

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA “*Alberto Cazorla Talleri*”



Diseño y ensamblaje de un biosensor electroquímico para el diagnóstico de tuberculosis (TB) por medio de la detección de ADN transrenal de *Mycobacterium tuberculosis* amplificado por PCR

Tesis para optar por el Título de Licenciado en Biología

Raúl Eduardo Laureano Revilla

Lima - Perú

2019

## Resumen

La tuberculosis (TB) es uno de los problemas de salud más importantes de toda la historia de la humanidad. A pesar de su antigüedad, sigue siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Esto se debe en mayor parte a la falta de un método de diagnóstico que sea barato, exacto y preciso; sin mencionar que muchos métodos son invasivos ya que requieren sangre o flaquean debido a la incapacidad de producir esputo de muchos grupos de pacientes. Como respuesta se propone emplear biosensores electroquímicos en muestras de fácil obtención, como es la orina. El ensamblaje de biosensores no requiere una inversión importante, sin mencionar que presentan una mayor sensibilidad que otros métodos. En este trabajo se presenta un nuevo método de diagnóstico empleando biosensores electroquímicos para la detección de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) extraído a partir de la orina de pacientes afectados por tuberculosis (TB) por medio de las pruebas de voltametría cíclica e impedancia. Se trabajó con una secuencia de capas previamente estandarizadas de hidroxilos, 3-Aminopropil trietoxisilano (APTES) y 1,4-fenilendiisotiocianato (PDITC) inmovilizadas sobre un vidrio FTO sobre las cuales se incorporaron nuevas capas de sonda de captura y etanolamina. Se determinó que las concentraciones óptimas de la sonda de captura y de etanolamina fueron de 1 $\mu$ M y 50mM respectivamente. Al realizar la curva de calibrado se obtuvo que el límite de detección para la prueba de voltametría cíclica fue de 8.28ng de ADN y para la prueba de impedancia fue de 0.828ng de ADN. En el experimento con orina dopada con ADN de MTB se obtuvo que la cantidad mínima detectada fue 1fg de ADN empleando ambas pruebas. La optimización y miniaturización de este nuevo método podría contribuir a la lucha contra esta enfermedad.

Palabras claves: Biosensores, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, diagnóstico, ADN transrenal.

## Índice de abreviaturas

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**APA:** Nombre del biosensor por sus principales componentes (APTES, PDITC y ADN)

**APTES:** (3-Aminopropil) trietoxisilano

**Cq:** Ciclo de cuantificación (del inglés: Cycle quantification)

**DMF:** N, N-Dimetilformamida

**EA:** Etanolamina

**EIE:** Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

**FTO:** Oxido de estaño dopado con Fluor (del inglés: Fluor dopped Thin Oxide)

**LAM:** Lipoarabinomamano

**LDD:** Límite de Detección

**MTB:** *Mycobacterium tuberculosis*

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: Polymerase Chain Reaction)

**PDITC:** 1,4-fenilendiisotiocianato

**qPCR:** PCR en tiempo real

**RTC:** Resistencia a la transferencia de cargas

**TB:** Tuberculosis

**Tr-ADN:** ADN Transrenal

**VC:** Voltametría Cíclica

**VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana

## Índice

1.	Introducción.....	1
2.	Justificación.....	5
3.	Objetivos.....	7
<b>3.1.</b>	Objetivo general:.....	7
<b>3.2.</b>	Objetivos específicos:.....	7
4.	Materiales y Métodos.....	8
<b>4.1.</b>	Esquema del trabajo.....	8
<b>4.2.</b>	Alcance del estudio.....	9
<b>4.3.</b>	Reclutamiento de participantes y toma de muestras.....	9
<b>4.4.</b>	Preparación de orina dopada con ADN y extracción de ADN a partir de orina.....	9
<b>4.5.</b>	Amplificación de ADN por PCR.....	10
<b>4.6.</b>	Ensamblaje del biosensor.....	10
<b>4.7.</b>	Mediciones electroquímicas: Voltametría cíclica y Espectroscopia de impedancia... ..	14
<b>4.8.</b>	Determinación de la concentración óptima de la sonda de captura.....	16
<b>4.9.</b>	Determinación de la concentración óptima de etanolamina.....	16
<b>4.10.</b>	Determinación del límite de detección del biosensor APA usando la secuencia “Propia”.....	17
<b>4.11.</b>	Determinación del límite de detección de ADN en muestras de orina usando el biosensor APA y qPCR.....	18
<b>4.12.</b>	PCR en tiempo real.....	18
<b>4.13.</b>	Análisis de datos.....	18
5.	Resultados.....	20
<b>5.1.</b>	Evaluación de la concentración óptima de la sonda de captura.....	20
<b>5.2.</b>	Evaluación de la concentración óptima de Etanolamina.....	22
<b>5.3.</b>	Límite de detección del biosensor APA.....	24
	Curva de calibrado – Voltametría cíclica.....	24
	Curva de calibrado – Espectroscopia de Impedancia Electroquímica.....	28
<b>5.4.</b>	Evaluación de orinas dopadas con cantidades conocidas de ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mediante el biosensor APA.....	33
6.	Discusión.....	36
7.	Conclusiones.....	39
8.	Recomendaciones.....	39
9.	Referencias Bibliográficas.....	40
10.	Anexos.....	46

## 1. Introducción

La tuberculosis (TB) es uno de los problemas de salud más importantes de toda la historia de la humanidad. A pesar de su antigüedad, sigue siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Pese a los esfuerzos que se pone al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y nuevas defensas farmacológicas, anualmente cobra la vida de 10 millones de personas (1). *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) es el responsable de causar esta enfermedad. Esta es una bacteria bacilo patógeno aerobio obligatorio (2). Su pared celular tiene la particularidad de contar con una alta concentración de ácido micólico, lo cual no solo juega un papel importante como factor de virulencia, sino que también impide colorear a la bacteria por tinción Gram (2).

Los humanos son los únicos hospederos conocidos de esta bacteria, habiéndose formado una relación co-evolutiva entre la bacteria con su hospedero (3). La bacteria ingresa al cuerpo por la vía respiratoria e inicia su proceso infeccioso. Sin embargo, no todas las personas infectadas con la bacteria desarrollan la enfermedad. El sistema inmune de un individuo saludable es capaz de eliminar la infección o mantenerla en un estado latente. Cuando esto no ocurre, la infección da paso a la enfermedad de TB (2). Cuando se presenta la enfermedad se la puede tratar con una amplia gama de antibióticos, tales como: isoniazida, etambutol, pirazinamida, rifampicina; no obstante, para poder someter al paciente a un tratamiento adecuado es necesario poder diagnosticar la enfermedad oportuna y eficazmente.

El diagnóstico de TB se puede abordar con diferentes aproximaciones. Por un lado, se tiene a los métodos clásicos como lo son la tinción Ziehl-Neelsen y el cultivo de muestras obtenidas de pacientes. Son relativamente fáciles de llevar a cabo, pero cuentan con importantes desventajas. La tinción es altamente específica, pero tiene una sensibilidad baja de 70% (4), mientras que el crecimiento de los cultivos suele tomar mucho tiempo (de 10 días a 1 mes) (5, 6,7). Como respuesta a las falencias de las técnicas anteriores se desarrollaron procedimientos moleculares de diagnóstico. Entre ellos se tiene al popular GeneXpert, el cual se basa en la técnica de qPCR (PCR en tiempo real) para la amplificación del gen *rpoB8*. De esta manera no solo diagnostica la

enfermedad, sino que puede determinar si es que la cepa que está generando la enfermedad es resistente a rifampicina (8, 9).

La muestra de esputo tiene un rol muy importante en el diagnóstico de la TB; sin embargo, la recolección segura en un centro de salud requiere de infraestructura segura además de que implica someter al paciente a un estrés físico. A esto se suma la imposibilidad de su obtención en niños y personas con el sistema inmune suprimido.

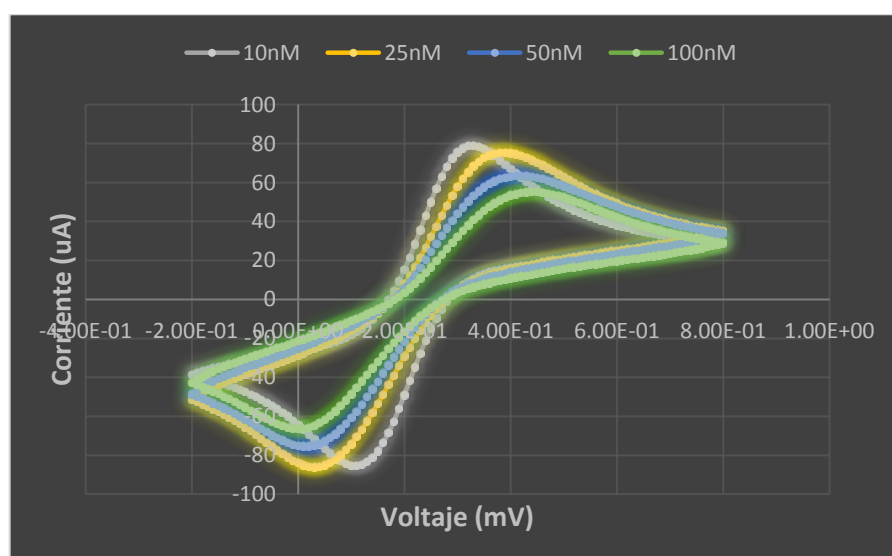
Estas técnicas fueron originalmente diseñadas para poder funcionar usando muestras de esputo del paciente (8, 9), pero debido a las dificultades asociadas a este tipo de muestra que fueron descritas anteriormente surgieron variantes que funcionan con otros fluidos corporales tales como la orina (10). Dado que la orina se puede obtener fácilmente y en grandes cantidades, el desarrollo de métodos de diagnóstico que empleen este fluido corporal es de gran importancia.

Dentro del campo de las pruebas inmunológicas se puede emplear la orina para la detección de LAM (lipoarabinomano). El LAM es un glicolípido que forma parte de la pared celular de MTB (11, 12). Durante la enfermedad, esta molécula puede ser liberada a la sangre por macrófagos alveolares infectados por la bacteria (13). Esta prueba de diagnóstico tiene una sensibilidad de 69% en pacientes co-infectados con VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) (14). El uso de orina con hidrogeles y otras nano partículas han posibilitado el diagnóstico confiable en pacientes VIH negativos con una sensibilidad mayor al 95% pero con una especificidad del 80% (15). Sin embargo, al ser esta molécula de naturaleza antigénica, se espera que forme un complejo inmune mientras transita por la sangre (16). Esto no solo dificulta su pase por el glomérulo renal, sino que dificulta su detección en orina.

Además, el costo que implica realizar estas técnicas de diagnóstico avanzadas es elevado por lo que no pueden ser adquiridos en las postas de salud de países emergentes. Sin mencionar que se requiere de una infraestructura adecuada (cuartos pre-PCR, cuartos de electroforesis, etc.) para llevar a cabo estos métodos de diagnóstico. En respuesta a esto, surgió la idea de emplear biosensores.

Recientes avances en la investigación de biosensores han permitido que estos se puedan emplear para el diagnóstico de TB. Un biosensor es un dispositivo analítico capaz de detectar una molécula de manera específica (17). Para lograr esto el biosensor cuenta con moléculas de origen biológico que interactúan químicamente con la molécula de interés. Existen diferentes tipos de biosensores dependiendo de la técnica que se usa para medir la interacción; entre esos tipos tenemos: biosensores electroquímicos, biosensores ópticos, biosensores mecánicos y biosensores magnéticos (18). Actualmente los biosensores de tipo electroquímicos son los de uso más extendido en el campo de diagnóstico. Estos muestran un perfil eléctrico diferente a medida que las moléculas biológicas funcionalizadas en su superficie interactúan con el analito de interés. Usando un potenciostato se puede realizar pruebas tales como la voltametría cíclica y la espectroscopia de impedancia.

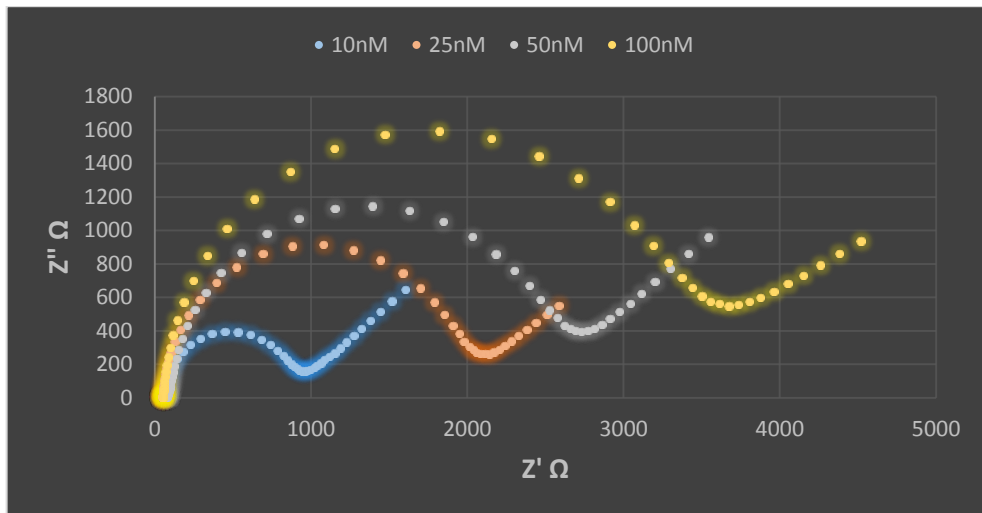
La voltametría cíclica es una técnica electroquímica que se basa en la medición de la transferencia de electrones. Bajo un voltaje controlado administrado por el potenciostato, se registra la corriente que fluye entre la especie reactiva del medio y la superficie que está siendo evaluada (19). De este proceso se obtiene una gráfica denominada voltamograma cíclico (Figura 1); según la convención IUPAC se tiene que el pico superior corresponde a la oxidación de la especie reactiva y el inferior corresponde a la reducción.



**Figura 1.** Voltamograma cíclico de una gradiente de concentración de un compuesto cargado negativamente.

La altura de los picos (que está indicando el flujo de electrones) va disminuyendo conforme aumenta la concentración de un componente cargado negativamente en la superficie evaluada. Para un posterior análisis debe identificar los picos máximos de corriente y compararlo con otras mediciones.

La espectroscopia de impedancia por su lado, se basa en la medición de la impedancia de la superficie evaluada. La impedancia se refiere a la resistencia de un circuito en un contexto de corriente alterna (20). De manera similar, el potenciostato administra voltaje y a la vez registra la resistencia que el circuito ejerce al flujo de electrones. De esta prueba se obtiene un diagrama de Nyquist (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama de Nyquist de una gradiente de concentración de un compuesto cargado negativamente.

La altura de cada semicírculo es proporcional a la resistencia de ese sistema. Para poder analizar estos datos se requiere identificar el circuito equivalente para poder determinar la resistencia de transferencia de carga (RTC) del sistema. Con este valor se puede proceder a comparar la resistencia al flujo de electricidad que presenta un sistema.

En este estudio se evaluará un biosensor funcionalizado con APTES, PDITC y aptámeros (biosensor APA) empleando las técnicas de voltametría cíclica e impedancia en su capacidad de detectar cantidades de ADN de MTB en muestras de orina. Los resultados serán comparados a los resultados de un qPCR de las mismas muestras con



el objetivo de conocer su performance con respecto a una prueba molecular convencional.

## **2. Justificación**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa con la más alta tasa de mortalidad global, que requiere métodos de diagnóstico eficientes para el tratamiento adecuado. Las muestras usadas actualmente son las muestras de esputo; sin embargo, existen pacientes con poca capacidad de producirla, así como el riesgo de contaminación que implica su obtención. Esto hace que las muestras de esputo no sean la primera opción como espécimen de diagnóstico. La orina es una posible muestra que supera estas desventajas.

Se ha visto que es posible detectar ADN transrenal (Tr-ADN) de MTB en orina mediante PCR. Botezatu y colaboradores (21) demostraron que la barrera glomerular en roedores y humanos es permeable a moléculas de ADN que son lo suficientemente grandes como para ser analizadas tras su purificación. El ADN que era excretado en la orina provenía de eventos de muerte celular; estos fragmentos escaparon de la degradación intracelular y de ser fagocitados por células circundantes.

En un evento infeccioso la apoptosis es muy recurrente, siendo este un mecanismo de defensa que reduce la densidad de la población bacteriana. Sin embargo, en el caso de la enfermedad de TB las cosas ocurren de manera diferente. La bacteria MTB inhibe la maquinaria celular que genera la apoptosis, causando en su lugar necrosis (22-24). Esto repercute en la integridad del ADN que se pueda obtener a partir de estos procesos; dado que en la apoptosis las caspasas rompen al ADN de manera específica, mientras que en la necrosis nucleasas no específicas rompen el ADN de manera desordenada (25). Sin embargo, gracias a la investigación realizada por Cannas y colaboradores (26), se pudo demostrar que el Tr-ADN de MTB puede ser detectado en la orina de pacientes con tuberculosis pulmonar. Este hallazgo posibilita el uso del Tr-ADN de MTB para un sistema de detección temprana.

Ya han sido reportados biosensores electroquímicos diseñados para el diagnóstico de TB. Thakur *et al.* desarrollaron un biosensor voltamétrico para detectar el antígeno

MPT64 de MTB, mientras que Nurmalasari *et al.* desarrollaron un biosensor electroquímico a base de oro para detectar ADN de MTB (27, 28).

En este estudio se evaluará un biosensor electroquímico para la detección de ADN a través de una capa terminal de oligonucleótidos sintéticos. El biosensor, denominado APA por la primera letra de las últimas capas: APTES, PDITC y ADN, consta de diferentes componentes en orden: 1) El vidrio cubierto por Oxido de Estaño (IV) dopado con Flúor (FTO, por sus siglas en inglés) que sirve de plataforma, 2) Una capa de grupos hidroxilos que sirven de punto de anclaje para las moléculas de APTES, 3) Una capa de APTES que al contar con silicio en su composición mantiene la conductividad del biosensor, 4) Una capa de PDITC que cumple la función de agente reticulante al unir el APTES con la sonda de captura gracias a sus grupos isotiocianato y 5) Una capa de sonda de captura que se encargará de censar la molécula de interés. Finalmente, el biosensor es tratado con etanolamina para bloquear el PDITC que no ha reaccionado con la sonda de captura. El biosensor es usado de esta manera para detectar el ADN del microorganismo problema mediante la unión específica de este ADN con la sonda de captura.

El presente trabajo de investigación pretende contribuir a esa línea por medio del diseño y ensamblaje de un biosensor electroquímico APA capaz de poder detectar Tr-ADN de MTB extraído a partir de muestras de orina. La optimización de los componentes del biosensor será realizado usando oligonucleótidos sintéticos complementarios a la sonda de captura.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo general:**

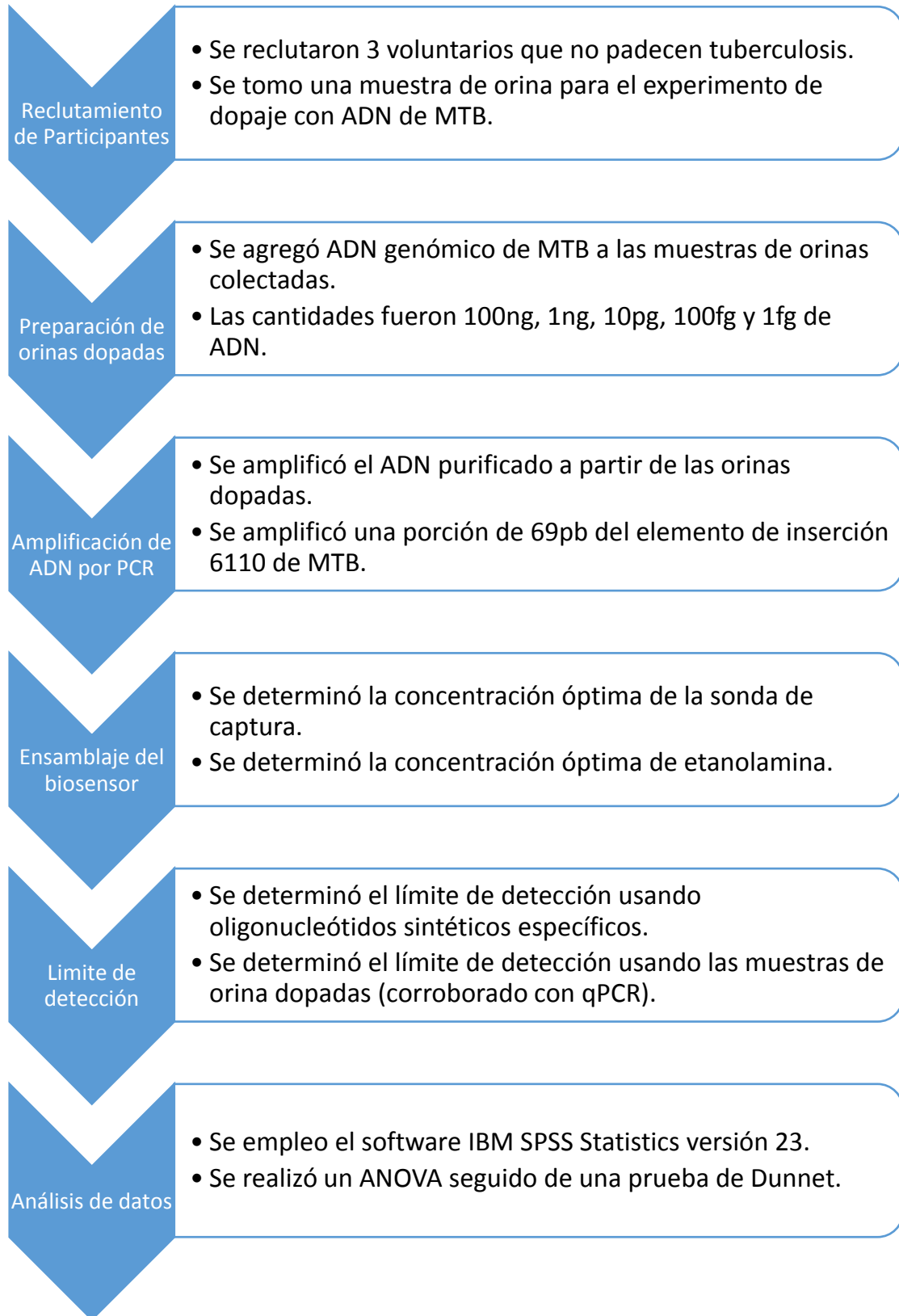
Diseñar el biosensor APA y evaluar su capacidad para detectar ADN de MTB en muestras de orina.

#### **3.2. Objetivos específicos:**

- Determinar la concentración óptima de la sonda de captura mediante la prueba de voltametría cíclica e impedancia usando oligonucleótidos sintéticos.
- Determinar la concentración óptima de etanolamina mediante la prueba de voltametría cíclica e impedancia usando oligonucleótidos sintéticos.
- Comparar el límite de detección del biosensor APA mediante la prueba de voltametría cíclica e impedancia usando oligonucleótidos sintéticos entre el análisis de valores de picos máximos y valores normalizados.
- Determinar el límite de detección de ADN en muestras de orina usando el biosensor APA y qPCR

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Esquema del trabajo



#### **4.2. Alcance del estudio**

Debido a que el presente trabajo tiene como objetivo demostrar la funcionabilidad de un biosensor electroquímico no descrito previamente en la bibliografía, entra en la categoría de una prueba de concepto en la que se usará una muestra de orina de una persona sin TB a la cual se agregará ADN de MTB. Al determinar cuán bien funciona el prototipo, en posteriores estudios se podrá afinar detalles que pudieran mejorar el desempeño del biosensor y proceder con pruebas de mayor escala.

#### **4.3. Reclutamiento de participantes y toma de muestras**

El reclutamiento de participantes fue realizado personalmente por el investigador principal. Se abordó al potencial participante y se le informó sobre el proyecto. A los que aceptaron participar se les solicitó la firma de un documento de consentimiento informado en el cual está escrito claramente el propósito del proyecto de investigación, el proceso que seguirá la muestra y el manejo de la información resultante. Sobre todo, se hace hincapié en que la participación en esta investigación es voluntaria. Los participantes fueron adultos sanos (sin importar el sexo), se tuvo como único criterio de exclusión el no padecer o haber padecido de tuberculosis en su vida. Siguiendo estos lineamientos se reclutó a 3 personas. La toma de muestra consistió en coleccionar 5ml de orina del participante. Este proceso se llevó a cabo una vez en las instalaciones del LID (Laboratorio de Investigación y Desarrollo) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, específicamente en el laboratorio de bioinformática y biología molecular.

#### **4.4. Preparación de orina dopada con ADN y extracción de ADN a partir de orina**

En la orina se puede encontrar nucleasas que ponen en peligro la integridad del ADN que se desea extraer. Entre ellas se tiene a la ADNsa I, cuya actividad en orina es 100 veces más alta que en suero (29). Para minimizar la degradación del material genético se empleó una solución de 0.5M EDTA-0.5MTris-HCl, pH 8.5, para obtener una concentración final de 10mM en la muestra de orina (26). Luego, se agregó cantidades conocidas de ADN de MTB (100ng, 1ng, 10pg, 100fg y 1 fg) y se homogenizó por inversión durante 5 minutos. Para la extracción de ADN, se agregó 5ml de la muestra

de orina a un tubo Falcon de 15ml, para luego agregar 10ml de etanol absoluto. Se homogenizó y luego se dejó incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Una vez pasado ese tiempo, se centrifugó el tubo a 5000rpm por 10 minutos. Después, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el pellet de ADN usando binding buffer del kit de purificación ROCHE. La solución de ADN en binding buffer se pasó a una columna de sílica para su purificación, y finalmente se eluyó en 50ul de elution buffer.

#### **4.5. Amplificación de ADN por PCR**

Se amplificó una secuencia de 69pb de la región IS6110, la cual es altamente específica para MTB (30). Se empleó el cebador delantero: 5'-ACCAGCACCTAACCGGCTGTGG-3' y el cebador inverso: 5'-GTAGGCGAACCTGCCAGGTC-3. Se agregó 3ul de ADN extraído a una solución que contenga 0.3uM de ambos cebadores, 0.6mM de dNTPs, 1X de buffer Pfx50 y 1U de Taq Pfx50; se tuvo un volumen final de 25ul por reacción. La denaturalización se dio a  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de  $94^{\circ}$  por 15 segundos,  $62^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $68^{\circ}\text{C}$  por 5 segundos y se finalizó con un ciclo a  $68^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos.

#### **4.6. Ensamblaje del biosensor**

Se empleó un vidrio recubierto de óxido de estaño (IV) dopado con flúor (FTO). El uso de FTO como sustrato de biosensores ya ha sido descrito anteriormente (31-33); se le prefiere en lugar de otras superficies por su estabilidad química en condiciones atmosféricas, además de ser mucho más barato que sus contrapartes. Se compró vidrio FTO (50mm x 50mm x 2.2mm, resistencia de superficie  $7\Omega/\text{sq}$ ; Sigma-Aldrich) y se cortó en trozos de 2cm x 0.5cm (Figura 3). Luego se limpió el vidrio usando diferentes solventes para eliminar cualquier partícula que esté adherida a la superficie. Se puso el vidrio en un tubo de 1.5ml y se agregó 1ml del solvente para luego ser sonificado por 10 minutos. Para el secado de los vidrios se usó gas nitrógeno. Este paso fue repetido para cada solvente; se empleó acetona, isopropanol, etanol absoluto y agua purificada en ese orden siguiendo una gradiente de polaridad.



**Figura 3.** Vidrio FTO de dimensiones 2cm x 0.5cm sobre el cual se inmovilizará las capas que conforman al biosensor APA.

Después, se puso los vidrios en tubos de 1.5ml nuevos y se agregó 500ul de una solución de  $\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$  (Solución de amoníaco, Peróxido de hidrogeno 30%, Agua purificada) de proporciones 1:1:5. Luego se puso los tubos en un bloque térmico para que puedan incubarse a  $60^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Este paso corresponde a la hidroxilación de la superficie, aquí los grupos hidroxilos (-OH) fueron captados por los átomos de flúor de la superficie del vidrio. Pasado el tiempo de incubación, los vidrios fueron lavados con agua purificada y fueron puestos en tubos de 1.5ml nuevos.

Luego se procedió a funcionalizar una capa de 3-(aminopropil) trietoxisilano (APTES) en la superficie hidroxilada del vidrio (34). El APTES es un aminosilano que permite dos cosas: al ser una molécula bi-funcional se puede unir a la superficie del vidrio por medio de su átomo de silicio y al mismo tiempo expone una terminación amino (-NH<sub>2</sub>) que sirve para seguir adhiriendo capas. Su otra función es la de aumentar la conductividad en la superficie del vidrio y así volver más notable los cambios en el perfil electrónico que se analizó posteriormente. Se preparó una solución de APTES al 2% usando etanol al 95%, y se agregó 500ul al tubo que contiene al vidrio. El vidrio se mantuvo incubando en la solución de APTES al 2% por 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación los vidrios fueron lavados con etanol absoluto, agua purificada y fueron puestos en tubos de 1.5ml nuevos.

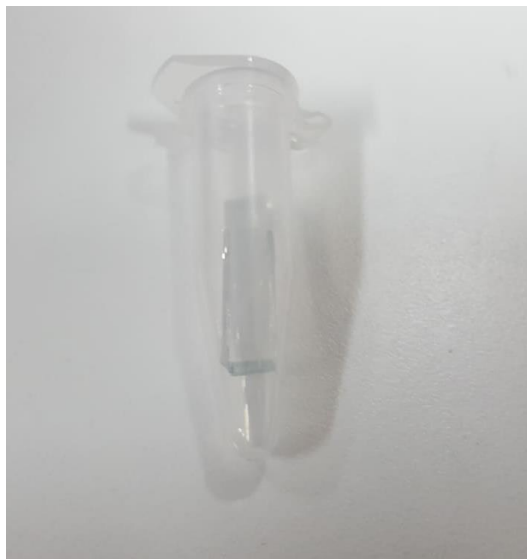
El siguiente paso consiste en la funcionalización de 1,4-fenilendiisotiocianato (PDITC) en el vidrio. Se vio que la inmovilización de la sonda de captura de ADN requería de una molécula intermediaria con el APTES, a este tipo de molécula se le denomina agente reticulante (35-37). El PDITC es un agente reticulante homobifuncional que se unió al grupo amino terminal del APTES y permitirá el acoplamiento de la sonda de captura de ADN; todo esto por medio de sus grupos isotiocianato (R-NCS). Para inmovilizar el agente reticulante se preparó una solución de PDITC a 10mM usando como solvente dimetilformamida (DMF). Se agregó 500ul de esta solución al tubo de 1.5ml que alberga al vidrio y se incubó en oscuridad por 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación se lavó el vidrio con DMF, etanol absoluto, agua purificada y fueron puestos en tubos de 1.5ml nuevos.

Seguidamente, se procedió a la inmovilización de la sonda de captura de ADN. La sonda de captura es un aptámero con una terminación amino (Secuencia: 5' AMINO ACCAGCACCTAACCGGCTGTGGGTAGCAGACCTCACCTATGTGTCGACCTGGGCAGGGTTCG CCTACGTTG3') que se unió al PDITC a nivel del grupo isotiocianato. Utilizando la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se obtuvo que esta secuencia tiene un E-value de 1e-28, con un 100% de alineamiento y 0% de brechas cuando se le comparó con bases de datos de genomas correspondientes a MTB. Primero se preparó una solución de sonda de captura a 0.5, 1 y 1.5 uM usando Buffer Fosfato Salino (PBS) a pH 7.4. Luego, con la ayuda de un Multitester, se identificó la cara conductora del vidrio y se los colocó sobre una superficie plana. Se agregó 40ul de la solución de sonda de captura sobre la cara conductora del vidrio y se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente, teniendo cuidado de cubrir los vidrios para protegerlos de partículas contaminantes. Una vez terminado el periodo de incubación se lavó los vidrios con PBS y agua purificada.

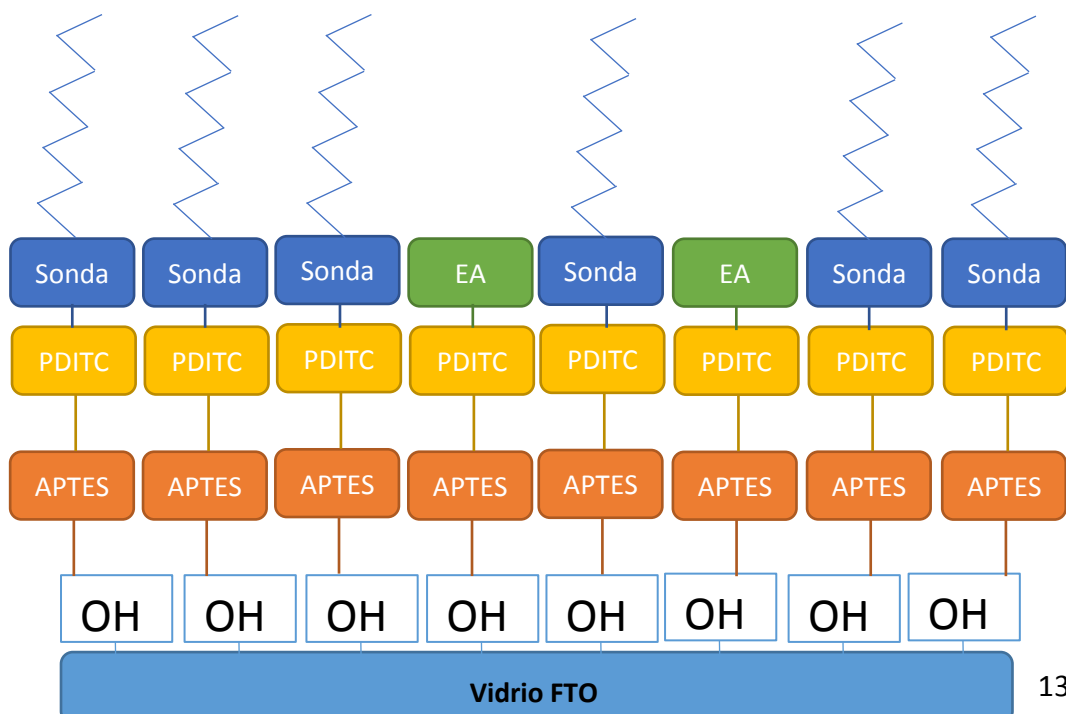
Como último paso, el vidrio tuvo que ser sometido a una solución bloqueante. Durante el proceso de adición de capas al vidrio es posible que algunos grupos químicos que no hayan reaccionado, estos pueden generar interacciones inespecíficas y sobreestimación de las medidas electroquímicas que se realicen por lo que es necesario bloquearlos. Con este fin se empleó etanolamina (EA); esta molécula se une



a los grupos que no hayan reaccionado por medio de su grupo amino y expone su grupo hidroxilo a la superficie, de esta manera atenúa la posible interferencia electrónica (38). Se preparó una solución de EA 25, 50 y 75 mM usando agua purificada. Se agregó 40ul a la superficie conductora del vidrio y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavó los vidrios con agua purificada y ya estaban listos para utilizarse. Para poder almacenarlos se vuelven a colocar dentro de los tubos de 1.5ml (Figura 4) y se mantuvieron en refrigeración a 4 C°.



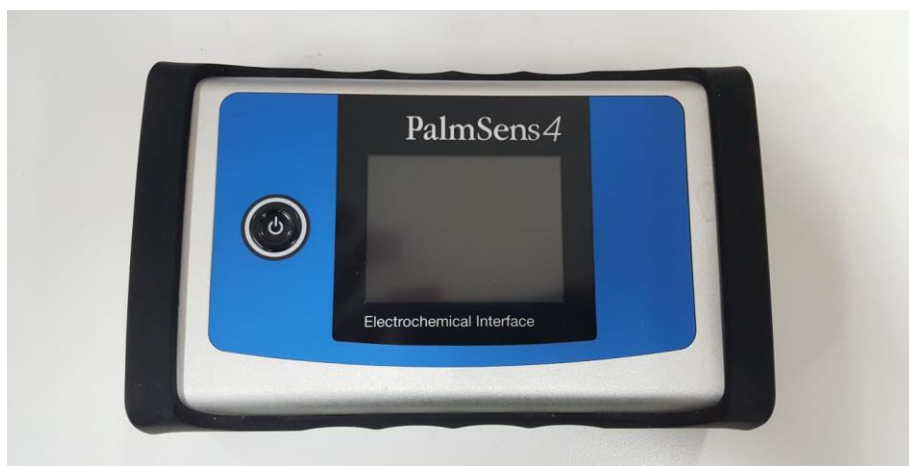
**Figura 4.** Biosensor APA completamente ensamblado dentro de un tubo de 1.5ml listo para utilizarse.



**Figura 5.** Representación gráfica del biosensor APA completamente ensamblado. En la Figura 5 se puede apreciar una representación gráfica del biosensor APA completamente ensamblado.

#### **4.7. Mediciones electroquímicas: Voltametría cíclica y Espectroscopia de impedancia**

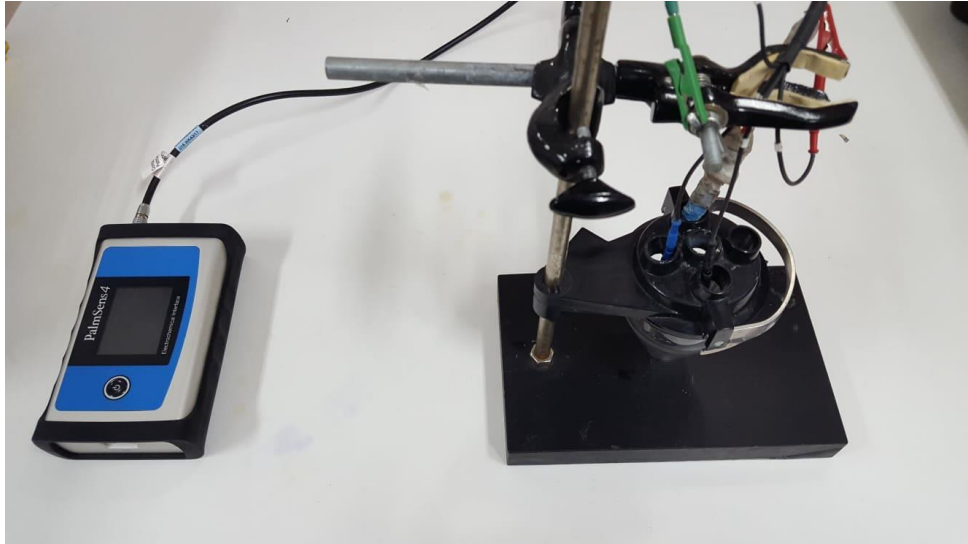
Las medidas se realizaron con la ayuda del potenciostato PalmSens4 (Figura 6). Este dispositivo es una interface electroquímica que permitió realizar las pruebas de Voltametría cíclica (VC) y Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE).



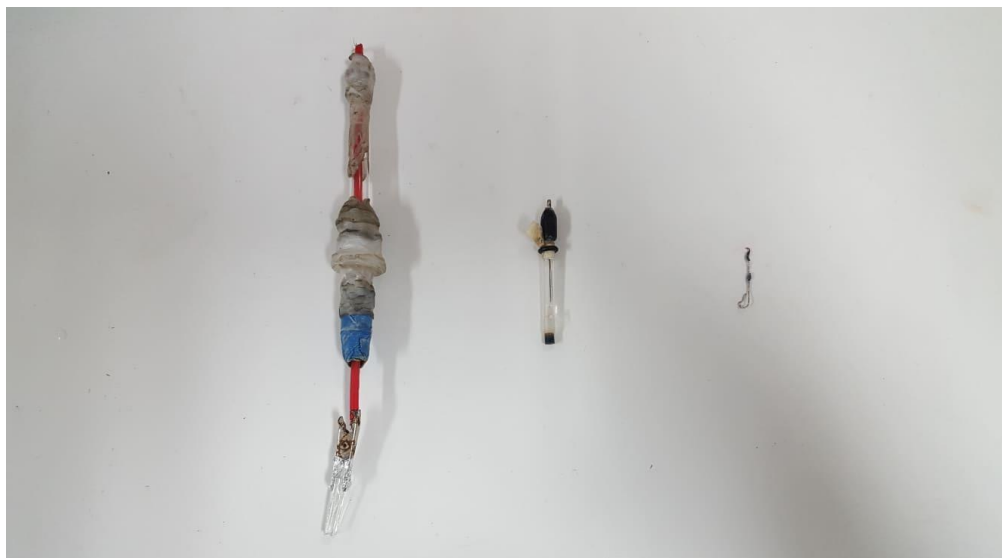
**Figura 6.** Potenciostato PalmSens4 que se empleará para realizar las pruebas de VC y EIE.

Primero se debió de preparar la solución que va dentro de la celda electroquímica, que es el lugar donde ocurren las reacciones de oxidación y reducción. Se preparó una solución de Ferri/ferro (Trihidrato de hexacianoferrato (II) de potasio y Ferricianuro de potasio (III)) a 0.1M usando agua purificada, seguidamente se agregó 400ul de esta solución a 40 ml de PBS. Luego de tener la celda electroquímica lista se debe aplicar la muestra al biosensor para su medición. En la Figura 7 se puede apreciar la celda electroquímica ensamblada y en la Figura 8 se muestran los electrodos empleados. Se usa un electrodo de trabajo que se va a encargar de transmitir el potencial de manera controlada y registrar la corriente, uno de referencia que realizará una reacción conocida y controlada que nos va a indicar que el sistema funcione correctamente, y

un contra-electrodo que va a proveer de la corriente necesaria para estabilizar la corriente registrada por el electrodo de trabajo.



**Figura 7.** Celda electroquímica ensamblada lista para realizar mediciones con el biosensor APA.



**Figura 8.** Electrodo empleados en la celda electroquímica. De izquierda a derecha se observa al electrodo de trabajo, electrodo de referencia y contra electrodo.

Antes de agregar la muestra, ésta se tuvo que someter a un shock térmico para forzar la separación de las doble hebras de ADN. Este proceso consistió en someter a los

productos de amplificación a 95°C por 5 minutos y luego rápidamente a 0°C en hielo por 1 minuto, luego de este proceso la muestra estuvo lista para agregarse sobre el biosensor. Después de este tratamiento se agregó 20ul de la muestra amplificada por PCR junto con 20ul de PBS en la superficie conductora del biosensor, se homogenizó y se dejó incubar por 1 hora. Luego de ese tiempo se lavó el vidrio con PBS y agua purificada. Se colocó el vidrio como el electrodo de trabajo, a su vez se conectó el electrodo de referencia y contra-electrodo para poder realizar la medición. La prueba de VC consistió de 5 barridos que iban de -0.2V a +0.8V, con una velocidad de barrido de 0.1V/s. El rango de corriente que fue detectable fue de 10uA a 1mA. En el caso de la prueba de EIE la mínima frecuencia fue de 0.1Hz y la máxima fue de 100KHz; el rango de corriente detectable fue de 1nA a 1mA.

#### **4.8. Determinación de la concentración óptima de la sonda de captura**

La incorporación de la sonda de captura al biosensor APA es uno de los pasos más importantes en el proceso de ensamblaje, dado que esta capa se encarga de capturar el ADN que se encuentre presente en la muestra. Para determinar la concentración óptima que se debe utilizar se evaluó la respuesta del biosensor. En este experimento se empleó una secuencia "Propia" que se une de manera específica a la sonda de captura y se determinó la diferencia entre las lecturas del biosensor APA antes y después de la aplicación de la secuencia "Propia" en su superficie.

Para proceder con la inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie de PDITC del biosensor se probaron diferentes concentraciones de la sonda de captura. Basándose en el trabajo de Ramos (39), se eligieron las concentraciones de 0.5uM, 1.0uM y 1.5uM para las pruebas bajo las técnicas de VC y EIE.

#### **4.9. Determinación de la concentración óptima de etanolamina**

La Etanolamina (EA) cumple la función de impedir uniones inespecíficas entre el ADN que se encuentre en la muestra y zonas en donde no se haya incorporado la sonda de captura. Al presentar un grupo terminal amino, esta molécula se puede unir al grupo terminal tiocianato del PDITC y exponer a la superficie del vidrio su grupo terminal hidroxilo. Debido a que este grupo terminal tiene carga negativa (electrones libres

correspondientes al grupo hidroxilo), repelerá a las moléculas de ADN (que cuenta con una carga neta negativa debido a sus grupos fosfato). Debido a esta propiedad de la EA se le denomina sustancia bloqueante. En este experimento además de la secuencia “Propia”, se empleó una secuencia “Improbia” que no es específica para la sonda de captura para determinar si el biosensor APA es capaz de diferenciar entre ellas.

Para proceder con la inmovilización de la sustancia bloqueante sobre el biosensor se probaron diferentes concentraciones. Basándose en el trabajo de Ramos (39), se eligieron las concentraciones de 25mM, 50mM y 75mM para las pruebas bajo las técnicas de VC y EIE.

#### **4.10. Determinación del límite de detección del biosensor APA usando la secuencia “Propia”**

Una vez que se tuvo al biosensor APA optimizado se prosiguió con la curva de calibrado. Se enfrentó al biosensor con soluciones de la secuencia “Propia” de diferente concentración (1nM, 5nM, 10nM, 25nM, 50nM y 100nM), realizando cuatro repeticiones por cada una. Adicionalmente se utilizó una solución “blanco” (agua MilliQ) para poder determinar cuál es el límite de detección (LDD), realizando 15 repeticiones.

Se optó por comparar dos formas de procesar los resultados, estas fueron las siguientes:

1. Una forma fue tomar como resultado el valor del pico máximo de la medición correspondiente, de manera que solo era necesaria una sola medición por muestra.
2. La otra forma fue la de tomar como resultado el ratio de la medición antes y después de aplicar la muestra, además de normalizar por el área del biosensor que fue sumergida durante la medición.

Para el cálculo del LDD se procedió con la fórmula propuesta por Jan y colaboradores (40) que figura en la ecuación 1.

$$LDD = Mb \pm \sigma b$$

**Ecuación 1.** Ecuación para calcular el límite de detección. (Jan M, *et al.* 1997)

En donde se define al LDD como el resultado de la suma entre la media de las mediciones de “blancos” ( $Mb$ ) y tres veces la desviación estándar de esos datos. Se comparó el LDD obtenido a partir del empleo de los picos máximos de cada medición con el LDD obtenido a partir de los valores normalizados.

#### **4.11.** Determinación del límite de detección de ADN en muestras de orina usando el biosensor APA y qPCR

Se empleó las orinas dopadas con ADN de MTB que fueron preparadas como fue descrito anteriormente con el fin de determinar cuál es la cantidad mínima detectable según el modelo experimental propuesto.

#### **4.12.** PCR en tiempo real

De manera similar al PCR tradicional, se amplificó la secuencia de 69pb de la región IS6110. Se empleó el cebador delantero: 5' ACCAGCACCTAACCGGCTGTGG- 3' y el cebador inverso: 5'-GTAGGCCGAACCCTGCCAGGTC- 3. Se agregó 2.5ul de ADN a una solución que contenga 0.3uM de cebador delantero, 0.3uM de cebador inverso, 1x de BrighGreen; la solución final tuvo un volumen de 10ul. En el termociclador se configuró la fase de activación a 95°C por 10min, la fase de denaturación a 95°C por 10min y la fase de extensión a 62°C por 60s (estas dos últimas vinculadas por 40 ciclos). Adicionalmente se determinó la curva de fusión para poder comprobar que no se haya dado amplificaciones inespecíficas, para esto se agregó una fase Pre-Fusión a 95°C por 10s y la Curva de Fusión fue de 60°C a 97°C, con un aumento de temperatura de 0.1°C/s.

#### **4.13.** Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados con IBM SPSS Statistics versión 23. Primero, se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos obtenidos siguen una distribución normal. Luego se realizó una prueba de Levene para determinar si los

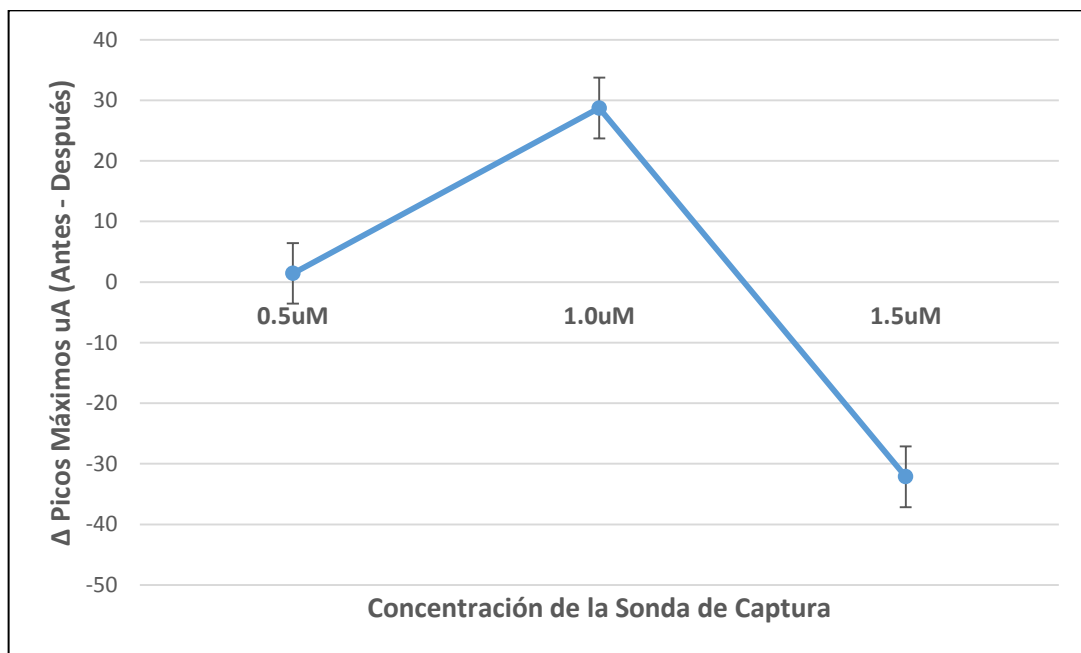
datos tienen una variabilidad homogénea. Luego se hizo una prueba de ANOVA para determinar si hay al menos una diferencia significativa entre los grupos de datos y finalmente se concluyó con la prueba de Dunnet para determinar si existe una diferencia significativa entre el grupo control y los demás grupos que presentan ADN de MTB en diferentes cantidades.

En el caso de los datos procedentes de EIE, se empleó el software PsTracer para analizar los datos y poder determinar el circuito equivalente correspondiente al biosensor analizado. Después de este paso preliminar se procedió con el análisis estadístico como fue descrito anteriormente.

## 5. Resultados

### 5.1. Evaluación de la concentración óptima de la sonda de captura

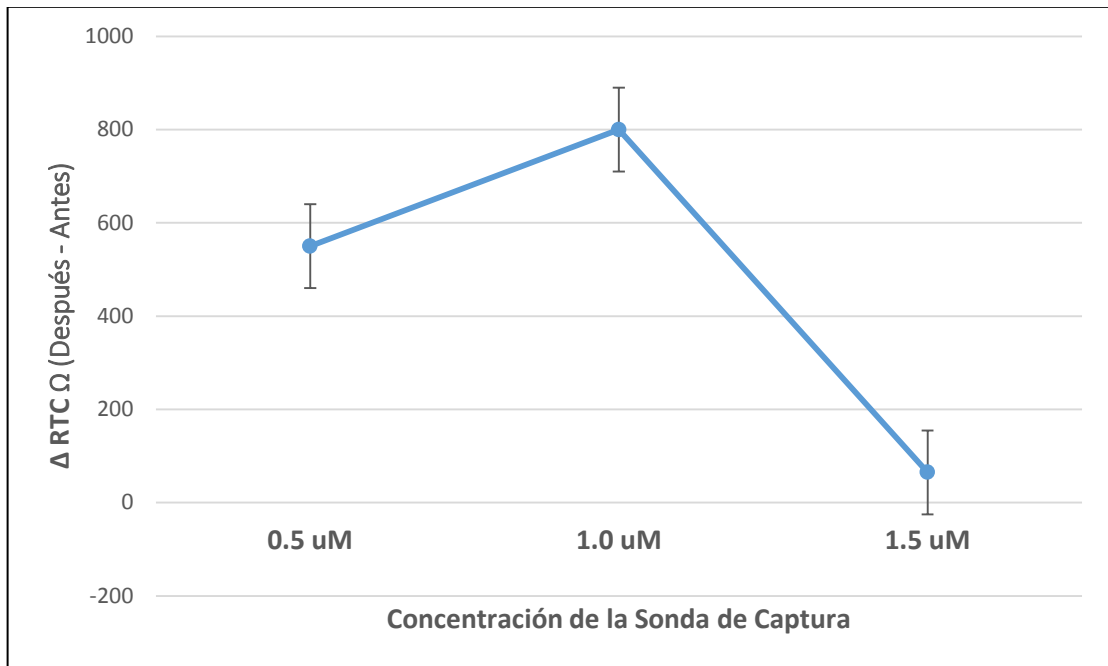
En la Figura 9 se muestra los resultados que se obtuvieron al determinar la respuesta del biosensor APA con cada una de las diferentes concentraciones de sonda de captura (0.5uM, 1.0uM y 1.5uM) empleando la prueba de VC.



**Figura 9.** Respuesta del biosensor APA a la secuencia “Propia” cuando este cuenta con 0.5um, 1.0uM y 1.5uM de sonda de captura en la prueba de VC por cuadruplicado.

Se ve que la concentración de 1.0uM obtuvo la mejor respuesta ya que a diferencia de las otras se pudo detectar la presencia de la secuencia “Propia”, esto fue comprobado mediante una prueba de ANOVA ( $p < 0.05$ ). En la Figura 10 se muestra los resultados obtenidos a partir del mismo experimento, pero usando la prueba de EIE.



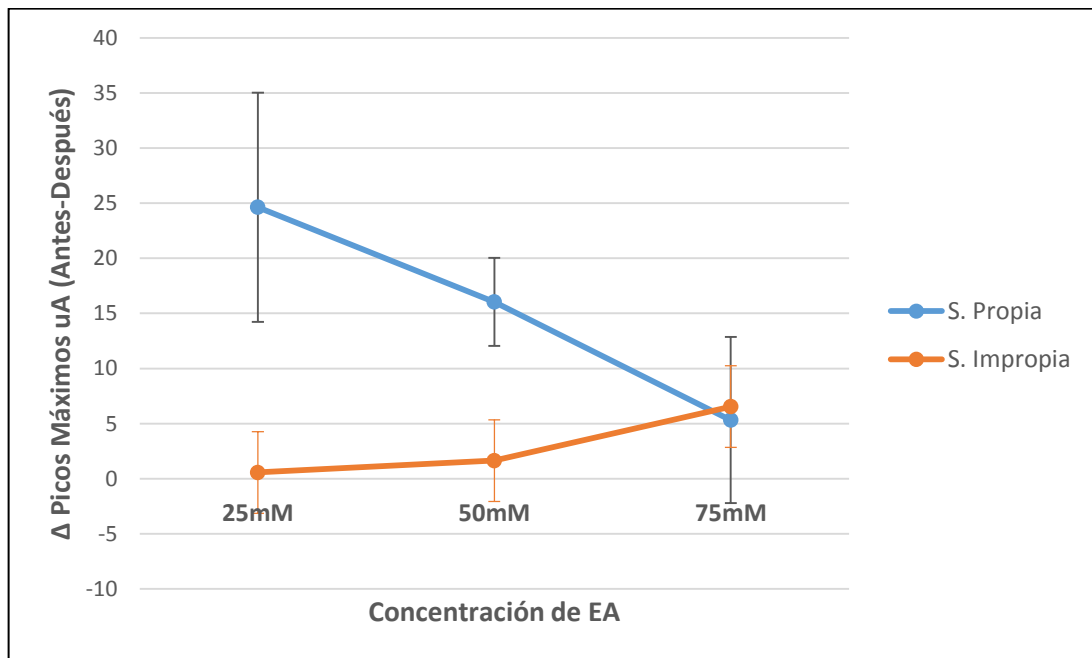


**Figura 10.** Respuesta del biosensor APA a la secuencia Propia cuando este cuenta con 0.5uM, 1.0uM y 1.5uM de sonda de captura en la prueba de EIE por cuadruplicado.

De manera similar a los resultados de la prueba de VC, se observa que la concentración óptima de la sonda de captura sigue siendo de 1.0uM.

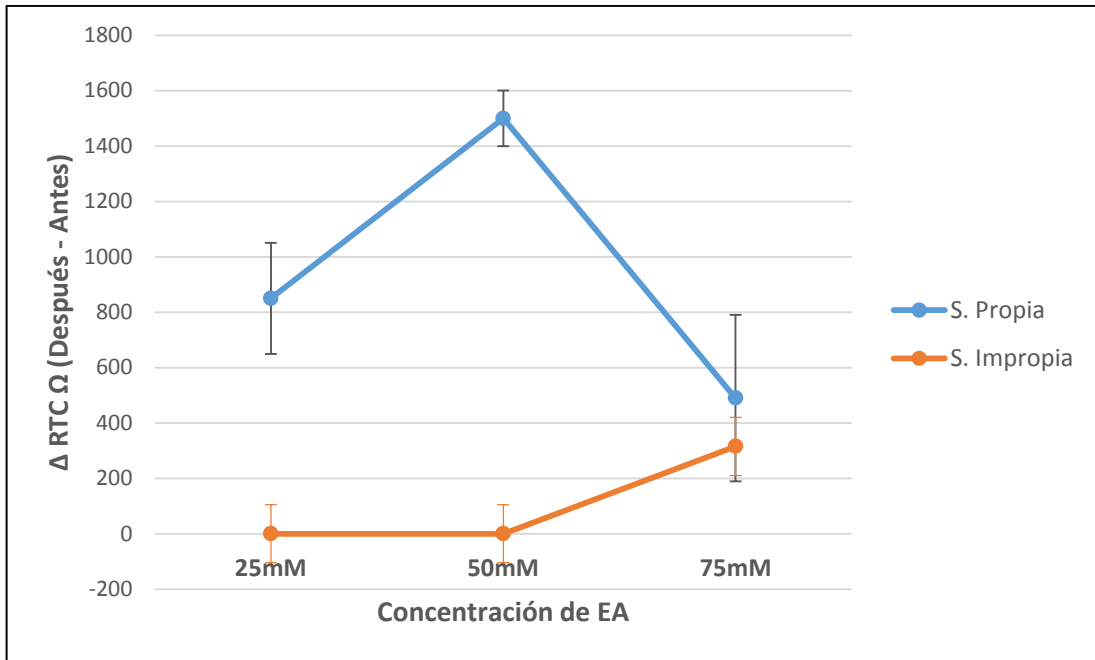
## 5.2. Evaluación de la concentración óptima de Etanolamina

En la Figura 11 se muestra los resultados que se obtuvieron al determinar la respuesta del biosensor APA con cada una de las diferentes concentraciones de EA empleando la prueba de VC.



**Figura 11.** Respuesta del biosensor APA a la secuencia “Propia” cuando este cuenta con 25mM, 50mM y 75mM de EA en la prueba de VC por cuadruplicado.

Lo primero que se nota es que los biosensores que contaban con 75mM de EA mostraron una respuesta muy similar cuando se probó con la secuencia “Propia” e “Impropia”, este hecho descarta su posible uso. Esto nos deja a las concentraciones de 25mM y 50mM como posibles candidatos ya que son diferentes significativamente de la secuencia “Impropia”. Pero al comparar su variación se ve que los biosensores con 50mM obtuvieron resultados más consistentes que los de 25mM. En la Figura 12 se observan los resultados obtenidos a partir del mismo experimento, pero usando la prueba de EIE.



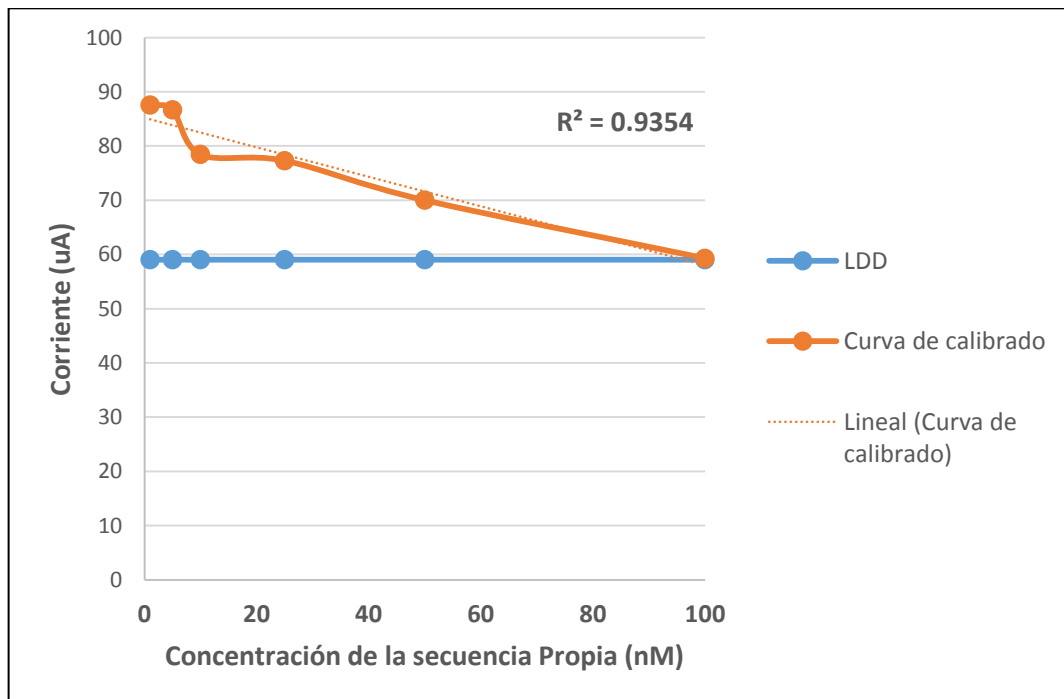
**Figura 12.** Respuesta del biosensor APA a la secuencia “Propia” cuando este cuenta con 25mM, 50mM y 75mM de EA en la prueba de EIE por cuadruplicado.

En este experimento se observa que la concentración de 75mM sigue siendo incapaz de diferenciar entre la secuencia “Propia” y la secuencia “Impropia”. A diferencia del experimento anterior, se ve que la concentración de 50mM obtuvo una mejor respuesta que la de 25mM. En base a estos resultados, los biosensores que se emplearon de aquí en adelante contaron con una capa de sonda de captura de 1.0uM y una de EA de 50mM.

### 5.3. Límite de detección del biosensor APA

#### Curva de calibrado – Voltametría cíclica

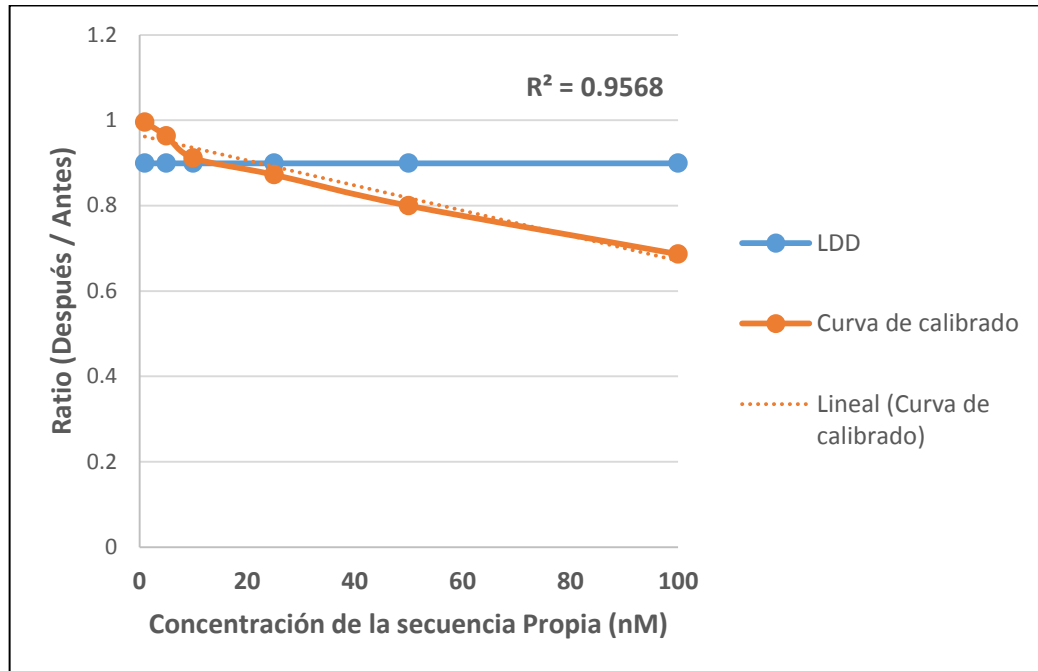
En la Figura 13 se muestra la curva de calibrado que se obtuvo utilizando la prueba de VC.



**Figura 13.** Curva de calibrado bajo la prueba de VC empleando el promedio de los picos máximos de cada medición.

Para esta curva de calibrado se tomó los picos máximos de corriente obtenidos a partir de la prueba de VC. El LDD calculado fue 53.0357µA. Se puede observar que la curva se aproxima mucho a la linealidad, sin embargo todas las mediciones se encuentran por encima del LDD, lo que en este caso es desfavorable dado que nos indica que el biosensor APA no podría detectar muestras con una concentración de 100nM o menor de ADN.

Luego se realizó la curva de calibrado empleando datos que fueron normalizados tal como fue descrito en la sección de metodología, esto se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Curva de calibrado bajo la prueba de VC empleando la estandarización con el área y promedio de las ratios obtenidos.

En esta curva de calibrado se obtuvo un LDD de 0.89913. A diferencia de la curva anterior, se pudo detectar de manera significativa las soluciones de secuencia “Propia” de concentración mayor o igual a 10nM. En base a estos resultados se pudo calcular que la cantidad mínima que puede ser detectada por la prueba de VC es 8.28ng, el cálculo se aprecia en la ecuación 2.

$$M = \frac{\text{masa (g)}}{\frac{\text{Masa Molar}}{\text{Volumen (L)}}}$$

$$1 \times 10^{-8} \text{ mol/L} = \frac{\text{masa(g)}}{\frac{20702.37 \text{ g/mol}}{40 \times 10^{-6} \text{ L}}}$$

$$\text{masa(g)} = 8.28 \times 10^{-9} \text{ g} = 8.28 \text{ ng}$$

**Ecuación 2.** Cálculo de la masa mínima detectable por el biosensor APA usando la prueba de VC.

En donde se emplea el peso molecular de la secuencia “Propia” para poder realizar el cálculo.

Para poder validar los datos se realizó un ANOVA y una prueba Post-Hoc de Dunnett, además de pruebas para comprobar los supuestos requeridos.

**Tabla 1.** Prueba de Shapiro-Wilk con los datos obtenidos de la curva de calibrado con la prueba de VC.

TipoMuestra		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Medida	Blanco	0.982	15	0.973
	100nM	0.976	4	0.880
	50nM	0.794	4	0.072
	25nM	0.789	4	0.066
	10nM	0.874	4	0.313
	5nM	0.951	4	0.723

**Tabla 2.** Prueba Levene con los datos obtenidos de la curva de calibrado con la prueba de VC.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.668	5	26	0.178

En la tabla 1, se observa que el valor de significancia de cada grupo es superior a 0.05, esto nos indica que todos los datos de cada grupo están distribuidos normalmente. En la tabla 2, se observa que el valor de significancia es mayor que 0.05, esto nos indica que existe homogeneidad de varianzas entre los grupos de datos.

Una vez que se comprobó que estos supuestos se cumplían, se realizó una prueba de ANOVA con la posterior prueba Post-Hoc de Dunnett, esto se puede observar en la tabla 3 y 4 respectivamente.

**Tabla 3.** ANOVA con los datos obtenidos de la curva de calibrado con la prueba de VC.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0.332	5	0.066	45.107	0.000
Dentro de grupos	0.038	26	0.001		
Total	0.370	31			

**Tabla 4.** Prueba de Dunnett con los datos obtenidos de la curva de calibrado con la prueba de VC.

(I) TipoMuestra	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
				Límite superior
100nM Blanco	-0.301	0.0255	0.000	-0.241
50nM Blanco	-0.209	0.0236	0.000	-0.152
25nM Blanco	-0.186	0.0236	0.000	-0.129
10nM Blanco	-0.107	0.0255	0.001	-0.045
5nM Blanco	-0.025	0.0255	0.485	0.036

En la tabla 3, se puede observar que existe una diferencia significativa entre al menos un par de los grupos que fueron evaluados. Esto se confirmó con la prueba de Dunnett, en donde se observa que existe una diferencia significativa entre el grupo blanco y los 4 primeros grupos. Esto nos confirma que, para la prueba de VC, el biosensor APA puede diferenciar muestras con un mínimo de concentración de 10nM de ADN. Por último, queda comprobar que linealidad de la curva de calibrado. El valor de R2 no es suficiente para concluir que la curva de calibrado es lineal (49) (50), por lo que fue necesario realizar una prueba de linealidad, esta se puede apreciar en la tabla 5.

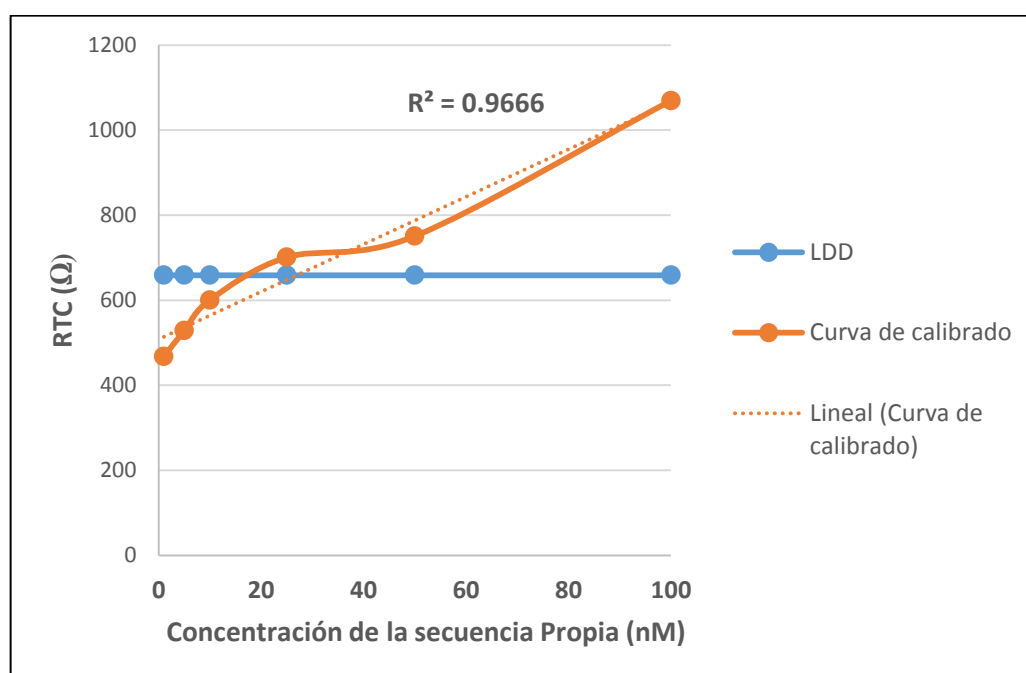
**Tabla 5.** Prueba de Linealidad con los datos obtenidos de la curva de calibrado con la prueba de VC.

			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Medida * TipoMuestra	Entre grupos	(Combinado)	0.178	4	0.044	18.783	0.000
		Linealidad	0.173	1	0.173	72.912	0.000
		Desviación de la linealidad	0.005	3	0.002	0.739	0.543
	Dentro de grupos		0.040	17	0.002		
Total			0.218	21			

Se puede apreciar que el valor de significancia para linealidad es menor de 0.05 y el de desviación de linealidad es mayor que 0.05. Esto nos confirma la linealidad de la curva de calibrado, validando así toda conclusión que se obtenga a partir de ella.

#### Curva de calibrado – Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

En el caso de la prueba de EIE, se siguió el mismo procedimiento experimental para obtener la curva de calibrado. En la Figura 15 se puede observar la curva de calibrado que se obtuvo con la prueba de EIE.

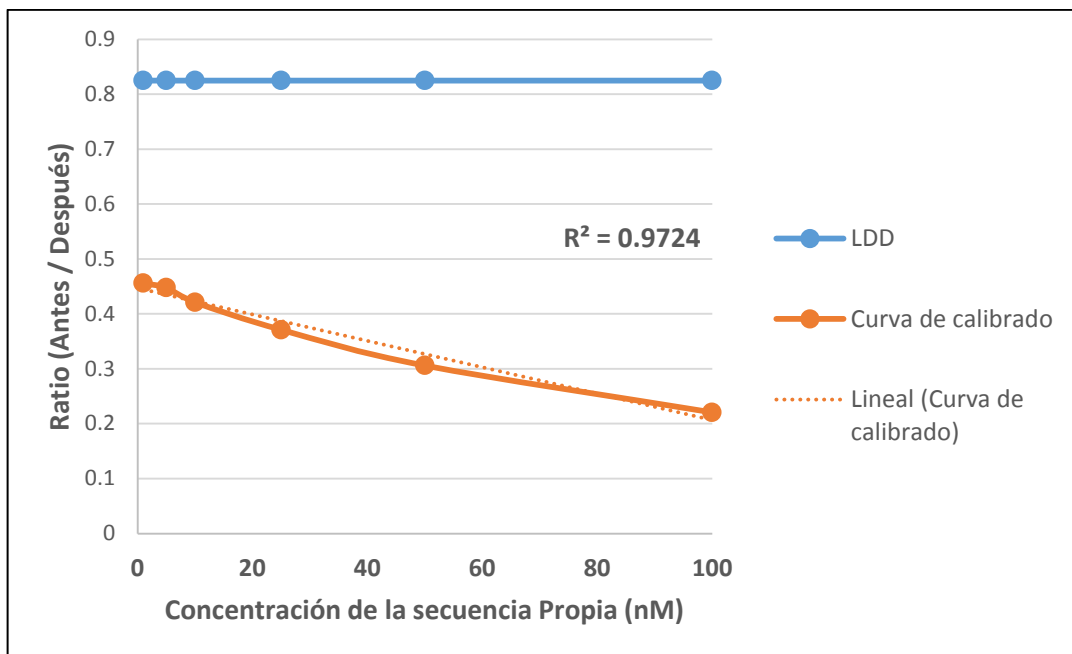


**Figura 15.** Curva de calibrado bajo la prueba de EIE empleando los promedios de los RTCs de cada medición.



Para esta curva el LDD calculado es 658.5325Ω. Se puede observar que la curva de calibrado se aproxima a la linealidad y, a diferencia de la curva en la Figura 13, se pudo detectar significativamente la solución de la secuencia “Propia” de concentración mayor o igual a 25nM.

Luego se realizó la curva de calibrado empleando datos que fueron normalizados tal como fue descrito en la sección de metodología, esta curva que se obtuvo se muestra en la Figura 16.



**Figura 16.** Curva de calibrado bajo la prueba de EIE empleando la estandarización con el área y promedio de los ratios obtenidos.

Se puede observar una gran mejora en la capacidad de detección. Se pudo detectar significativamente la solución de menor concentración (1nM) y la curva sugiere que se pudo haber detectado concentraciones menores. En base a estos resultados se pudo calcular que la cantidad mínima que pudo detectada por la prueba de EIE es 0.828ng, el cálculo se aprecia en la ecuación 3.

$$M = \frac{\text{masa (g)}}{\frac{\text{Masa Molar}}{\text{Volumen (L)}}}$$

$$1 \times 10^{-9} \text{ mol/L} = \frac{\text{masa(g)}}{\frac{20702.37 \text{ g/mol}}{40 \times 10^{-6} \text{ L}}}$$

$$\text{masa(g)} = 0.828 \times 10^{-9} \text{ g} = 0.828 \text{ ng}$$

**Ecuación 3.** Cálculo de la masa mínima detectable por el biosensor APA usando la prueba de EIE.

Para poder validar los datos se realizó un ANOVA y una prueba Post-Hoc de Dunnett, además de pruebas para comprobar los supuestos requeridos.

**Tabla 6.** Prueba de Shapiro-Wilk con los datos obtenidos de la curva de calibrado con la prueba de EIE.

TipoMuestra		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Medida	Blanco	0.949	15	0.656
	100nM	0.825	4	0.155
	50nM	0.890	4	0.384
	25nM	0.883	4	0.351
	10nM	0.865	4	0.277
	5nM	0.804	4	0.109
	1nM	0.910	4	0.483

**Tabla 7.** Prueba Levene con los datos obtenidos de la curva de calibrado con la prueba de EIE.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.929	6	27	0.112

En la tabla 6, se observa que el valor de significancia de cada grupo es superior a 0.05, esto nos indica que todos los datos de cada grupo están distribuidos normalmente. En la tabla 7, se observa que el valor de significancia es mayor que 0.05, esto nos indica que existe homogeneidad de varianzas entre los grupos de datos.

Una vez que se comprobó que estos supuestos se cumplían, se realizó una prueba de ANOVA con la posterior prueba Post-Hoc de Dunnett, esto se puede observar en la tabla 8 y 9 respectivamente.

**Tabla 8.** ANOVA con los datos obtenidos de la curva de calibrado con la prueba de EIE.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2.864	6	0.477	244.045	0.000
Dentro de grupos	0.053	27	0.002		
Total	2.917	33			

**Tabla 9.** Prueba de Dunnett con los datos obtenidos de la curva de calibrado con la prueba de EIE.

(I) TipoMuestra	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
				Límite superior
100nM Blanco	-0.761	0.0262	0.000	-0.696
50nM Blanco	-0.691	0.0262	0.000	-0.626
25nM Blanco	-0.618	0.0262	0.000	-0.553
10nM Blanco	-0.588	0.0262	0.000	-0.523
5nM Blanco	-0.542	0.0262	0.000	-0.477
1nM Blanco	-0.484	0.0262	0.000	-0.418

En la tabla 8, se puede observar que existe una diferencia significativa entre al menos un par de los grupos que fueron evaluados. Esto se confirmó con la prueba de Dunnett,

en donde se observa que existe una diferencia significativa entre el grupo blanco y los 6 grupos evaluados. Esto nos confirma que, para la prueba de EIE, el biosensor puede diferenciar muestras con un mínimo de concentración de 1nM de ADN. Por último, queda comprobar que linealidad de la curva de calibrado, esto se puede observar en la tabla 10.

**Tabla 10.** Prueba de Linealidad con los datos obtenidos de la curva de calibrado con la prueba de EIE.

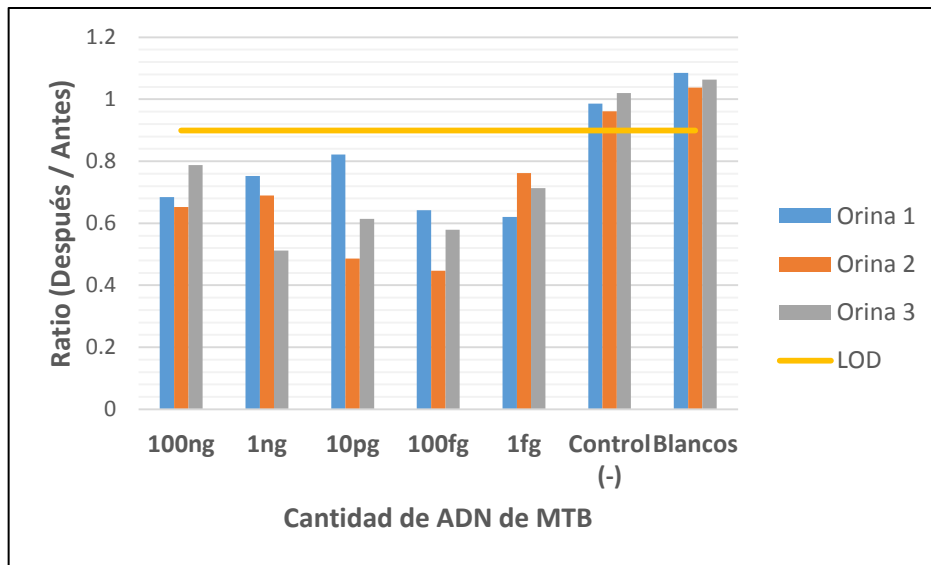
			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Medida * TipoMuestra	Entre grupos	(Combinado)	0.213	5	0.043	77.023	0.000
		Linealidad	0.209	1	0.209	377.987	0.000
		Desviación de la linealidad	0.004	4	0.001	1.782	0.176
	Dentro de grupos		0.010	18	0.001		
	Total		0.223	23			

Se puede apreciar que el valor de significancia para linealidad es menor de 0.05 y el de desviación de linealidad es mayor que 0.05. Esto nos confirma la linealidad de la curva de calibrado, validando así toda conclusión que se obtenga a partir de ella.

Ya que ahora se sabe cuáles son las cantidades mínimas detectables por el biosensor en cada prueba según el modelo experimental propuesto, se procedió a evaluar las muestras de orina con cantidades conocidas de ADN.

**5.4. Evaluación de orinas dopadas con cantidades conocidas de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el biosensor APA.**

Se evaluó 3 orinas dopadas que contenían 100ng, 1ng, 10pg, 100fg y 1fg de ADN de MTB. Los resultados obtenidos con la prueba de VC se muestran en la Figura 17.

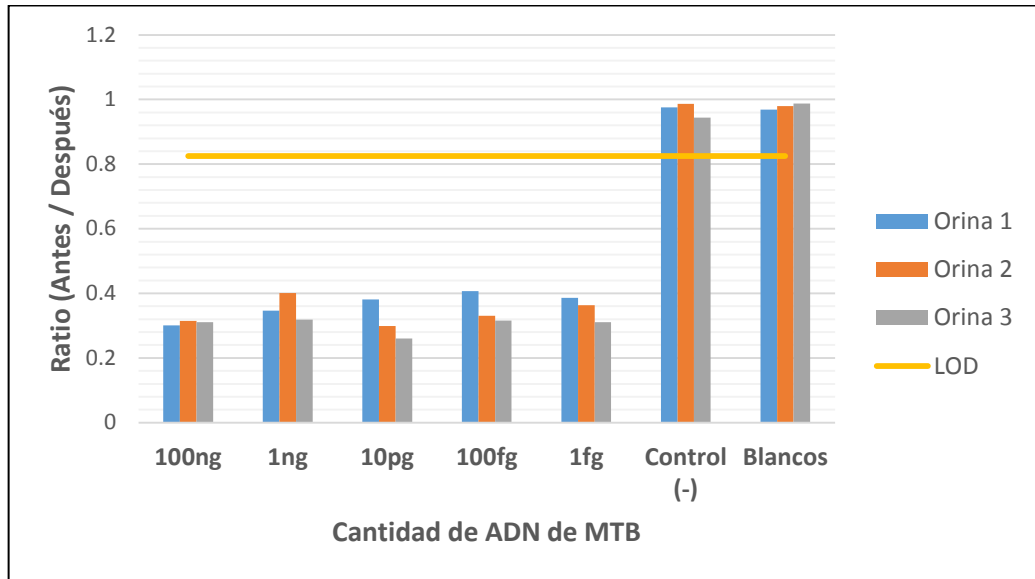


**Figura 17.** Prueba de las orinas dopadas bajo la prueba de VC usando datos normalizados.

Se observa que todas las orinas que contenían ADN de MTB se encuentran por debajo del LDD determinado anteriormente para la prueba de VC, hecho que fue comprobado con una prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ). Además, se puede apreciar que tanto los controles negativos como los blancos están por encima del LDD, lo cual muestra una diferencia clara entre lecturas positivas y negativas.

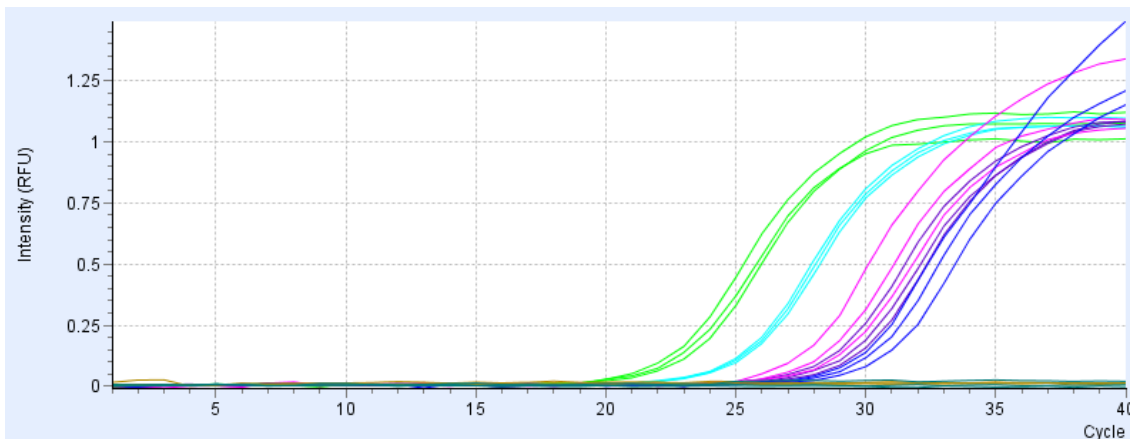
En la Figura 18 se muestra los resultados obtenidos del mismo modelo experimental bajo la prueba de EIE. Se observa una respuesta similar a la prueba anterior; todas las orinas que contaban con ADN de MTB se encuentran por debajo del LDD determinado para la prueba de EIE y los controles negativos con el blanco se encuentran por encima del mismo, esto también fue comprobado por una prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ). Cabe mencionar que las mediciones obtuvieron un resultado mucho más homogéneo de

manera intragrupal, comprobado por una prueba de ANOVA ( $p < 0.05$ ). Adicionalmente se puede apreciar una diferencia más marcada entre las lecturas positivas y negativas.

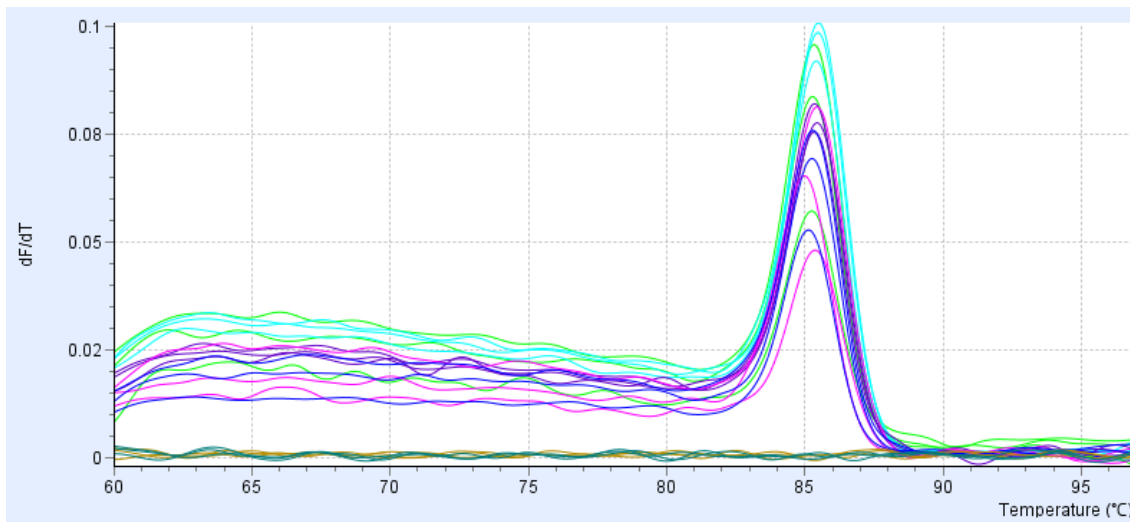


**Figura 18.** Prueba de las orinas dopadas bajo la prueba de EIE usando datos normalizados.

Para poder contrastar los resultados producidos por el experimento con orinas dopadas se empleó una prueba de qPCR que se realizó con las mismas muestras de ADN. En la Figura 18 se muestra el proceso de amplificación y la Figura 19 se muestra la curva de fusión de dicho proceso.



**Figura 18.** Amplificación en tiempo real de las muestras obtenidas a partir de las orinas dopadas. (verde: 100ng, turquesa: 1ng, rosado: 10pg, morado: 100fg, lila: 1fg, mostaza: muestra negativa, celeste: blanco)



**Figura 19.** Curva de fusión del qPCR con las muestras obtenidas a partir de las orinas dopadas. (verde: 100ng, turquesa: 1ng, rosado: 10pg, morado: 100fg, lila: 1fg, mostaza: muestra negativa, celeste: blanco)

Se ve que la amplificación ocurre en acorde con la cantidad de ADN que contenía la muestra empleada, esto también se ve reflejado con los Cqs de cada amplificación (tabla 11). Además, según la curva de fusión no se dieron ningún tipo de amplificación inespecífica. Esto nos indica que los resultados del qPCR son consistentes a la cantidad de ADN usada en el experimento con orina dopada.

	100ng	1ng	10pg	100fg	1fg
	Cq	Cq	Cq	Cq	Cq
<b>Orina 1</b>	21.872	24.257	27.934	28.571	29.681
<b>Orina 2</b>	21.487	24.127	27.287	27.678	29.087
<b>Orina 3</b>	22.168	24.395	26.433	28.245	28.696

**Tabla 11.** Cq's de cada proceso de amplificación agrupados según la cantidad de ADN agregado a la muestra de orina.

## 6. Discusión

La inmovilización de secuencias de ADN en una superficie por medio de moléculas agentes reticulantes ha mostrado resultados óptimos en el campo de diagnóstico. Trabajos como los de Markus y Jorg desmostaron la eficiencia del PDITC como agente reticulante de manera independiente al componente que se le agregue (41). Posteriormente se determinó que la forma de unión amino-isotiocianato es la que presenta la más alta eficiencia de inmovilización (42,43). Esta es la razón por la cual se empleó esta configuración para la inmovilización de la sonda de captura en el biosensor. Teniendo como base el trabajo realizado por Ramos (39) se evaluaron 3 concentraciones de sonda de captura (0.5uM, 1uM y 1.5uM) en donde la de 1uM probó ser la mejor en las pruebas de VC y EIE. La concentración de 0.5uM obtuvo una respuesta débil debido a que no alcanzo una saturación adecuada en la superficie del vidrio lo suficientemente alta como para poder alterar el flujo de corriente. Es por esto que no se puede apreciar una gran diferencia entre la medición antes y después de la aplicación de la secuencia "Propia" en ambas pruebas (Figuras 9 y 10).

La concentración de 1.5uM obtuvo una respuesta aún más débil, esto se debió a la sobresaturación de la superficie del biosensor. Al haber demasiadas sondas de captura, se dio un impedimento estérico que dificultó la unión de la secuencia "Propia". Esto sumado al aumento de la carga negativa basal de la superficie del vidrio conllevó a los resultados observados.

Con el fin de prevenir uniones inespecíficas entre los grupos isotiocianato del PDITC con los fragmentos de ADN que se pueden encontrar en la muestra se decidió emplear etanolamina (EA). El uso de esta sustancia como agente bloqueante ya se encuentra bien descrito en la bibliografía (44-46), en donde se ve su uso primariamente en las pruebas de diagnóstico inmunológicas. En el ensamblado del biosensor, no solo se emplea debido a la presencia de un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) e hidroxilo (-OH) en su composición molecular, sino que también se aprovecha la carga eléctrica que este último grupo expone a la superficie del biosensor. La presencia de esta carga negativa



(electrones libres correspondientes al grupo hidroxilo) impide el flujo de electrones, por lo que su presencia no aporta ningún tipo de interferencia electrónica al realizarse la medición. De esta manera la EA ejerce una actividad bloqueante en el aspecto estérico como electrónico del biosensor.

De manera similar al experimento anterior se probaron 3 soluciones de diferentes concentraciones de EA para la preparación del biosensor. Las concentraciones fueron de 25, 50 y 75mM, estas fueron determinadas en base al trabajo hecho por Ramos (39). En el caso de la prueba de VC (Figura 11), las mediciones obtenidas a partir de los biosensores con 75mM de EA no pudieron diferenciar entre la secuencia "Propia" e "Improperia". Esto se pudo deber a que la EA haya causado un desplazamiento de las sondas de captura ya unidas al PDITC. Al encontrarse en una alta concentración, los grupos aminos de la EA pudieron haber competido con el grupo amino de la sonda de captura por los puntos de unión en el PDITC. Como resultado se obtuvo una superficie despojada parcialmente de las sondas de captura y cargada negativamente por la presencia excesiva de los grupos hidroxilos de la EA expuestos.

En el caso de los biosensores que contaban con 25 y 75mM de EA en su superficie, se observa que ambos pudieron diferenciar entre la secuencia "Propia" e "Improperia". Sin embargo, se vio el coeficiente de variancia (denotado por las barras en la Figura 11) correspondiente al grupo de mediciones de 25mM fue muy superior al del grupo de mediciones de 50mM (coeficientes de variancia:  $10.4 \ll 3.989$ ). Estos resultados, si bien podrían variar al aumentar el número de repeticiones, sugieren que la solución de 50mM es la más adecuada para esta prueba.

En el caso de la prueba de EIE (Figura 12), las mediciones obtenidas a partir de los biosensores con 75mM de EA tampoco pudieron diferenciar entre la secuencia "Propia" e "Improperia". Este resultado apoya la explicación anterior, al saturar la superficie del vidrio con cargas negativas no se pudo obtener mediciones diferentes cuando se aplicó la secuencia "Propia" o la "Improperia". Los biosensores que tenían 25 y 50mM de EA sí pudieron diferenciar entre ambas secuencias, siendo la de 50mM superior. En base a estos resultados se optó por emplear la solución de 50mM de EA para bloquear la superficie del biosensor.

Se realizó la curva de calibrado con 6 diferentes concentraciones de secuencia “Propia” y con un blanco (47). Este experimento tuvo como objetivos: 1) Ver que tan bien los resultados se ajustan a un modelo lineal y 2) Determinar el LDD del biosensor. El problema fue que en las primeras curvas de calibrado obtenidas (Figuras 13 y 15) se observa que hay mediciones que están por encima del LDD, siendo el caso de la prueba de VC más grave al tener todas sus mediciones por encima del LDD. Este resultado negativo se debió a que no se tomó en cuenta dos aspectos importantes: 1) el área del biosensor que se encuentra expuesta a la solución electrolítica y 2) el ratio entre mediciones antes y después de aplicar la muestra.

El primer punto se refiere a que el área que se sumerge en la solución no es la misma entre mediciones, lo que requiere una corrección por área. El segundo punto se refiere a que comparar por si solos los picos máximos de mediciones realizadas con biosensores diferentes es erróneo. Al hacer eso se estaría asumiendo que todos los biosensores son exactamente iguales tanto en dimensiones como en la distribución de moléculas en su superficie. Para corregir esto fue necesario emplear un ratio con una medición antes de aplicar la muestra. Estas observaciones fueron incorporadas en las siguientes curvas de calibrado, esto se puede observar en la Figuras 14 y 16. La prueba estadística más adecuada para este caso fue la de Dunnett (48) ya que determina si es que existe una diferencia significativa entre varios grupos de datos contra un grupo control.

Los LDD obtenidos están por encima de los resultados obtenidos por Salma et. Al (51) (52) en donde se emplearon las mismas técnicas para evaluar un biosensor electroquímico. Este se pudo deber a la diferente metodología empleada, en donde usaron electrodos de oro el cual provee de una mayor estabilidad al sistema pudiendo detectar cambios más sutiles en el medio.

En la prueba con orinas dopadas se apuntó a demostrar la funcionabilidad del biosensor empleando concentraciones conocidas de ADN de MTB. Se ve que ambas pruebas pudieron detectar exitosamente hasta la menor cantidad de ADN. Se nota que, a diferencia de la prueba de VC, en donde los resultados no se muestran muy

parejos, la prueba de EIE obtuvo resultados más homogéneos. Esto se debe a que la prueba de EIE responde a la resistencia que aporta cada capa del biosensor, mientras que la prueba de VC se limita a examinar la superficie. Este resultado va de la mano la curva de calibrado mostrada en la Figura 16, poniendo a la prueba de EIE como la prueba más sensible para el biosensor propuesto.

## **7. Conclusiones**

Las conclusiones obtenidas en la elaboración del biosensor APA son las siguientes:

- El biosensor APA cuenta con las siguientes capas: Vidrio con una cubierta de Oxido de estaño (IV) dopado con Flúor, hidroxilos, APTES, PDITC, sonda de captura y etanolamina.
- La concentración óptima de la sonda de captura determinada mediante la prueba de VC y EIE fue de 1 $\mu$ M.
- La concentración óptima de etanolamina determinada mediante la prueba de VC y EIE fue de 50mM.
- El límite de detección del biosensor usando oligonucleótidos complementarios fue de 8.28ng usando la prueba de VC y de 0.828ng usando la prueba de EIE empleando datos normalizados.
- El límite de detección del biosensor usando orina fue de 1fg de ADN de MTB tanto para la prueba de VC y EIE empleando datos normalizados.

## **8. Recomendaciones**

En este trabajo, que fue una prueba de concepto, se sientan las bases para futuras investigaciones en donde se pueda determinar la “vida de anaquel” del biosensor ensamblado; además de explorar la viabilidad de la aplicación del biosensor en el campo clínico dada su rapidez como método de diagnóstico y su bajo costo comparado con otras pruebas en el mercado.

## 9. Referencias Bibliográficas

1. World Health Organization. WHO Global Tuberculosis Report 2017. Ginebra: World Health Organization; 2017.
2. Dunn JJ, Starke JR, Revell PA. Laboratory Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Disease in Children. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016; 56(6): 1434-1441.
3. Brites D, Gagneux S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunological Reviews*. 2015; 264(1): 6-24.
4. Abdelaiziz MM, Bakr WM, Hussien SM, Amine AE. Diagnosis of pulmonary tuberculosis using Ziehl-Neelsen stain or cold staining techniques?. *Journal of Egyptian Public Health Association*. 2016; 91(1): 39-43.
5. Ryu YJ. Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Recent Advances and Diagnostic Algorithms. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. 2015; 78(2): 64-71.
6. Adler H, Straub C, Frei R. Comparison of Bac T/ALERT 3D, Lowenstein-Jensen medium and Middlebrook 7H10/7H11 biplate for recovering mycobacteria from clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2005; 24(7): 499-500.
7. Samra Z, Kaufman L, Bechor J, Bahar J. Comparative study of three culture systems for optimal recovery of mycobacteria from different clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2000; 19(10): 750-4.
8. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, *et al*. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *The New England Journal of Medicine*. 2010; 363(11): 1005-1015.
9. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert Mtb/Rif assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014; (1): 1-166.

10. Pang Y, Shang Y, Lu J, Liang Q, Dong L, Li Y, *et al.* GeneXpert MTB/RIF assay in the diagnosis of urinary tuberculosis from urine specimens. *Scientific Reports*. 2017; 7: 6181.
11. Lawn SD, Grupta-Wright A. Detection of lipoarabinomannan (LAM) in urine is indicative of disseminated TB with involvement in patients living with HIV and advanced immunodeficiency: evidence and implications. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016; 110(3): 180-185.
12. Sabur NF, Esmail A, Brar MS, Dheda K. Diagnosing tuberculosis in hospitalized HIV-infected individuals who cannot produce sputum: is urine lipoarabinomannan testing the answer. *BMC Infectious Diseases*. 2017; 17: 803.
13. Strohmeier GR, Fenton MJ. Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes and Infection*. 1999; 1(9): 709-717.
14. Lawn SD, Edwards DJ, Kranzer K, Vogt M, Bekker LG, Wood R. urine lipoarabinomannan assay for tuberculosis screening before antiretroviral therapy diagnostic yield and association with immune reconstitution disease. *AIDS*. 2009; 23(14): 1875-80.
15. Luisa P, Ruben M, Zaidi F, Araujo R, Saini N, Harpole M, *et al.* Urine lipoarabinomannan glycan in HIV-negative patients with pulmonary tuberculosis correlates with disease severity. *Science Translational Medicine*. 2017; 9(420).
16. Rama MS, Dominique NP, Lee M, Cho SN, Barry CE, Via LE, *et al.* Association of lipoarabinomannan with human high density lipoprotein in blood: implications for bio-distribution and serum diagnostics. *Tuberculosis*. 2013; 93(3).
17. Estrela P, Formisano N, Jolly P, Bhalla N. Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*. 2016; 60(1): 1-8.
18. Srivastava SK, Rijn CJM, Jongsma MA. Biosensor-based detection of tuberculosis. *RSC Advances*. 2016; 6: 17759-17771.
19. Noémie E, Kelley JR, Brien DM, Eric SR, Thomas TE, Jillian LD. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*. 2018; 95(2): 197-206.

20. Edward PR, Craig EB. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. *Analytical Methods*. 2013; 5: 1098-1115.
21. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y, *et al.* Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clinical Chemistry*. 2000; 46(8): 1078-1084.
22. Zhang J, Jiang R, Takayama H, Tanaka Y. Survival of virulent *Mycobacterium tuberculosis* involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release from necrosis in J774 macrophages. *Microbiology and Immunology*. 2005; 49(9): 845-852.
23. Arnett E, *et al.* PPAR $\gamma$  is critical for *Mycobacterium tuberculosis* induction of Mcl-1 and limitation of human macrophage apoptosis. *PLOS Pathogens*. 2018; 14(6).
24. Agarwal S, Ghosh S, Sharma S, Kaur K, Verma I. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv reveal differential proteome during intracellular survival within alveolar epithelial cells as compared to macrophages. *Pathogens and Disease*. 2018.
25. Didenko VV, Ngo H, Baskin DS. Early Necrotic DNA Degradation. *American Journal of Pathology*. 2003; 162(5): 1571-1578.
26. Cannas A, Goletti D, Girardi E, Chiacchio T, Calvo L, Cuzzi G, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* DNA detection in soluble fraction of urine from pulmonary tuberculosis patients. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2008; 12(2): 146-151.
27. Thakur H, Kaur N, Sabherwal P, Sareen D, Prabhakar N. Aptamer based voltammetric biosensor for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* antigen MPT64. *Microchimica Acta*. 2017; 184: 1915.
28. Nurmalasari R, Yohan, Gaffar S, Hartati YW. Label-Free Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Using Gold Electrode Modified by Self-Assembled Monolayer of Thiol. *Procedia Chemistry*. 2015; 17: 111-117.
29. Bryzgunova OE, Laktionov PP. Extracellular Nucleic Acids in Urine: Sources, Structure, Diagnostic Potential. *Acta Naturae*. 2015; 7(3): 48-54.

30. Hellyer TJ, DesJardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD, Eisenach KD. Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996; 34(11): 2843-2846.
31. Sousa CP, Polo AS, Torresi RM, Córdoba SI, Alves WA. Chemical modification of a nanocrystalline TiO<sub>2</sub> film for efficient electric connection of glucose oxidase. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010; 346(2): 442-447.
32. Rahmanian R, Mozaffari SA, Abedi M. Disposable urea biosensor based on nanoporous ZnO film fabricated from ommissible polymeric substrate. *Materials Science and Engineering:C – Materials for Biological Applications*. 2015; 57: 387-396.
33. Prabhakar N, Thakur H, Bharti A, Kaur N. Chitosan-iron oxide nanocomposite based electrochemical aptasensor for determination of malathion. *Analitica Chimica Acta*. 2016; 939: 108-116.
34. Chaudhary S, Kamra T, Ahsan KM, Snezhkova O, Jayawardena HSN, Yan M, *et al.* Controlled short-linkage assembly of functional nano-objects. *Applied Surface Science*. 2014; 300: 22-28.
35. Sánchez C. Nanophotonic Biosensors for Deciphering Cell Regulation Pathways. “Doctoral Thesis”. Universidad Autónoma de Barcelona. Antoni Villaverde; 2016: 182 p.
36. Ogurtsov VI, Twomey K. *Biomedical Engineering Systems and Technologies*. 881. 1. Roma, Italia: Springer International Publishing; 2017.
37. Gorton L. *Biosensors and Modern Bioespecific Analytical Techniques*. 44. 1. Amsterdam: Elsevier Science; 490 p.
38. Sharma R, Deacon SE, Nowak D, George SE, Szymonik MP, Tang AAS, *et al.* Label-free electrochemical impedance biosensor to detect human interleukin-8 in serum with sub-pg/ml sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016; 80: 607-613.
39. Daniel R, Daniel R, Robert HG, Nehal Naik, Adolfo LTR, Jesus R, Raúl L, Patricia S, Mirko Z. A novel electrochemical biosensor for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. (Artículo en revision)

40. Jan M, Bond AM, Mitchell S, Scollary G. A Statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltametric and stripping techniques. *Pure and Applied Chemistry*. 1997; 69: 297-328.
41. Markus B, Jorg DH. Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. *Nucleic Acids Research*. 1999; 27(9): 1970-1977.
42. Steinberg G, Stromborg K, Thomas L, Barker D, Zhao C. Strategies for covalent attachment of DNA to beads. *Biopolymers*. 2004; 73(5): 597-605.
43. Manning M, Redmond G. Formation and characterization of DNA microarrays at silicon nitride substrates. *Langmuir*. 2005; 21(1): 395-402.
44. Cass T, Ligler FS. *Immobilized biomolecules in analysis: a practical approach*. Oxford Univ. Press; 1998.
45. Prime KL, Whitesides GM. Self-assembled organic monolayers-model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science*. 1991; 252(5009): 1164-1167.
46. Wang RLC, Kreuzer HJ, Grunze M. Molecular conformation and solvation of oligo (ethylene glycol)- terminated self-assembled monolayers and their resistance to protein adsorption. *Journal of Physical Chemistry B*. 1997; 101: 9767-73.
47. Luis CR, Ana MGC, Carlos JL, Manuel RC. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Journal Analytical Letters*. 1993; 26(6): 1243-58.
48. Hae-Young K. Statistical notes for clinical researches: post-hoc multiple comparisons. *Restorative dentistry and endodontics*. 2015; 40(2): 172-176.
49. Almeida AM, Castel BMM, Falcao AC. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2002; 774(2): 215-222.
50. Seyed MM, Sussan G. Linearity of calibration curves for analytical methods: A review of criteria for assessment of method reliability. *Calibration and Validation of Analytical Methods*. IntechOpen. 2018. 20p.



51. Salma B, Saber B, Rym M, Ayoub HS, Hafsa KY. Direct electrochemical DNA sensor based on a new redox oligomer modified with ferrocene and carboxylic acid: Application to the detection of *Mycobacterium tuberculosis* mutant strain. *Analytica Chimica Acta*. 2017; 994: 10-18.
52. Salma B, Saber B, Rym M, Ayoub HS, Hafsa KY. Direct E-DNA sensor of *Mycobacterium tuberculosis* mutant strain based on new nanocomposite transducer (Fc-ac-OMPA/MWCNTs). *Talanta*. 2018; 184: 475-483.