicines of In-Situ Self-Assembling Peptides. *Frontiers in Chemistry*, 10(February):1–18.
- Zheng, K., Gu, Q., Zhou, D., Zhou, M., and Zhang, L. (2022). Recent progress in surgical adhesives for biomedical applications. *Smart Materials in Medicine*, 3(December 2021):41–65.
- Zou, F., Wang, X., Qi, F., Koh, K., Lee, J., Zhou, H., and Chen, H. (2017). Magneto-plamonic nanoparticles enhanced surface plasmon resonance TB sensor based on recombinant gold binding antibody. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 250:356–363.
- Zylberman, V., Sanguineti, S., Pontoriero, A. V., Higa, S. V., Cerutti, M. L., Morrone Seijo, S. M., Pardo, R., Muñoz, L., Acuña Intrieri, M. E., Alzogaray, V. A., Avaro, M. M., Benedetti, E., Berguer, P. M., Bocanera, L., Bukata, L., Bustelo, M. S., Campos, A. M., Colonna, M.,

Correa, E., Cragnaz, L., Dattero, M. E., Dellafiore, M., Foscaldi, S., González, J. V., Guerra, L. L., Klinke, S., Labanda, M. S., Lauché, C., López, J. C., Martínez, A. M., Otero, L. H., Peyric, E. H., Ponziani, P. F., Ramondino, R., Rinaldi, J., Rodríguez, S., Russo, J. E., Russo, M. L., Saavedra, S. L., Seigelchifer, M., Sosa, S., Vilariño, C., López Biscayart, P., Corley, E., Spatz, L., Baumeister, E. G., and Goldbaum, F. A. (2020). Development of a hyperimmune equine serum therapy for COVID-19 in Argentina. *Medicina*, 80 Suppl 3:1–6.