

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE**

**Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales**

**Sustentabilidad y Tecnología**

**PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)**

**Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos**



**ITESO, Universidad  
Jesuita de Guadalajara**

**PAP 4G03 – Apoyo a Centros de Investigación Externos I**

**“Nanocomplejo para diagnóstico de Tuberculosis”, Unidad de Biotecnología  
Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y  
Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara.**

**PRESENTAN**

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Nanotecnología. Diego Oviedo Chávez

Profesor PAP: Dr. Mario Alberto Flores Valdez

Tlaquepaque, Jalisco, Mayo de 2020

# ÍNDICE

## Contenido

REPORTE PAP .....	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional .....	2
Resumen .....	2
1. Introducción.....	3
1.1.    Objetivos .....	3
1.1.1.    Objetivo General.....	3
1.1.2.    Objetivos Específicos .....	3
1.2. Justificación.....	4
1.3 Antecedentes.....	4
1.4. Contexto .....	6
2. Desarrollo .....	10
2.1. Sustento teórico y metodológico .....	10
2.2. Planeación y seguimiento del proyecto .....	16
3. Resultados del trabajo profesional.....	38
4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto .....	42
5. Conclusiones.....	46
6. Bibliografía.....	47
Anexos (en caso de ser necesarios) .....	52

## REPORTE PAP

### Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

*Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son una modalidad educativa del ITESO en la que el estudiante aplica sus saberes y competencias socio-profesionales para el desarrollo de un proyecto que plantea soluciones a problemas de entornos reales. Su espíritu está dirigido para que el estudiante ejerza su profesión mediante una perspectiva ética y socialmente responsable.*

*A través de las actividades realizadas en el PAP, se acreditan el servicio social y la opción terminal. Así, en este reporte se documentan las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo del proyecto, sus incidencias en el entorno, y las reflexiones y aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.*

### Resumen

**Antecedentes:** Es fundamental la obtención de un diagnóstico sucinto, específico y sensible para el control epidemiológico de la tuberculosis (TB), una enfermedad infecciosa que es potencialmente mortal para los seres humanos y que es ocasionada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Los nanobiosensores son otra opción de dispositivos portátiles, sensibles, específicos y rápidos que permitirían realizar una detección acertada de TB, debido al uso de los respectivos biomarcadores presentes en los diferentes estados clínicos de la enfermedad. Es necesario mejorar el diagnóstico dentro de la población potencialmente afectada por esta enfermedad, para identificar correctamente a los portadores; con el fin de evitar su transmisión y proporcionar un tratamiento adecuado a los infectados. **Objetivo:** Diseñar una prueba piloto, a nivel de laboratorio, para la detección de anticuerpos anti-antígenos de Mtb a través de un nanocomplejo, mediante la medición de señales voltaje/amperaje (V/A) medidas al momento de contacto anticuerpo-antígeno (Ac-Ag). **Metodología:** Extracción, purificación, dializado, cuantificación y confirmación de las proteínas recombinantes (ESAT-6/CFP-10 y HspX); modificación de la superficie del

electrodo con los biomarcadores; caracterización del dispositivo y evaluación para la detección de TB por medio de sueros de personas con o sin TB. **Resultados:** El análisis SDS-PAGE, el Western Blot y el Dot Blot confirmaron la presencia de las proteínas recombinantes de interés, que se cuantificaron para su posterior unión al electrodo. **Conclusión:** Se confirmó la extracción correcta de las proteínas recombinantes que se emplearán como biomarcadores, indicando el inicio al desarrollo del nanobiosensor para su caracterización y evaluación posterior.

## 1. Introducción

### 1.1. Objetivos

#### 1.1.1. Objetivo General

Diseñar una prueba piloto, a nivel de laboratorio, para la detección de anticuerpos anti-antígenos de Mtb a través de un nanocomplejo, mediante la medición de señales voltaje/amperaje (V/A) medidas al momento de contacto anticuerpo-antígeno (Ac-Ag).

#### 1.1.2. Objetivos Específicos

- Desarrollar destrezas en el ámbito de diagnóstico molecular desde un enfoque nanotecnológico y empleando herramientas biotecnológicas.
- En el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO) buscar ampliar la visión e impulsar más colaboraciones entre las carreras de nanotecnología y biotecnología.
- Revisar los protocolos y los manuales para la manipulación de proteínas recombinantes.
- Realizar la expresión de las proteínas provenientes de la Mtb, como también su extracción, purificación y confirmación por SDS-PAGE y Western Blot; de acuerdo con los manuales y protocolos previamente revisados.
- Sintetizar el nanocomplejo con superficie modificada o encapsulamiento de las proteínas recombinantes.

- Efectuar las experimentaciones y el análisis de los datos obtenidos para determinar los aspectos de mejora del nanocomplejo.

## 1.2. Justificación

El proyecto tendrá un impacto social porque ofrecerá un método no invasivo, con una sensibilidad específica y precisa; que mejorará la detección y tratamiento de las personas que desconocen estar infectadas de tuberculosis (TB). Se beneficiarán principalmente las personas con enfermedades que debilitan al sistema inmune (inmunocomprometido), como son el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Sida) o diabetes mellitus (DM).

El ITESO tendrá la oportunidad de colaborar para la mejora del dispositivo y la posibilidad de escalar el uso del dispositivo al sector salud. Además, existirá un vínculo más dentro del grupo de investigadores del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). De igual manera, el estudiante podrá experimentar la aplicación de sus conocimientos de nanociencias en el área de biotecnología médica. Asimismo, podrá perfeccionar su forma de trabajo dentro del entorno de la investigación.

Este estudio se enfocará en proponer un nanobiosensor electroquímico como método de detección de TB porque estos dispositivos poseen mejores capacidades en comparación a tecnologías como son los biosensores y las convencionales que se emplean. Así, el presente trabajo permitiría mostrar las propiedades respecto a especificidad, sensibilidad, reproducibilidad, sencillez y de fácil manejo. Además, que su producción pueda ser escalable a la industria y su costo sea accesible para poder adquirirlo; con el fin de implementarlo dentro de sistemas de salud.

## 1.3 Antecedentes

El CIATEJ se fundó en agosto de 1976, teniendo 43 años de respaldo. La unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica (BMF) se fundó en el 2009 y se conforma de 22-24

investigadores titulares, y alrededor de 40 estudiantes de maestría y doctorado. Sus líneas de investigación son:

1. Desarrollo y evaluación de vacunas y compuestos inmunomoduladores.
2. Desarrollo y validación de pruebas de diagnóstico molecular.
3. Desarrollo y evaluación de productos con potencial terapéutico.
4. Ingeniería biomédica de medicamentos biotecnológicos e ingeniería de tejidos.

Dentro de los investigadores titulares, se encuentra el Dr. Mario Alberto Flores Valdez. Se unió a la unidad en octubre del 2007 como investigador principal. Las ramas en las que basa sus temas de investigación son enfermedades infecciosas y síntesis de biopelículas. Actualmente es asesor de una tesis de maestría y tres tesis de doctorado.

En un caso particular, la tesis para el grado de doctora de la Maestra en Ciencias (M.C.) Wendy López Romero se basa en el desarrollo de una prueba de laboratorio del tipo enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA); haciendo uso de cuatro proteínas recombinantes específicas de la TB. Como un seguimiento a la rama de diagnóstico de la TB, buscando realizar una prueba piloto comercial de alta especificidad, no invasiva y de bajo costo.

La prueba piloto consistirá en un nanocomplejo compuesto de un electrodo de carbón vítreo con superficie modificada, es decir, las proteínas recombinantes serán ancladas en la superficie. Al momento de poner en contacto el nanocomplejo con el suero del paciente, que contienen los anticuerpos (Ac) anti-antígenos de Mtb producidos (si están infectados de TB); éstos se unirán a los antígenos (Ag) del nanocomplejo. Durante la unión Ac-Ag se generan señales de voltaje-amperaje (V/A) que serán identificadas, medidas y clasificadas; para determinar cuándo un resultado es positivo y negativo.

El equipo de trabajo se conforma por el Dr. Mario Flores como líder, en conjunto con la Dra. Alba Adriana Vallejo Cardona (investigadora catedrática CONACYT de la unidad BMF, especialidad en farmacéutica y nanomedicina) será colaboradora para el desarrollo del

nanocomplejo. En seguida, se encuentran los estudiantes de doctorado y de maestría. Estaré bajo la supervisión y orientación de la M.C. Wendy López Romero para la obtención, purificación y confirmación de las proteínas recombinantes de TB. También de la M.C. Andrea Ochoa para el anclaje de las proteínas purificadas en el electrodo junto con sus respectivas caracterizaciones.

#### 1.4. Contexto

La tuberculosis (TB) se encuentra en la novena posición en las causas de muerte a nivel mundial. Además, se ubica en la primera posición de las enfermedades transmisibles porque al momento que alguien con la enfermedad tose, arroja la Mtb al ambiente y cualquier persona susceptible puede adquirirla. Se hospeda principalmente en los pulmones, pero puede migrar alguna otra parte del cuerpo [4,5]. Existen diferentes escenarios al momento de contraerla [3]:

- I. El sistema inmune innato elimina el patógeno (90% de los casos).
- II. No se elimina, pero se impide su multiplicación; se le conoce como TB latente.
- III. La enfermedad se manifiesta dentro de un lapso menor a 2 años, conocida como TB activa.

Con base en las cifras proporcionadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), 16 de cada 100 personas mueren debido a dicha enfermedad [5]. A nivel global, en el 2018, se registraron 7,253,116 casos nuevos de TB; observándose un incremento del 3.4% en comparación al 2017. Como se observa en la Figura 1.1, la mayor incidencia en hombres fue en las edades de 25-34 años, al igual que en mujeres; del total de casos confirmados el 58% corresponde a hombres, 34% a mujeres y el 8% a niños (0-14 años) [9]. Es claro, que la TB es una problemática que azota a la sociedad, a pesar de ser prevenible y curable, es una de las enfermedades infecciosas más letales existentes. Afecta principalmente a todas las personas de bajos recursos, debido a la falta de educación y la falta de buena alimentación [6,7].

En lo que respecta a México, se notificaron un total de 24,096 casos de TB, donde cerca de 2,800 casos son personas con VIH/Sida y 23,271 son casos nuevos junto con recaídas. Según se muestra en la Figura 1.2 se denota que el 61% de los casos son hombres, 36% son mujeres y 3% son niños (0-14 años) [10]. Se detectan alrededor de 15 mil casos nuevos de TB pulmonar (PTB, por sus siglas en inglés) cada año, dentro de los cuales 2 mil terminan en defunción [5]. Dentro del estado de Jalisco, con base en el último Boletín Epidemiológico (semana 15 del 2020), se tienen registrado un total de 314 casos de TB. En la Figura 1.3 se expone la distribución de los casos, donde 182 hombres y 128 mujeres están diagnosticados con PTB y cuatro mujeres con otra clase de TB [8].

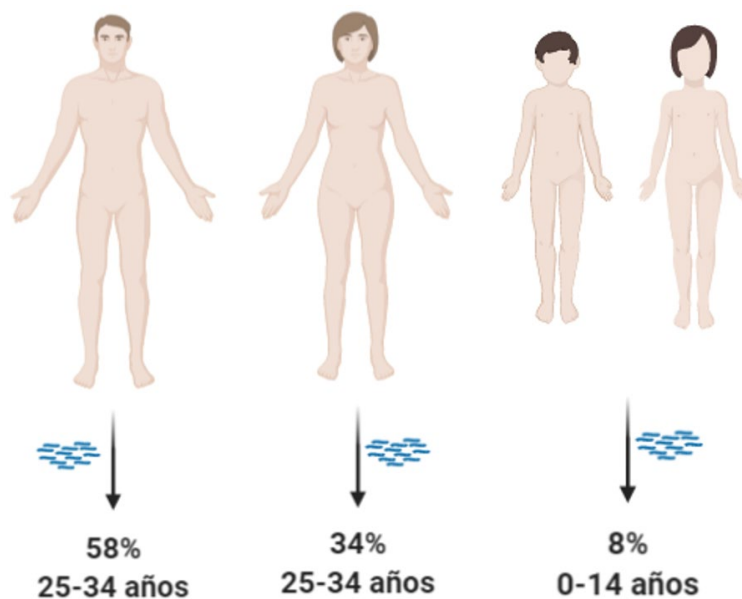


Figura 1.1 – Distribución de los casos confirmados de TB a nivel global [9].



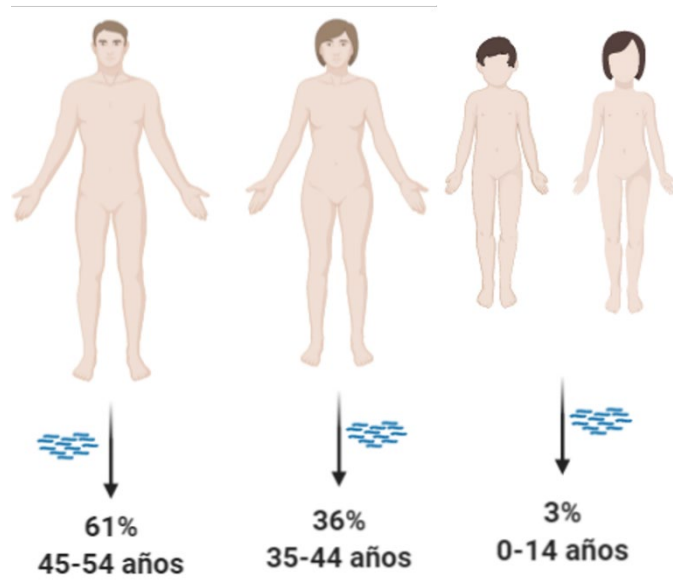


Figura 1.2 – Distribución de los casos confirmados de TB en México [10].

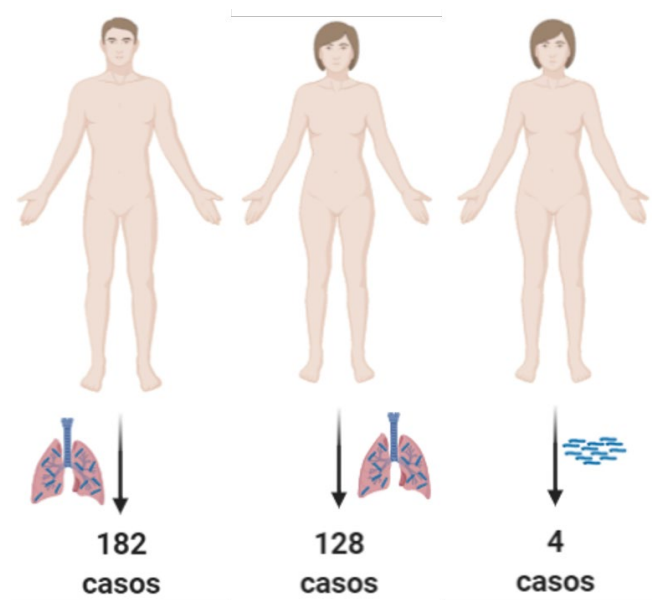


Figura 1.3 – Distribución de los casos confirmados en Jalisco [8].

Por parte de la Organización Panamericana de la Salud se informó que las personas con diabetes mellitus (DM) presentan mayor probabilidad de contraer TB. Las poblaciones de América Latina y las poblaciones en Estados Unidos (EU) son especialmente las más afectadas; jóvenes de menos de 40 años y que padezcan DM. La DM y la TB tienen una

correlación; entre más grave sea el estado de una, la otra igual se agravará [2]. Se ha notificado de casos en donde se requiere aumentar la dosis de insulina y que el tratamiento antiTB se debe prolongar más tiempo de lo que normalmente se aplica [4,5]. Es necesario que las personas con DM tengan una revisión frecuente de su estado general de salud.

El diagnosticar TB activa es relativamente sencillo, el problema real es diagnosticar TB latente o el rango de infecciones asintomáticas así conocida. De las pruebas más utilizadas está la prueba intradérmica de tuberculina, la cual consiste en una inyección en el antebrazo, de una mezcla de proteínas llamada Derivado Proteico Purificado (PPD, en inglés). La aplicación de PPD en el antebrazo en personas previamente infectadas de Mtb muestran una reacción de hipersensibilidad retardada, resultando una induración alrededor del sitio de inyección. La reacción se presenta dentro de un estadio de 48 a 72 horas y se lee el diámetro (mm) de la induración. Una prueba positiva tendrá una induración entre 10-15 mm, dependiendo del sistema inmune o de la vacunación previa, indicando infección con Mtb y riesgo de desarrollar TB. Además, se considera la frecuencia de contacto (o no) con personas infectadas con TB, para evaluar y definir si es una reacción positiva o no [3,4]. Por otro lado, existen inconvenientes de esta prueba [4,5] como los siguientes:

- Puede llevar a una idea equivocada de enfermedad, debido a que la composición del PPD es similar a la vacuna contra TB aplicada a niños; vacuna bacilo Calmette-Guérin (BCG).
- La piel de la persona no puede reaccionar ante la infección (anergia cutánea), dando un falso negativo.
- Debido a una infección por TB muy antigua (en términos de años) también puede dar un falso negativo.

Existen otras pruebas menos invasivas para el paciente como [3]:

- Ensayos de liberación interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Conocido como IGRAs por sus siglas en inglés, es una prueba de sangre que puede determinar si una persona está infectada con Mtb; midiendo el grado de reacción del sistema inmunitario ante

dicha bacteria. El resultado será positivo o negativo con base a la cantidad presente de IFN- $\gamma$  producida en respuesta a la re-estimulación antigénica. La reacción inflamatoria se produce fuera del cuerpo, lo que reduce las molestias al paciente (comezón e inflamación en antebrazo).

- Detección de anticuerpos con Ac modificados. Se extrae el suero de la muestra de sangre del paciente y se analiza a través de pruebas de flujo lateral, Western Blot, ELISA, entre otras.
- Hemaglutinación. Muy útil para casos fuertemente positivos ante TB. Es el mismo principio utilizado para determinar el tipo sanguíneo.

Sin embargo, aún existe probabilidad de generar falsos positivos o falsos negativos, por lo que se requiere identificar un punto estratégico de la Mtb: sus proteínas antigénicas. Si se englobarán la mayoría de los Ag de Mtb, se podría detectar TB sin importar la condición clínica del paciente. Esta propuesta ya se ha comenzado a trabajar en el diseño de ensayos para diagnosticar TB en personas con VIH/Sida [3], sin embargo, es necesaria la validación de las proteínas en diferentes poblaciones para delimitar su utilidad en el diagnóstico [12].

## 2. Desarrollo

### 2.1. Sustento teórico y metodológico

Actualmente se tiene identificado un grupo de proteínas provenientes de Mtb, que se han estado estudiando para su aplicación en el reconocimiento, análisis y evaluación clínica de TB; algunas de estas proteínas identificadas son *HspX* y *ESAT-6/CFP-10* [11-13]. Los ámbitos donde se han comenzado a emplear dichas proteínas son en el diseño de vacunas y métodos de diagnóstico más específicos, debido a limitaciones identificadas en los procedimientos convencionales que se utilizan hasta el momento.

Los dispositivos para uso en punto de atención (point of care (POC), por sus siglas en inglés) actuales no proporcionan un diagnóstico de alta especificidad y confiable. La prueba de tuberculina se ha empleado como la prueba base en el tamizaje para TB porque es sencilla

de realizar y presenta una sensibilidad del 80% en los individuos (sin inmunosupresión conocida). Desafortunadamente, pueden presentarse errores [16]:

- a) Durante la inoculación.
- b) Durante la lectura de la induración.
- c) Su desempeño sea erróneo en pacientes con inmunodeficiencias.
- d) Se requiera más de una visita por parte del paciente.
- e) Su especificidad está comprometida debido a la alta complejidad antigénica, presentando falsos-positivos por exposición a micobacterias ambientales o pacientes vacunados con BCG.

Respecto a las proteínas previamente mencionadas presentan características peculiares cada una. La proteína de choque térmico (heat shock protein (*HspX*) por sus siglas en inglés) es una proteína  $\alpha$ -cristalina (*Acr*, por sus siglas en inglés). También conocida como Hsp16.3 por su peso molecular de 16.3 kilodaltones (kDa); donde su gen encargado de codificarlo es el *Rv2031c*. Se produce durante la fase de retraso, en el crecimiento estático y ligeramente en la fase activa. En ocasiones, se produce bajo condiciones de estrés como hipoxia, escasez de nutrientes y presencia de óxido nítrico (NO); logrando alcanzar el 25% de la expresión total de proteínas bacterianas [12]. Dicha proteína es requerida para la persistencia y/o supervivencia a largo plazo de micobacterias dentro de los macrófagos y posee la capacidad para escapar de la respuesta inmune innata del huésped al aumentar la estabilidad de las proteínas y de las estructuras celulares durante la fase latente [13]. Investigaciones recientes evidenciaron que las respuestas de interferones (IFN) específicos de *HspX* fueron considerablemente mayores en individuos expuestos a *Mtb* porque es un antígeno presente en la fase latente de la infección tuberculosa (LTBI, por sus siglas en inglés) [12,13].

El objetivo antigénico secretor temprano de 6 kDa (early secretory antigenic target (*ESAT-6*), por sus siglas en inglés) y la proteína filtrada de cultivo de 10 kDa (culture filtrate protein (*CFP-10*), por sus siglas en inglés) son dos antígenos dominantes (*CFP-10* es la chaperona de *ESAT-6*) para los linfocitos T durante los primeros estadios de la infección [14]. Como son

proteínas de bajo peso molecular, pertenecen a una gran familia de proteínas, la familia *ESAT-6*, que consta de 23 miembros. Los genes que codifican *ESAT-6* y *CFP-10* son *esx* (*Rv3875*) y *lhp* (*Rv3874*) respectivamente, ubicándose uno al lado del otro en el genoma de TB. Si se eliminan los genes codificadores de *ESAT-6* y *CFP-10*, da como resultado una disminución de la virulencia del patógeno; indicando que ambas moléculas pueden desempeñar un papel importante en la inmunopatogénesis y la virulencia [15]. Estudios recientes, dentro del área de genética y genómica, han revelado que *lhp*, *esx* y sus genes vecinos constituyen un grupo de genes denominados grupo 1 de *esx*. Se les dio ese nombre por localizarse en la Región de Diferencia 1 (RD1), los cuales codifican una función celular fundamental para la virulencia de Mtb [11,17]. *ESAT-6* es uno de los objetivos importantes para la inmunidad celular en la fase temprana de la TB, siendo una elección como biomarcador para realizar una detección oportuna y específica [17].

El uso de dispositivos POC en el tema de TB presenta una gran variedad de opciones investigadas y evaluadas a nivel clínico. A continuación, en la Tabla 1 se expone un resumen de las distintas propuestas para categorizar como dispositivo POC para el diagnóstico de TB junto con sus características principales.

Tabla 1 – Dispositivos para el diagnóstico de TB nivel clínico.

Dispositivo	Características	¿Usa nanotecnología?
Ensayo Xpert Mtb/RIF (rifampicina) usando aspirados de lavados gástricos (GLAs, sus siglas en inglés) [18].	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detecta el complejo de Mtb.</li> <li>- Duración: menor a 2h</li> <li>- Ensayo complementario.</li> <li>- No requiere entrenamiento técnico.</li> <li>- Para niños menores a y con 5 años.</li> <li>- Prueba de amplificación de ácido nucleico (NAA, sus siglas en inglés).</li> <li>- Muestra (GLA) se combina con el reactivo proporcionado para el ensayo.</li> <li>- Se realiza lectura con el equipo GeneXpert.</li> </ul>	No
Voltimetría de pulso diferencial con nanopartículas de oro	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detección electroquímica.</li> <li>- Señal medida por voltamperometría de pulso diferencial (DPV, siglas en inglés).</li> </ul>	Sí

(AuNPs, siglas en inglés) [19].	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ADN bicatenario se etiqueta con nanopartículas de oro (AuNPs) y se inmoviliza en las superficies de los electrodos de carbono para continuar con la medición electroquímica.</li> <li>- Detecta como mínimo una unidad formadora de colonias de Mtb, con excelente especificidad.</li> <li>- Para personas de bajos recursos.</li> </ul>	
Dispositivo de diagnóstico en papel con AuNPs colorimétricas [20].	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detecta la secuencia objetivo con 2.6 nM de Mtb extraída del paciente.</li> <li>- Duración: menor a 1 h.</li> <li>- Son AuNPs no modificadas y oligonucleótidos de detección monocatenarios.</li> <li>- La variación de color se recopiló y se concentró en papel de celulosa. Con la lectura de datos obtenidos, se transmiten y se comparan con los datos en la nube a través de un teléfono inteligente.</li> </ul>	Sí
Ensayo Xpert Mtb/RIF (rifampicina) usando mini lavado broncoalveolar (Mini-BAL, siglas en inglés) [21].	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detecta el complejo de Mtb.</li> <li>- Sencilla y de bajo costo.</li> <li>- Para pacientes con TB pulmonar.</li> <li>- Pacientes inmunocomprometidos.</li> <li>- Prueba de NAA.</li> <li>- La muestra de Mini-BAL se extrae con un tubo traqueal (50 cm), se agrega solución de NaCl (20 mL) y se extrae después de 10-15 min.</li> <li>- Muestra se combina con el reactivo proporcionado para el ensayo.</li> <li>- Se realiza lectura con el equipo GeneXpert.</li> </ul>	No
Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM, siglas en inglés) [22].	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detección de masa/piezoeléctrica.</li> <li>- Cambios en la carga gravitacional del sensor y las propiedades viscoelásticas de la muestra (con Mtb) causan un cambio de frecuencia del resonador de cristal de cuarzo.</li> <li>- La superficie de detección se modificó con un copolímero de estireno-butadieno-estireno como una imitación de la membrana que inmoviliza los Ac anti-Mtb en el sensor.</li> <li>- Límite de detección= <math>10^5</math> Unidades formadoras de colonias (UFC)/mL.</li> <li>- Posibles errores por la densidad, la viscosidad, la constante dieléctrica y la conductividad eléctrica de la muestra.</li> </ul>	Sí
Biosensor de resonancia magnética nuclear (RMN, siglas en inglés) [22].	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detecta Mtb desde 20 UFC/mL en una muestra de esputo sin procesar.</li> <li>- Duración: 30 min.</li> <li>- Es un ensayo de proximidad que detecta el cambio en masa en el tiempo de relajación spin-spin de las moléculas de agua circulantes. Cuando las NPs</li> </ul>	Sí

	<p>magnéticas recubiertas con Ac específicos se unen a los biomarcadores objetivo, genera el cambio de masa.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Consta de: matriz de microbobina, redes microfluídicas y electrónica NMR.</li> <li>- Versatilidad en muestra: sangre, orina o esputo (5-10 <math>\mu</math>L).</li> <li>- Costo: 200 USD.</li> </ul>	
<p>Ensayo de biosensores colorimétricos a base de nanopartículas (NCBA, siglas en inglés) para detectar los bacilos ácido-alcohol resistentes (AFB, siglas en inglés) [23].</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detecta grupo de bacterias visibles, preparadas en frotis y observadas a través de un microscopio óptico.</li> <li>- Duración: 10-20 min.</li> <li>- Costo: 0.10 USD por prueba.</li> <li>- Proceso simple.</li> <li>- Consiste en el aislamiento del AFB en las muestras de esputo a través de nanopartículas magnéticas recubiertas de glucano (GMNP, siglas en inglés) por interacción con AFB. Luego, usando un imán simple se separan el complejo GMNP-AFB. La solidez al ácido y las propiedades de grabación de las micobacterias se usan para proporcionar grupos de bacterias teñidas de rojo rodeadas de NPs de color marrón.</li> </ul>	<p>Sí</p>

La Tabla 1 muestra que existen pocos dispositivos con alta especificidad, la cual debe ser una de las características principales de un dispositivo POC. Además, ninguno de los dispositivos mencionados hace referencia al uso de proteínas de Mtb. El nanocomplejo por desarrollar se realizará mediante electrografting (más conocido por su traducción en inglés). Es una reacción electroquímica que permite depositar capas orgánicas a sustratos conductores sólidos. Consiste en un conjunto de reacciones que implican una transferencia de electrones entre el sustrato a modificar y el reactivo, pero también se agrega un reactivo reductor u oxidante para producir las especies reactivas [24].

Recientemente, se utiliza carbón vítreo como material para electrodos debido a su bajo costo de producción. La funcionalización de superficies de carbono se realizó por primera vez con pretratamientos en condiciones drásticas de electrólisis, donde las superficies se modificaron sin selectividad con una amplia variedad de grupos funcionales oxigenados. La falta de selectividad se mejoró, de forma parcial, con algunas estrategias de reducción de sales de arildiazonio, arilsulfonio y yodonio y de oxidación de aminas, alquinos y acetato de

arilo. También lograron estrategia de oxidación en presencia de alcoholes y alquil-trimetilsilanos, permitiendo incorporar una amplia variedad de grupos funcionales de acuerdo con las aplicaciones de interés. Se han generado reactivos intermedios como los radicales libres orgánicos  $sp^2$  y carbocationes, los cuales reaccionan con los átomos de carbono del electrodo para modificarlo covalentemente. De igual manera, los aniones orgánicos son susceptibles a oxidarse con el fin de producir radicales libres que se unirán covalentemente al electrodo [25-27]. Un ejemplo de las reacciones y de los productos que se forman durante el electrografting se expone en la Figura 2.1; se muestra la oxidación mediada por carboxilatos y la modificación de la superficie del carbono [25].

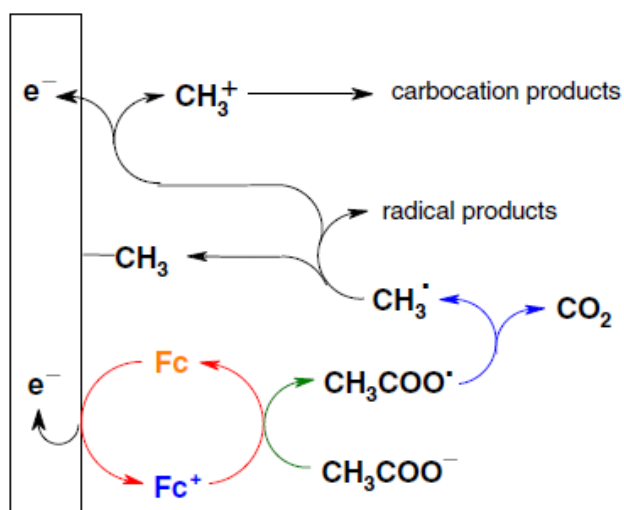


Figura 2.1 – Mecanismo químico durante modificación de superficie con carboxilatos [25].

Una característica peculiar dentro de las reacciones electroquímicas es la voltametría cíclica (CV, siglas en inglés). Es una medición electroquímica potenciodinámica. En un experimento de CV, el potencial del electrodo, en este caso de carbón vítreo, se incrementa linealmente en función del tiempo. Después de alcanzar el potencial que se establece, el potencial del electrodo de trabajo se incrementa, pero en la dirección opuesta para volver al potencial inicial. Estos ciclos de rampas se pueden repetir las veces necesarias. La corriente en el electrodo de trabajo se traza frente al voltaje aplicado al mismo. Un ejemplo del gráfico que



se obtiene se muestra en la Figura 2.2 a). La gráfica se puede desplazar hacia arriba, hacia abajo o hacia alguna parte lateral, dependiendo de las condiciones que se establezcan al inicio. Su forma se hace referencia a un patito de hule como se observa en la Figura 2.2 b). En algunas ocasiones, se busca eliminar los picos presentes o ampliarlos, ya depende del interés que se tenga. La CV se usa para el estudio de propiedades electroquímicas de un analito en solución o de alguna molécula que se deposita en el electrodo [28].

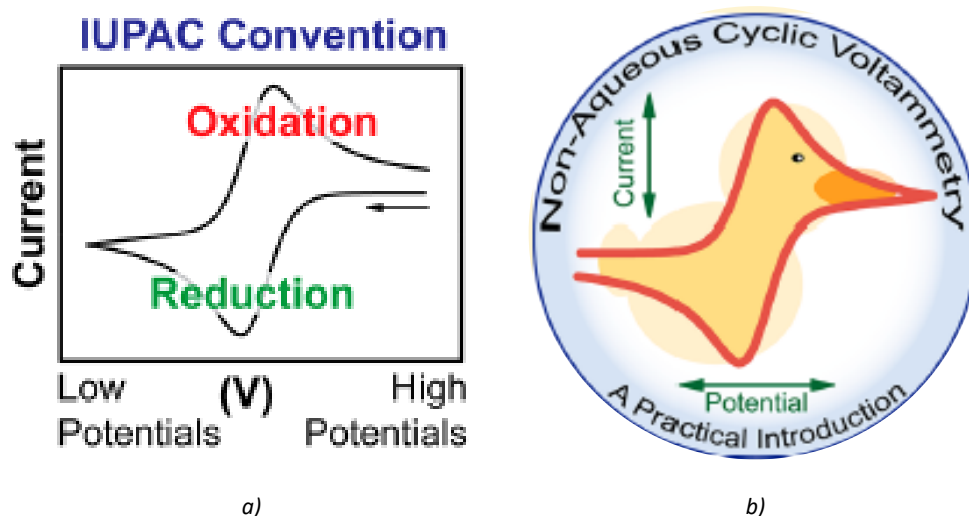


Figura 2.2 – Gráfico a) de CV en nomenclatura IUPAC (forma estándar). b) en forma de patito de hule, referencia base durante el electrografting. [28]

## 2.2. Planeación y seguimiento del proyecto

- Descripción del proyecto

El proyecto se dividió en dos partes, la primera requirió el uso de técnicas biotecnológicas para la obtención de las proteínas recombinantes (*HspX* y *ESAT-6/CFP-10*); para confirmar su producción correcta y que estén purificadas y dializadas. Se realizó en los laboratorios de CIATEJ, unidad de biotecnología médica y farmacéutica. La segunda parte consistió en emplear técnicas nanotecnológicas para el electrografting de las proteínas recombinantes en un electrodo de carbón vítreo. Se requirieron métodos de caracterización para corroborar la presencia de las proteínas de interés depositadas sobre el

electrodo. Fue necesario hacer uso del laboratorio de electroquímica del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI).

### 1ª Parte: Proteínas recombinantes

- Preinoculación de *Escherichia coli* (*E. coli*)

Para la preparación de *E. coli* recombinante, se dividió en dos etapas. La primera se basó en la reactivación de la cepa que mantiene al plásmido desde donde se da la producción de la proteína recombinante de interés. La segunda consistió en la inoculación en medio líquido de una colonia aislada de *E. coli* recombinante de la etapa anterior. La Figura 2.3 muestra el diagrama que explica los pasos realizados dentro de cada etapa.

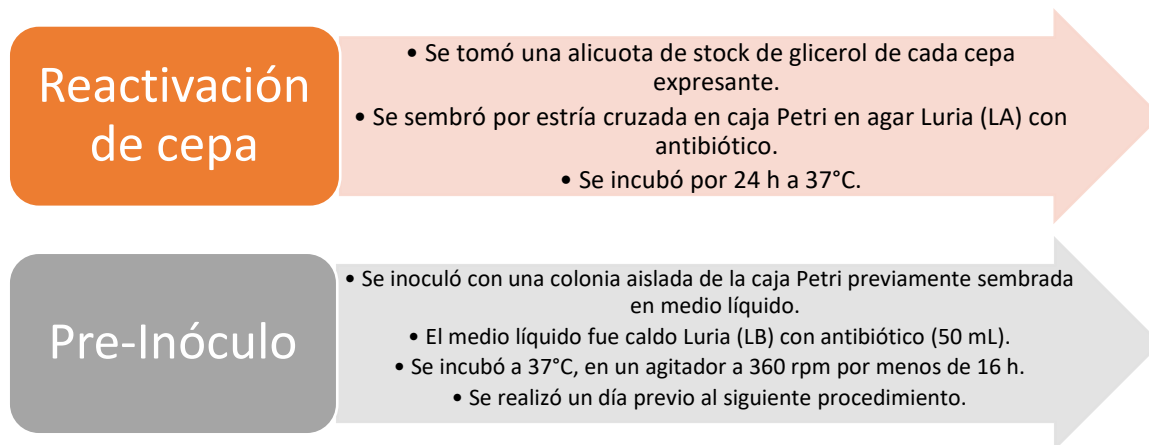


Figura 2.3 – Diagrama con los pasos generales de Preinoculación de *E. coli*.

Las técnicas empleadas son la siembra por estría cruzada y la inoculación en medio líquido. Cuando se inocula un medio (cualquier agar en caja Petri), lo que se busca es que las células formen colonias que queden separadas individualmente. Dentro del período de incubación, las células microbianas individuales comienzan a reproducirse hasta producir masas visibles (colonias) [29]. Es muy importante realizar un número alto de estrías. En las primeras aparecerá una masa continua de microorganismos (colonias confluentes). En las estrías finales deberán aparecer colonias separadas unas de otras. La sucesiva

disminución del tamaño de la población sobre el asa cada vez que recorre el medio de cultivo, debe asegurarse que queden células lo suficientemente separadas [30].

En la Figura 2.4 se observa el esquema general que se debe realizar durante siembra por estría cruzada. Previo a las primeras estrías, es necesario esterilizar el asa bacteriológica, abrir el cultivo microbiano (generalmente está en un tubo), se flamea la boca del tubo antes y después de introducir el asa. Después, comienza la siembra y entre cada conjunto de estrías, es necesario esterilizar el asa (la palabra flamear del esquema hace referencia a ello). El inóculo que se utiliza posteriormente a la primera siembra se toma del área de siembra previa a la que se sembrará [29].

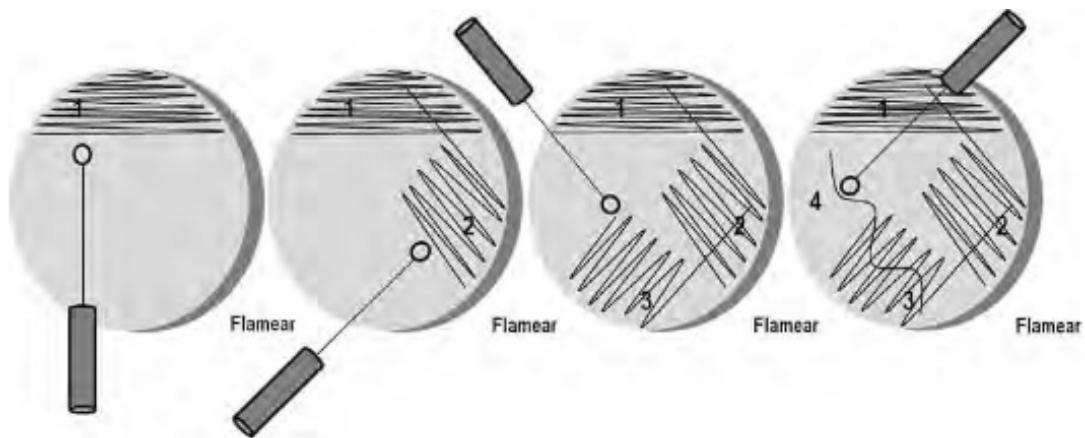


Figura 2.4 – Procedimiento general de siembra por estría cruzada [32].

Por otro lado, la inoculación en un medio líquido (caldo) no permite visualizar colonias y pueden servir para incrementar la concentración del microorganismo inoculado. Sin embargo, el crecimiento microbiano también se podrá diferenciar por la forma de crecimiento de cada microorganismo [31].

En la Figura 2.5 se muestra paso a paso la técnica de inoculación en medio líquido. Se requiere obtener previamente el inóculo del microorganismo de interés, como se mencionó en la técnica anterior. En la Figura 2.5 1) se flamea la

boca del tubo por inocular, Figura 2.5 2) se introduce el asa con el inóculo al tubo y se agita ligeramente en círculos, Figura 2.5 3) se retira el asa y se flamea nuevamente la boca del tubo, Figura 2.5 4) se cierra el tubo y Figura 2.5 5) se esteriliza el asa [33].

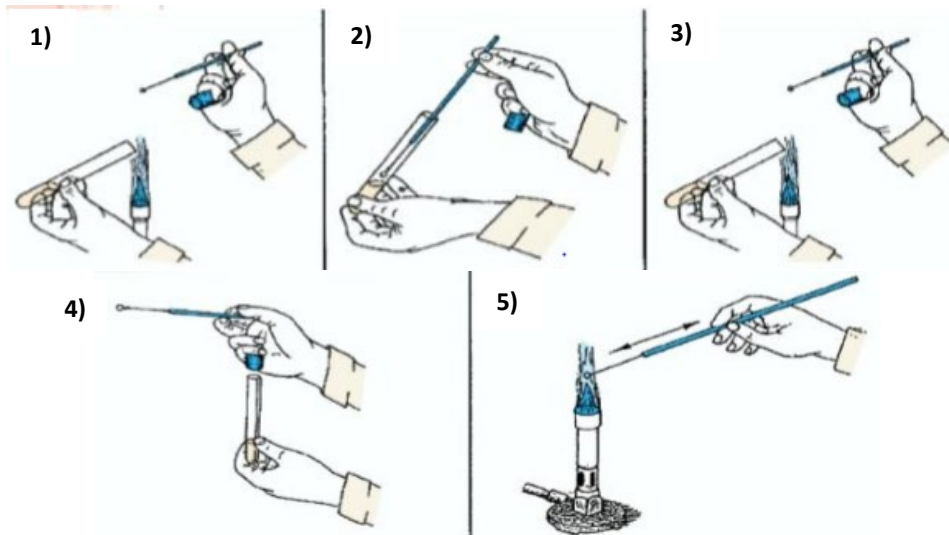


Figura 2.5 – Procedimiento general de inoculación en medio líquido [33].

#### - Cinética microbiana

Este procedimiento se basa en la cinética de crecimiento microbiano y su densidad óptica (OD, siglas en inglés). Cuando las bacterias se inoculan en un medio líquido, es posible contar la población celular en intervalos de tiempo. Esto permite trazar una curva típica de crecimiento bacteriano, que muestra su crecimiento a lo largo del tiempo (Figura 2.6). Existen cuatro fases distintas: de adaptación (Lag), logarítmica o exponencial, estacionaria y de muerte. En este caso, se enfocó en la fase estacionaria [34].

- Fase estacionaria (Figura 2.6): el crecimiento y la muerte celular se encuentran en equilibrio, por lo que no hay aumento neto en el número de células.

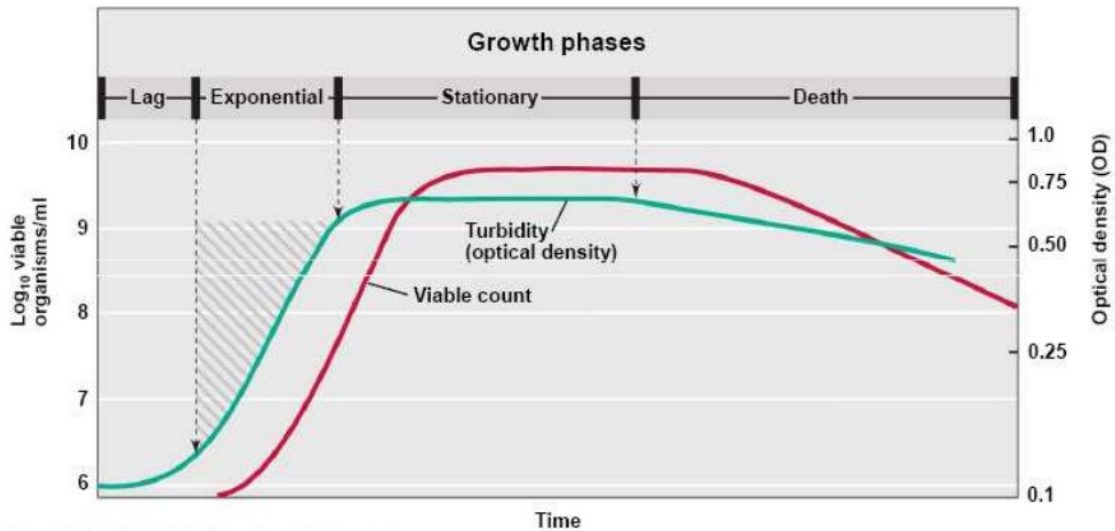


Figura 2.6 – Gráfico de crecimiento microbiano estándar por fases [35].

Por otro lado, la OD se midió a través de un lector de placas y en una placa de 96 pozos. El lector de placa se basa en el principio del espectrofotómetro, el cual se basa en la absorción de radiación electromagnética en la zona ultravioleta (UV) y del visible (Vis). La muestra de interés absorbe una parte de la radiación incidente y promueve la transición a un estado excitado; transmitiendo un haz de menor energía radiante. Se mide la cantidad de luz absorbida como función de la longitud de onda aplicada. La absorción dependerá de la estructura de las moléculas, siendo lo particular de cada muestra [36]. En la Figura 2.7 se describen los componentes del espectrofotómetro y la dirección en el que haz incide sobre la muestra durante su lectura.

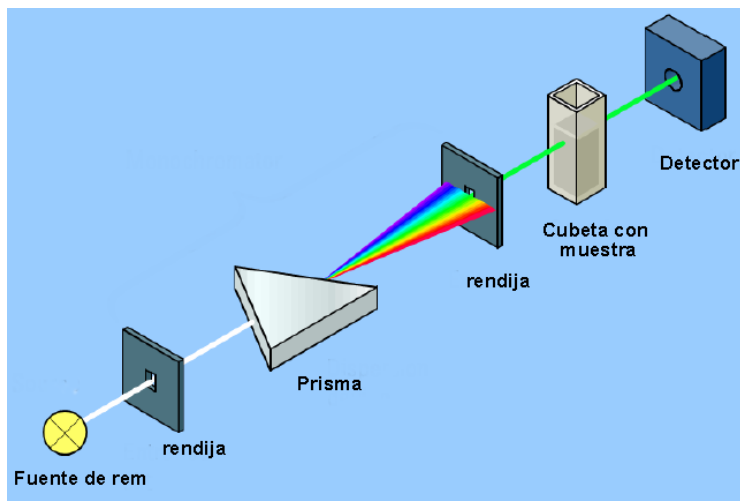


Figura 2.7 – Componentes básicos de un espectrofotómetro [37].

En este procedimiento se inocularon 15 mL del preinóculo a un matraz Erlenmeyer con medio LB y antibiótico (500 mL); volviendo a colocarlo en un agitador a 37°C. Se utilizó como blanco el medio de cultivo preparado y se realizaron réplicas (3) tanto del blanco como de cada medio de cultivo inoculado. La medición fue a 600 nm en el lector de placa (Figura 2.8), hasta que la OD se encontrara entre 0.5-0.6. Para comenzar la inducción de las proteínas de interés (duración= 5 h) y obtener las pastillas de microorganismos después de las dos rondas en la centrifuga a 4°C, 10,000 rpm por 20 min cada una (Figura 2.9).



Figura 2.8 – Lector de placas de 96 pozos marca BIO-RAD [38].



Figura 2.9 – Centrifuga para Tubos Falcon con temperaturas de trabajo de 4°C y -20°C [39].

#### - Extracción de proteínas

Se utilizó sonicación para inducir la lisis para romper partes de la pared celular, o hasta la célula completa. Este procedimiento tiene como objetivo el liberar las moléculas de interés, en este caso son las proteínas recombinantes. Los homogeneizadores ultrasónicos (Figura 2.10) son los instrumentos más usados para lisar correctamente los microorganismos. En estos equipos, la intensidad ultrasónica se puede nivelar ajustando los parámetros; la intensidad óptima dependerá de la estructura o composición del objetivo por lisar [40].

En términos generales, la lisis de las muestras se puede realizar por no más de 2 min, en este caso se aplicaron periodos de 10 s de sonicación con 40 s de descanso. Como la intensidad de la sonicación es fácil de ajustar tanto su amplitud como tiempo de sonicación en base al equipo que se usa, es posible alterar las membranas celulares suave o abruptamente. Todo ello dependerá de la estructura celular y del propósito de la lisis; en este caso para la extracción completa de las proteínas de las bacterias se requirió una intensa sonicación

(entre 5 y 6). La temperatura también debe controlarse para no afectar el estado de las proteínas, por lo que se realizó en un baño de hielo [41].



Figura 2.10 – Sonicador Q500 para lisis y extracción de proteínas [42].

- Purificación: Cromatografía en columna por afinidad

La purificación de proteínas marcadas con una etiqueta de 6 histidinas (6xHis) no sufren cambios si se realiza por cromatografía de afinidad con resina cargada de níquel (Ni-NTA, siglas en inglés) (Figura 2.11). Se puede realizar en condiciones nativas o desnaturizantes y no se ve afectada por problemas de insolubilidad. Principalmente se aplica para *E. coli* recombinante, ya que permite obtener proteína purificada hasta del 80% [43].



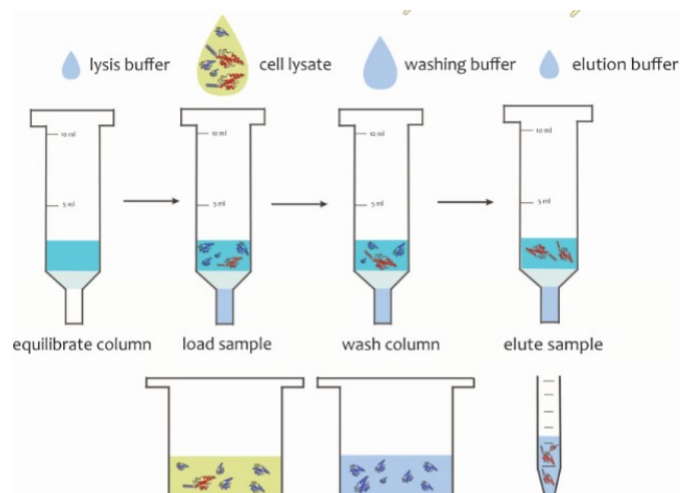
Figura 2.11 – Kit de Resina de Ni-NTA HisPur Thermo Fisher Scientific [44].



La cromatografía de afinidad separa proteínas con base en su especificidad de fijación de ligandos. Los ligandos son moléculas poliméricas unidas covalentemente sobre la columna cromatográfica con estructura de poro abierta y presentan estabilidad en condiciones de cambio de pH, a la presencia de detergentes y agentes que disocian; con el fin de retener y adsorber específicamente a las proteínas de interés. Pueden ser clasificados respecto a su naturaleza química o por su selectividad, de igual manera, pueden ser Ac (específicos) o lectinas (generales). La cromatografía de afinidad tiene la ventaja de ser altamente selectiva para la retención de proteínas afines a la columna, en este caso fue la resina Ni-NTA. Además, de emplear sistemas de baja presión, columnas cortas (flujo por gravedad) y un campo restringido donde ocurre la separación [45].

En la Figura 2.12 se muestran los cuatro pasos importantes dentro de la cromatografía por afinidad. Los cuales son [43,45]:

- a) Equilibrar columna de trabajo previo a la purificación.
- b) Agregar el lisado con las proteínas.
- c) Lavado de la columna con buffer de lavado 1X, para eliminar endotoxinas.
- d) Obtener las proteínas retenidas en la resina a través del buffer de elución.



FO-DGA-C. *Figura 2.12 – Esquema general de la purificación por cromatografía por afinidad [46].*

- Electroforesis (Gel de Poliacrilamida) / Análisis SDS-PAGE

La técnica de la electroforesis en gel de poliacrilamida es una técnica básica de Biología Molecular. Permite la separación de una mezcla de proteínas respecto a su peso molecular. Su fundamento físico tiene cierta complejidad, pero se puede resumir en la separación de proteínas en un campo eléctrico. Para ello se requieren dos fuerzas opuestas: una que será un campo eléctrico que va a provocar la movilidad de la proteína en base a su carga, y la otra será un soporte sólido que va a retenerla en base a su interacción respecto a su tamaño [47].

Se compone de un gel separador y un gel concentrador. La separación de las proteínas ocurre en el gel separador a un pH 8.8. Antes de que las proteínas entren en el gel separador, está el gel concentrador a pH 6.8; evitando que las proteínas se dispersen y manteniéndolas alineadas en una fina banda que entra al mismo tiempo y a la misma velocidad en el gel concentrador. La placa con los dos geles se introduce en un dispositivo que tiene un cátodo y un ánodo en donde se aplica el campo eléctrico a través de un diferencial de potencial (voltaje) [47]. Su funcionamiento general se muestra en la Figura 2.13, la muestra (color azul) se carga en un pozo del gel y al momento de aplicar el voltaje, ocurre el desplazamiento de arriba hacia abajo.

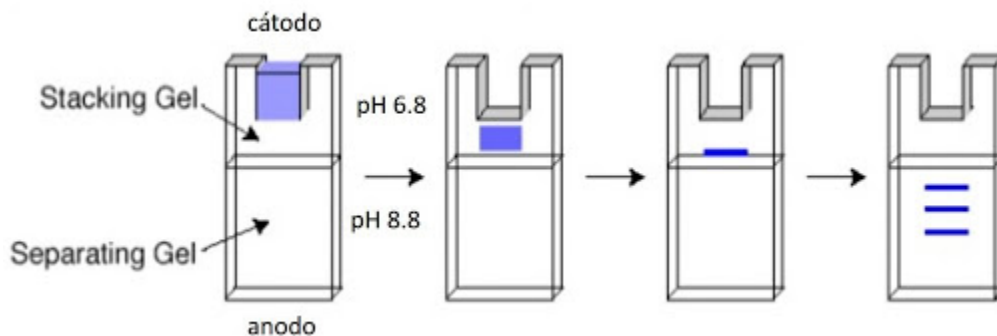


Figura 2.13 – Desplazamiento de la mezcla de proteínas en base a su peso molecular [47].

Uno de los métodos de electroforesis más aplicado para proteínas recombinantes que emplea geles de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE, siglas en inglés) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS, siglas en inglés). Se conoce como análisis SDS-PAGE y se prepara el gel en placa vertical [48]. Se realizó este procedimiento ya que se utilizó buffer de carga 2X para cargar las muestras, el cual uno de sus componentes es SDS al 2%. El kit BIO-RAD de celda de electroforesis vertical Mini-PROTEAN (Figura 2.14) se empleó para los geles realizados posterior a la purificación y a la diálisis.



*Figura 2.14 – Kit de Electroforesis completo marca BIO-RAD [49].*

#### - Diálisis

Es una forma de filtración molecular. Durante este procedimiento se separan las moléculas de acuerdo con su tamaño, a través de membranas semipermeables que contienen poros de dimensiones específicas. Estos poros permiten que moléculas de cierto tamaño como las de disolventes, sales y metabolitos pequeños logren difundirse a través de la membrana; bloqueando el tránsito de moléculas mayores a las dimensiones de los poros. Una disolución macromolecular de interés se introduce en la membrana de diálisis (Figura 2.15), que se sumerge en un volumen grande del disolvente nuevo. Las moléculas

pequeñas cruzan la membrana al fluido externo hasta llegar al equilibrio. Las macromoléculas permanecerán en el interior de la membrana. El proceso se repite las veces necesarias, para sustituir gran parte del disolvente anterior con el nuevo [50,51].

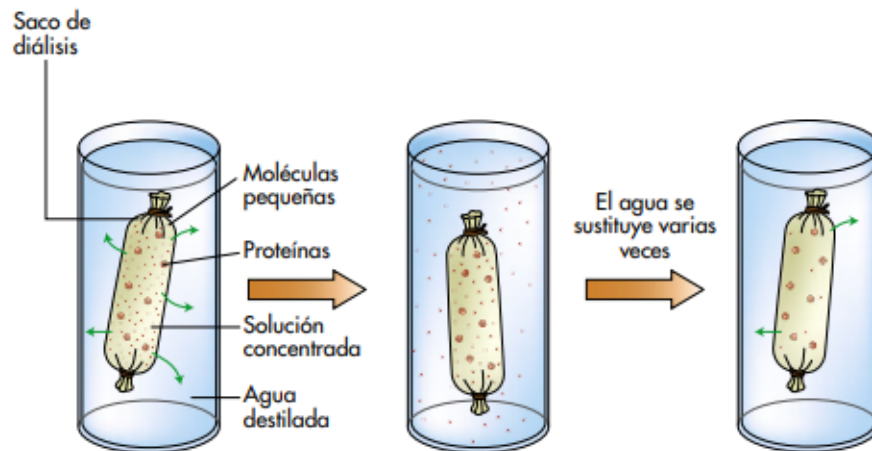


Figura 2.15 – Esquema general del procedimiento de diálisis [51].

La diálisis realizada para las proteínas de Mtb duró 28 h y la membrana de diálisis empleada fue la membrana de nombre comercial piel de serpiente (SnakeSkin, nombre en inglés), de corte con peso molecular de 3.5 KDa (3.5K MWCO, por sus siglas en inglés) con diámetro de 22 mm [52]. El disolvente nuevo fue PBS 1X, se prepararon 3 L y se realizaron dos cambios (cada uno con 2 h de diferencia). Se mantuvo el sistema a una temperatura de 4°C, con un baño de hielo y bolsas refrigerantes.

#### - Western Blot (WB)

Técnica analítica para la detección de proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee; puede ser por peso molecular o su estructura. Luego se transfieren a una membrana adsorbente como de nitrocelulosa o PVDF; para poder buscar la proteína de interés con Ac específicos

de la proteína. Finalizando, con la detección por la unión Ag-Ac debido a la actividad enzimática, fluorescencia, entre otras técnicas, permitiendo identificar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad parcial respecto a las demás proteínas presentes [53,54].

Su detección ocurre después de un lavado de la membrana para eliminar los Ac no unidos. En el caso de una detección por colorimetría utilizan un Ac secundario conjugado a un enzima (sea peroxidasa o fosfatasa alcalina). La enzima convierte el colorante en un producto insoluble y visible en la membrana. La cantidad de colorante que se observe es proporcional a la cantidad en la muestra. Un ejemplo de WB finalizado se muestra en la Figura 2.16, está la membrana con las proteínas separadas en la electroforesis, de las que sólo se disciernen las que tienen Ac unidos [54].

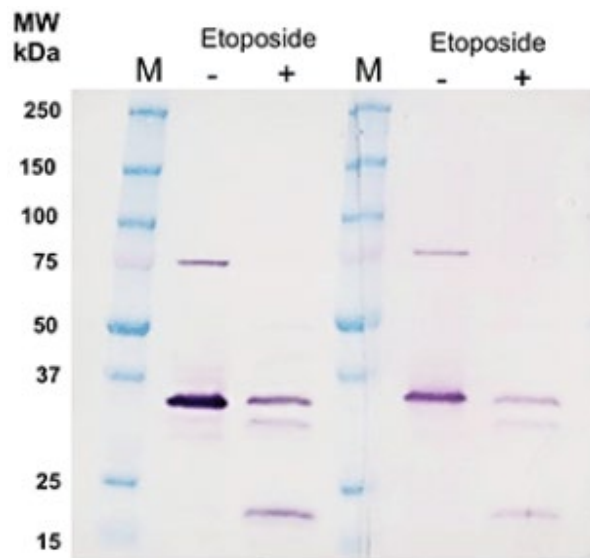


Figura 2.16 – Ejemplo de la membrana al finalizar el WB [53].

El WB que se realizó de dos maneras, una se aplicaron Ac primario y Ac secundario. La otra solamente se utilizó Ac secundario, debido a fallas en la primera prueba, hasta que la segunda mostró los resultados correctos. La

cámara de electro transferencia utilizada es la célula de transferencia semiseca Trans-Blot SD (Figura 2.17) por 1.5 h a 200 mA, a una membrana de nitrocelulosa.



Figura 2.17 – Cámara de electrotransferencia semiseca [55].

Una variación de este método es el Dot Blot (DB), es más sencillo aplicar directamente una pequeña gota de la muestra sobre la membrana. La absorción de la gota provoca la adhesión de la proteína a la membrana, quedando en forma de una mancha o dot (de ahí su nombre). Se aplica succión para facilitar la penetración de la solución (sistema y bomba de vacío). La proteína se absorbe en forma de una gota circular (Figura 2.18) debido a la plantilla de muestra [56].

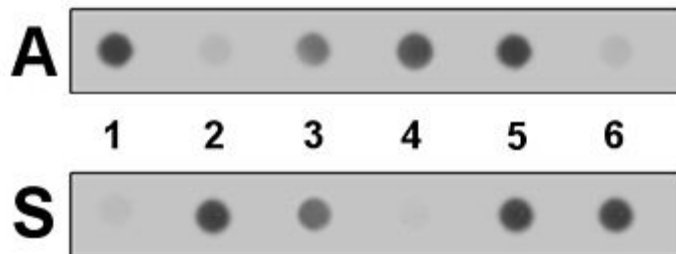


Figura 2.18 – Ejemplo de DB de  $\beta$ -globina [57].

El DB que se realizó fue con ayuda del aparato de microfiltración Bio-Dot (Figura 2.19). Se requirió de una bomba de vacío y un sistema de filtrado de residuos. La configuración utilizada es la que se observa en la Figura 3 y se aseguró que el dispositivo estuviera correctamente sellado para su uso posterior. Se trabajó con 200  $\mu$ L de muestra de proteínas y de controles. Después de la absorción en la membrana, se retiró la membrana y se prosiguió con el procedimiento de revelado del WB.

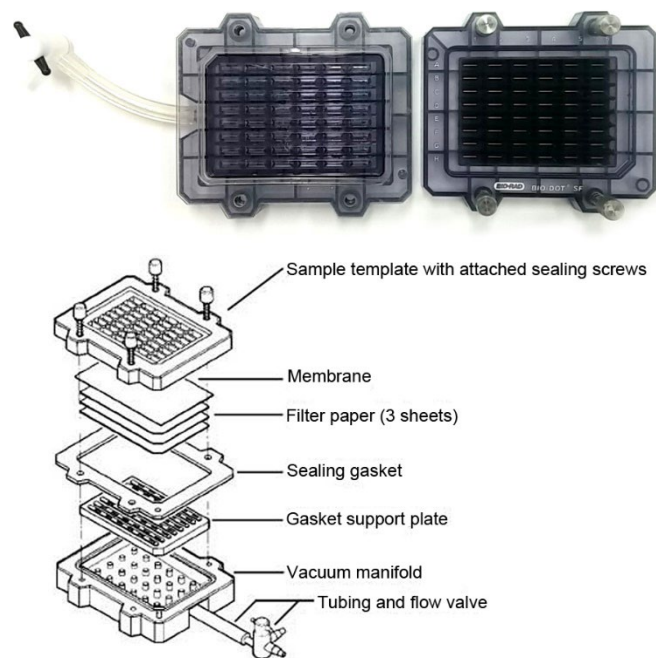


Figura 2.19 – Esquema de ensamble del kit BIO-RAD [58].

#### - Cuantificación de proteínas

La cuantificación exacta de proteínas es fundamental en temas de investigación. Existen diferentes métodos para cuantificar proteínas totales, o de alguna en específico. Los métodos que cuantifican proteínas totales a través de la absorbancia a 280 nm con los ensayos de Bradford y el ácido bicinonínico (BCA, siglas en inglés). Los métodos alternativos son Lowry o los ensayos desarrollados

por proveedores comerciales. Los métodos para cuantificar proteínas específicas son ELISA, WB, espectrometría de masas, entre otros [59].

El ensayo de BCA se basa en la conversión de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  a condiciones alcalinas; se conoce como la reacción de Biuret. Esta reacción es influenciada por cuatro aminoácidos (aa): cisteína, cistina, tirosina y triptófano. Además de la presencia de una cadena peptídica. El BCA es un reactivo cromogénico para  $\text{Cu}^{1+}$ . La cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  reducido se basa en la concentración de proteínas y puede ser determinada por espectroscopia (a 562 nm) por el cambio de color a violeta-rosado. Puede ser estimada a través de una comparación con un estándar de proteína como la albúmina sérica bovina (BSA, sus siglas en inglés). Su límite de detección está dentro del intervalo de 20-2000  $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ . En la Figura 2.20 se muestra que la reacción ocurre en dos etapas, en la primera existe la interacción entre la proteína con el  $\text{Cu}^{2+}$  y que depende de la temperatura; desprendiendo un ion  $\text{OH}^-$ . La segunda etapa dos moléculas de BCA interaccionan con el  $\text{Cu}^{1+}$  proveniente de la primera etapa, formando el complejo  $\text{BCA-Cu}^{1+}$ . Lo que relaciona la cantidad de proteína con el número de complejos [59,60].

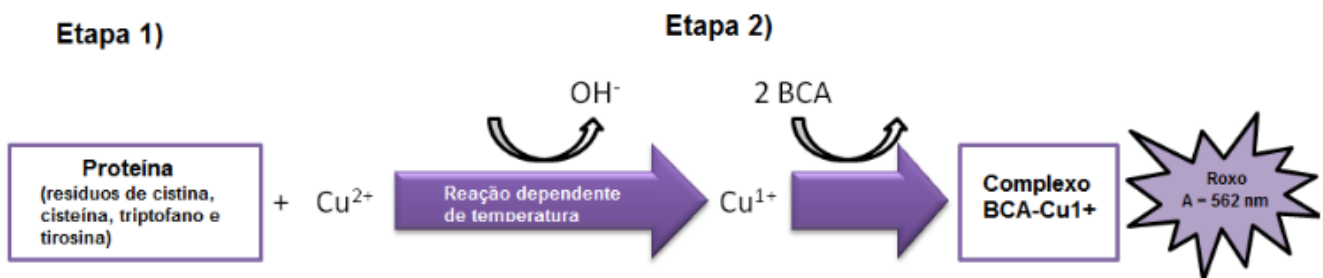


Figura 2.20 – Mecanismo de reacción del ensayo de BCA [60].

El ensayo de Bradford se fundamenta en la formación del complejo entre el colorante azul brillante de Coomassie G-250 y las proteínas. El colorante libre se encuentra en cuatro formas iónicas, la más aniónica se une a las proteínas. Esto provoca un cambio espectral de la forma rojiza/marrón (absorbancia máxima a 465 nm) y la forma azul (absorbancia máxima a 610 nm), por lo que, se mide a



595 nm. Por ello, presenta una pérdida de aproximadamente 10% en la cantidad medida de color (absorbancia) y se reflejará en el valor de concentración estimada de la proteína. El colorante se une a residuos de aa como arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina. Su límite de detección está dentro del intervalo de 20-2000  $\frac{\mu g}{mL}$ . Se utiliza BSA como estándar proteico, pero no es del todo adecuada porque produce una fuerte tinción con el colorante, provocando posibles resultados erróneos. Se recomienda usar entre inmunoglobulina G (IgG) o lisozima, en el caso de estar disponible alguno de los dos [59,60].

La Figura 2.21 muestra la interacción de la proteína con el azul brillante de Coomassie G-250 para formar el complejo proteína-Coomassie, que se relaciona con la concentración de proteínas presentes; entre mayor complejo formado, mayor la intensidad en el color.



Figura 2.21 – Mecanismo de reacción del ensayo de Bradford [60].

El ensayo de BCA fue realizado con el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce marca Thermo Fisher Scientific (Figura 2.22 a)) y se realizó una vez para las primeras proteínas purificadas y dializadas. El ensayo de Bradford se usó el kit de ensayo Pierce Coomassie Plus (Bradford) igual de marca Thermo Fisher Scientific y se realizó dos veces en las segundas proteínas purificadas y dializadas (Figura 2.22 b)).



a)



b)

Figura 2.22 – Kit Thermo Fisher Scientific de a) Ensayo de BCA b) Ensayo de Bradford [61,62].

- Plan de trabajo

La organización y estructura de trabajo durante el periodo de primavera 2020 para el desarrollo de este proyecto se muestra en la Tabla 3. Se optó por el uso de un cronograma para visualizar adecuadamente las actividades realizadas, las reuniones agendadas y los seminarios asistidos. Además, de identificar recursos humanos, económicos, tecnológicos y materiales utilizados.

Las abreviaturas utilizadas en el cronograma, para hacer referencia sobre los recursos utilizados en cada actividad realizada se encuentran en la Tabla 2. Los recursos que se utilizaron fueron dentro de las instalaciones del CIATEJ y de los laboratorios de CUCEI.

Tabla 2 - Abreviaturas de recursos utilizados en el proyecto.

Recursos					
Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
AM	Asesor Dr. Mario Flores	CG	Centrifugadora	CM	Cultivos de microorganismos
AA	Asesora Dra. Adriana Vallejo	R4	Refrigerador a 4°C	AS	Agitador a 37°C

AW	Asesora M.C. Wendy López	C20	Congelador a -20°C	AP	Agitador de placa
AT	Asesora M.C. Andrea Trujillo	SN	Sonicador	SD	Sistema de diálisis
AF	Asesor Fermín Castro	CI	Columnas para IMAC	FT	Fotodocumentador
TN	Trabajo individual	KE	Kit BIO-RAD para gel de acrilamida	EE	Equipo de electrodeposición
CF	Campana de flujo laminar	EB	Ensayo de Bradford	EX	Expositores
AT	Autoclave	KB	Kit Thermo Fisher Scientific para ensayo de proteínas		
LC	Lector de placas	CE	Cámara de electro-transferencia		
IB	Incubadora a 37°C	KD	Kit BIO-RAD para Dot-Blot		

Tabla 3 - Cronograma de actividades del PAP I en el periodo primavera 2020.

Actividad	Recurso	Tiempo (días)	Enero		Febrero			Marzo				Marzo-Abril	Abril		Mayo		
			Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15
<b>Planificación</b>																	
Reuniones	AM, AW, AA, AF	3															
Explicaciones de procesos	AW, AT	1															
Revisión bibliográfica	AM, TN	2															
Revisión de protocolos y manuales	AW, TN, AT	1															
<b>Técnicas biotecnológicas</b>																	
Plaquear en cajas Petri	CF, TN, AW	1															
Esterilización por autoclave	AT, TN, AW	1															
Reactivación de cepa y preinóculo	CF, AW,	1															

	TN, CM, IB, AS																	
Cinética microbiana	CF, AW, TN, CM, IB, AS, CG, C20, LC	1																
Extracción de la proteína	CG, C20, SN, AW, TN	1																
Regeneración de columnas	AW, CI, TN	1																
Purificación de proteína recombinante	AW, CI, TN	2																
Electroforesis (geles de acrilamida)	AW, KE, AP, FT, TN	1																
Diálisis	AW, SD, TN	2																
Cuantificación de proteínas	AW, EB, KB, LC, TN	1																
Análisis SDS-PAGE	AW, KB, AP, FT, TN	1																
Western Blot	AW, KE, CE, FT, TN	1																
Dot Blot	TN, KD	1																
<b>Técnicas nanotecnológicas</b>																		
Electrodeposición	AT, EE, TN	1																
<b>Actividades Complementarias</b>																		
Seminarios	EX	1																

- Desarrollo de propuesta de mejora

Las evidencias obtenidas de la primera parte del proyecto conciernen a la obtención y confirmación de las proteínas *ESAT-6/CFP-10* y *HspX* purificadas y dializadas. Los primeros resultados para confirmar que se tienen las proteínas correctas son los geles de poliacrilamida después del procedimiento de purificación.

El gel de la proteína *ESAT-6/CFP-10* permitió observar gran presencia entre las bandas del marcador 20 y 15 kDa; la ubicación correcta para dicha proteína. El orden de las muestras en el gel de dicha proteína se presenta en la Tabla 4. En el gel de la proteína *HspX*, confirmó su presencia entre las bandas 15 y 10 kDa; siendo las correspondientes para dicha proteína. El orden las muestras cargadas del gel de dicha proteína se indican en la Tabla 5. Lo que nos determinó que las eluciones I a III son las que contenían mayor cantidad de proteína eluida durante el procedimiento de purificación; las cuales fueron seleccionadas para ser dializadas.

**Tabla 4 – Orden de carga de muestras en gel de poliacrilamida de la proteína *ESAT-6/CFP-10*.**

Pozo1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4	Pozo 5	Pozo 6	Pozo 7	Pozo 8	Pozo 9	Pozo 10
Marcador de peso molecular	Extracto de pellet	Lisado restante	Detergente ASB-14	Solución Tris-HCl (segunda vuelta)	Elución I	Elución II	Elución III	Elución IV	Elución V

**Tabla 5 – Orden de carga de muestras en gel de poliacrilamida de la proteína *HspX*.**

Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4	Pozo 5	Pozo 6	Pozo 7	Pozo 8	Pozo 9	Pozo 10
Marcador de peso molecular	Extracto de pellet	Lisado restante	Detergente ASB-14	Solución Tris-HCl (segunda vuelta)	Elución I	Elución II	Elución III	Elución IV	Elución V

Después del procedimiento de dializado, se realizaron el análisis SDS-PAGE, la técnica WB y DB. En el análisis SDS-PAGE, se confirmó la adquisición de las proteínas *ESAT-6/CFP-10* y *HspX* purificadas y dializadas, para su aplicación en la siguiente etapa. Respecto al WB, por el momento se ha confirmado la presencia de la proteína *ESAT-6/CFP-10* por la coloración morada que se observa y en su respectiva posición por peso molecular. Sin embargo, no se observó coloración en el pozo de *HspX*. Se

optó para confirmar de forma más pronta el realizar un DB, permitiendo observar coloración rojiza en el pozo de la proteína. Por otra parte, la cuantificación de las proteínas por método de Bradford permitió determinar la concentración ( $\frac{mg}{mL}$ ) de cada proteína. La gráfica (Figura 2.23) utilizó como estándar albúmina de suero bovino (BSA), presentando un coeficiente de determinación aceptable ( $R^2=0.9869$ ) y determinando que las concentraciones correspondientes son  $0.563 \frac{mg}{mL}$  de la proteína ESAT-6/CFP-10 y  $0.614 \frac{mg}{mL}$  de la proteína HspX.

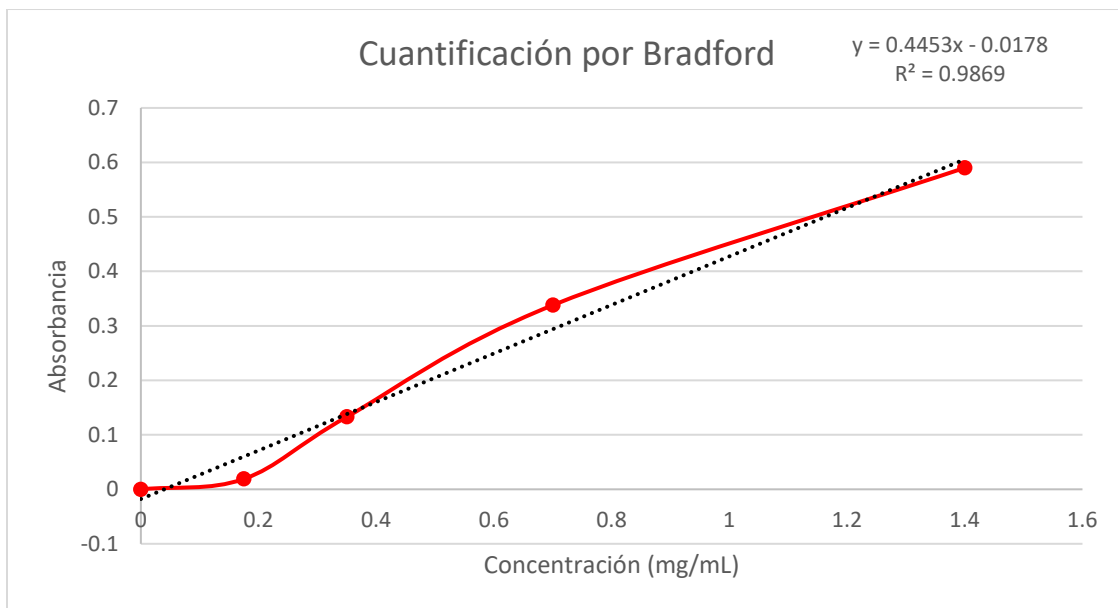


Figura 2.23 – Gráfico de la cuantificación por método de Bradford.

La propuesta de mejora que se ha definido para finalizar la primera parte del proyecto es repetir nuevamente el WB, para obtener la confirmación de las dos proteínas en una sola membrana. Además, de realizar el análisis de los datos de las dos técnicas empleadas para la cuantificación de las proteínas, que son BCA y Bradford, con el fin de obtener las concentraciones que se tienen en cada tubo de cada proteína. Finalmente, precipitar pastillas con ácido tricloroacético (TCA) de ambas proteínas.

Como complemento, se comenzará la segunda parte con el análisis de las pastillas precipitadas. Se caracterizará con microscopia de fluorescencia y espectroscopía Raman, para la obtención del blanco con el que se comparará los electrodos de carbón vítreo ya modificados. Se realizarán las primeras pruebas de electrografting con las proteínas en el medio de buffer fosfato salino (PBS) 1X a pH 7.4, con el fin de determinar si se están o no depositando las proteínas y establecer qué factores pueden estar interviniendo.

### 3. Resultados del trabajo profesional

Los productos y resultados obtenidos dentro de esta primera parte del proyecto; enfocándose en los objetivos de las proteínas recombinantes, principalmente, su extracción, purificación y confirmación. Los dos primeros productos obtenidos fueron dos geles de acrilamida de las proteínas recombinantes extraídas y ya purificadas. Estos geles contienen 20  $\mu$ L del lisado (posterior a la purificación) y de muestras tomadas durante algunos pasos del proceso de purificación de cada proteína recombinante. Las Figura 3.1 y Figura 3.2 son los geles respectivos de las proteínas ESAT-6/CFP-10 y HspX, que permiten identificar de forma visual, la presencia de la proteína dentro de algunas etapas de la purificación. Además, de forma cualitativa, señala en que eluciones se encuentra la mayor cantidad de proteína; con el fin de dializar esas eluciones.

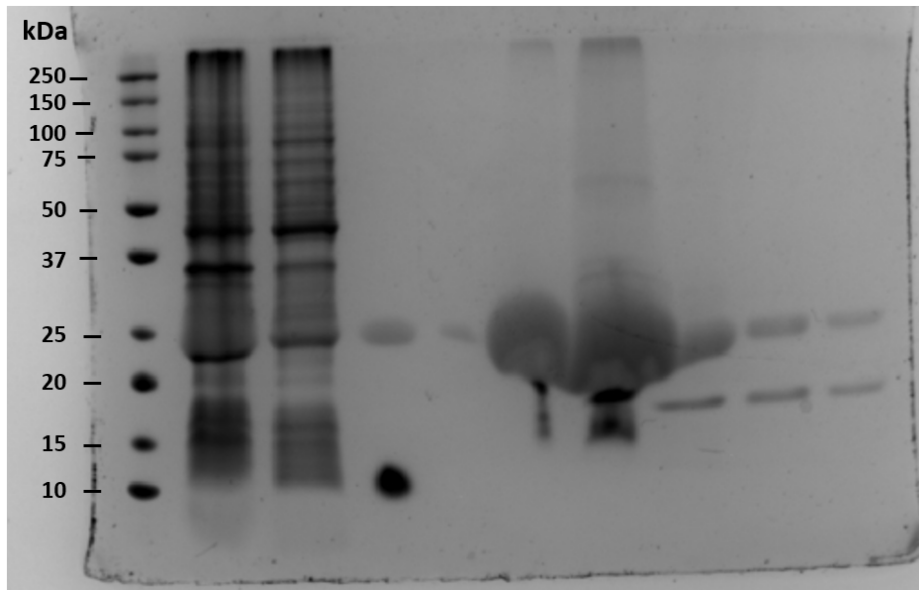


Figura 3.1 – Gel de poliacrilamida después de la purificación de la proteína ESAT-6/CFP-10.

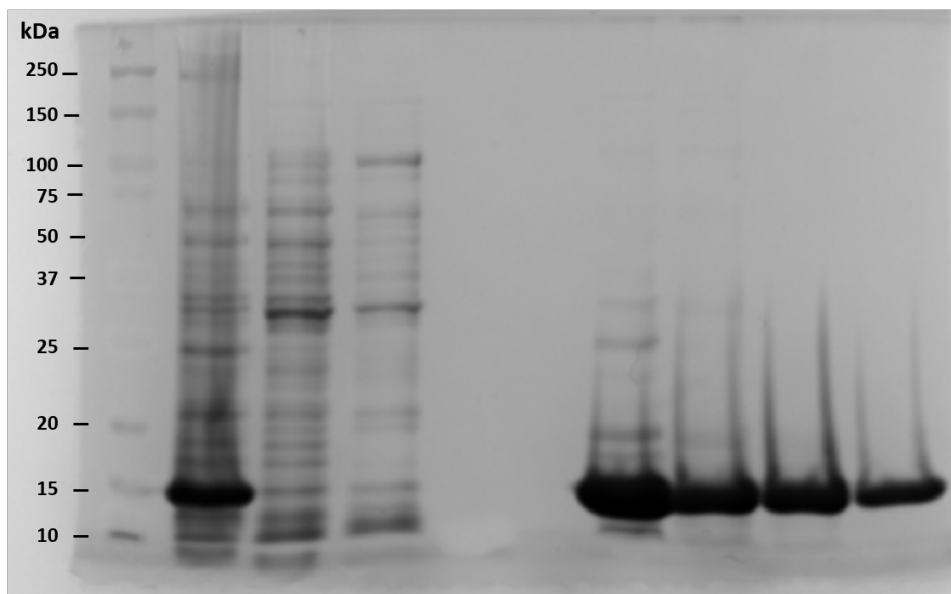
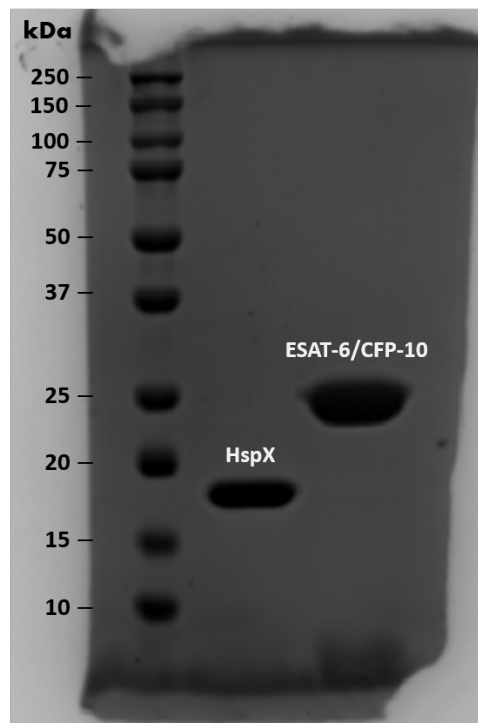


Figura 3.2 – Gel de poliacrilamida después de la purificación de la proteína HspX.

En lo que concierne la confirmación, el análisis SDS-PAGE y el Western Blot (WB) son las evidencias que mostraron la adquisición de las proteínas de interés; siendo ESAT-6/CFP-10 y HspX. Previo al análisis SDS-PAGE, fue necesario cuantificar cada proteína; seleccionando los resultados del ensayo de Bradford, donde se determinó



que se tiene una concentración de  $0.563 \frac{mg}{mL}$  de la proteína ESAT-6/CFP-10 y  $0.614 \frac{mg}{mL}$  de la proteína HspX. Con estos datos, se calculó el volumen correspondiente a 2  $\mu g$  de cada proteína, observándose en la Figura 3.3. En relación con el Western Blot, solamente se identificó la proteína ESAT-6/CFP-10 (Figura 3.4) y no la proteína HspX; realizando un Dot Blot (Figura 3.5) para confirmar que dicha proteína estaba expresada correctamente. Sin embargo, es necesaria la obtención de un WB donde se confirme la presencia de ambas proteínas, en las líneas de peso molecular correspondientes del marcador molecular.



*Figura 3.3 – Gel de poliacrilamida del análisis SDS-PAGE.*

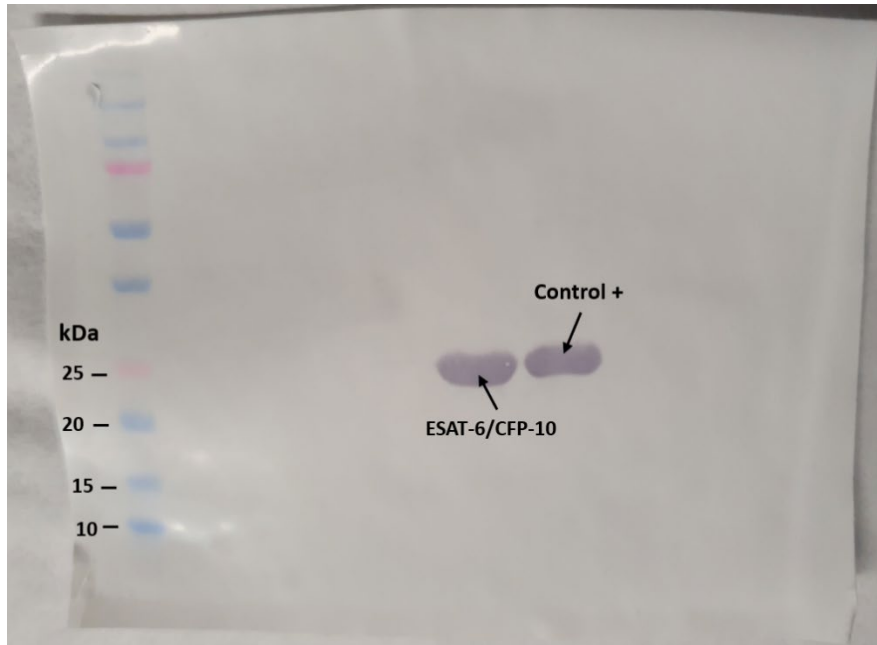


Figura 3.4 – Membrana de nitrocelulosa obtenida del WB (control + = ESAT-6/CFP-10 para ELISA).

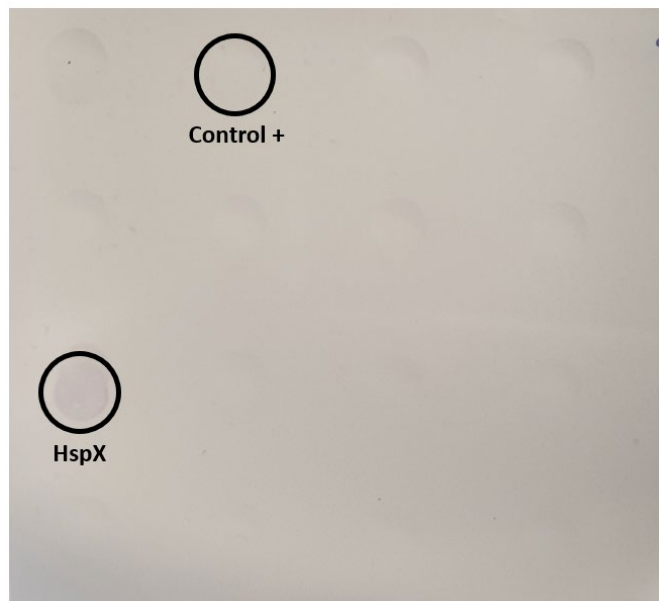


Figura 3.5 – Membrana de nitrocelulosa obtenida del DB (proteína HspX; control + = HspX para ELISA).

Con relación al impacto profesional dentro del CIATEJ, en el grupo encabezado por el Dr. Mario Alberto Flores Valdez, me permitió conocer la estructura de trabajo en el área biotecnológica tanto en la parte experimental (laboratorio) como en la parte teórica (revisión bibliográfica y planificación del proyecto). Esta oportunidad me ha permitido identificar y trabajar en mis debilidades como la organización de mis tiempos, el apegarme más al uso de la bitácora, siempre revisar anotaciones previo a realizar algún procedimiento y estar más consciente cuando me dan indicaciones. Asimismo, he podido fortalecer mi habilidad de trabajar en equipo, mis canales de comunicación y progresar mi formación dentro del laboratorio. Sin olvidar, el conocimiento y el panorama de la nanotecnología dentro del área biotecnológica; siendo la experiencia que tanto anhelaba desde mi primer día en la carrera.

#### 4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto

- Aprendizajes profesionales

La oportunidad de comenzar un proyecto “propio” me ha permitido aprender, adquirir y fortalecer competencias dentro del ámbito de la investigación, siendo más adentrado en un tema específico y de mi interés. En esta primera parte que se enfocó a la parte biotecnológica, los saberes adquiridos dentro de mis materias complementarias (química orgánica, bioquímica e inmunología) me permitieron tener nociones básicas en terminología y conceptualización. Sin embargo, fue necesario investigar y leer respecto a distintos tópicos y procedimientos que se emplearon en el proyecto. Lo que me llevó a reflexionar que, si tengo planeado realizar un posgrado en el ámbito biotecnológico, debo aprovechar esta experiencia para comenzar mi formación sobre estos temas e identificar los aspectos por mejorar y por adquirir para entrar para cumplir con mi siguiente etapa formativa.

Al adentrarme más en el contexto de la problemática por resolver, comprendí que es fundamental lograr un diagnóstico específico y certero de TB para alcanzar el objetivo establecido por la OMS. De esta manera, se tendrá un impacto en la calidad de vida de las personas afectadas por TB y vulnerables a ella; marcando principalmente una gran relevancia en el aspecto de diagnóstico clínico de los sistemas de salud de comunidades altamente afectadas o en riesgo por dicha enfermedad. Se tiene claro que la detección oportuna prevendrá la transmisión de TB y permitirá tratar a tiempo a las personas infectadas.

Esta oportunidad muy cercana a mi profesión me ha otorgado competencias generales para realizar una investigación; siendo específicas de un proyecto con enfoque biotecnológico. Logré identificar distintas competencias generales, por ejemplo, mejoré la capacidad de trabajar en rigor y en equipo, definí un plan de trabajo adecuado, organicé las distintas actividades por realizar, adquirí flexibilidad al cambio, mantuve mi iniciativa durante la toma de decisiones y gestioné apropiadamente el estrés que haya alcanzado. Por otro lado, es necesario trabajar en el uso de la bitácora, selección y revisión adecuada de bibliografía, en mi escucha activa y comunicación efectiva dentro del equipo de trabajo y la interacción con mis compañeros de laboratorio e investigadores presentes en la unidad. Mencionando las competencias específicas, he logrado mejorar el correcto uso de términos científicos, tolerancia ante resultados no deseados y correlacionar tanto la teoría con la práctica para solucionar problemas que se presenten. Por último, aún falta practicar la manipulación de ciertos equipos, el ser precavido ante puntos de contaminación, la lectura de etiquetas de reactivos o sustancias por usar y repasar los procedimientos antes de realizarlos.

- Aprendizajes sociales

La meta establecida dentro del proyecto considera un impacto en la calidad de vida de la población mexicana, principalmente de las personas infectadas por TB y las

susceptibles a enfermarse de dicha enfermedad; previniendo su transmisión y diagnosticando en etapas tempranas. Por lo tanto, el tema de diagnóstico dentro de sistemas de salud será el ámbito social beneficiado e innovador, para que reciban la atención adecuada y los resultados sean confiables y específicos. Primeramente, este beneficio se buscará implementar para zonas marginadas que viven en condiciones de alto riesgo para adquirir MTB y donde los sistemas de salud posean deficiencias. Por otro lado, debido a intereses económicos y/o sociopolíticos que puedan oponerse a la comercialización de la prueba, es necesario que esta aportación social sea de un costo accesible y su producción sea óptima para escalarla a un nivel industrial; para que logre salir del laboratorio y llegue a donde se planeó inicialmente.

Este proyecto ha ampliado mi panorama sobre los aspectos que deben ser mejorados para propiciar una mejor calidad de vida. Además, se mantuvo la visión que me llevó a elegir la carrera de ingeniería en nanotecnología; que debo ayudar aquellas minorías de las cuales se olvidan, haciéndolo un paso a la vez. Debo aprender aún como se dirige un proyecto para que se tenga la oportunidad de ofrecer un verdadero beneficio dentro de la sociedad ni ocasione daños colaterales; todo eso se logra definiendo clara y concisamente cada uno de sus aspectos. Por el momento puedo prestar de mi disposición, de mis conocimientos, de mi fuerza y de mi actitud para colaborar en uno y llevarlo lo más lejos posible. No obstante, no debe olvidarse que el nanocomplejo que se persigue puede ser modificado para diagnosticar una diversidad de enfermedades, siempre y cuando, se tengan identificados biomarcadores (evaluados) que sean confiables para utilizarse.

- Aprendizajes éticos

Durante mi estadía de este periodo PAP, las principales decisiones que tomé fueron la organización de días y horarios para realizar los procedimientos establecidos y la forma en que llevaba a cabo nuevamente los procedimientos que se repitieron. Se

debió a que tanto el Dr. Mario Flores como la M.C. Wendy López me dieron la oportunidad de trabajar de forma independiente; siendo una grata propuesta ya que me permitieron confiar en ellos y me sentí tratado como profesionalista. Por lo que, de mi parte debía corresponder mi trato, es decir, mostrándoles respeto, avisando de avances y errores cometidos, ser transparente, ser honesto y, ante todo, pedir ayuda cuando ya no estaba dentro de mis capacidades para resolverlo.

Para la organización de los días y horario de trabajo no tuve problemas, siempre estuve puntual, aproveché de las horas que disponía para seguir avanzando en el proyecto y no interfirió con mis clases asignadas durante el semestre. En los días que no resultaba el método como debía ser; aprendí que debo apegarme más al uso de la bitácora, realizar muchas más anotaciones (por más mínimas que sean), leer las etiquetas de los reactivos y siempre leer a conciencia los protocolos antes de realizarlos. Después de todo, esta formación que voy forjando será para mi beneficio ya que lo ejerceré dentro del posgrado que elija, con el fin de desenvolverme de la mejor manera con mi asesor y compañeros de laboratorio.

- Aprendizajes en lo personal

Este PAP finalmente me impulsó no sólo en lo académico, sino también en el aspecto emocional y físico. Me refiero al aspecto emocional sobre cómo tratar con los errores por alguna decisión y/o acción; asumiendo las consecuencias por ello. Además, saber relacionarse con gente dentro del rubro de la investigación, que no te desanimas cuando no resulta a la primera y mantengas esa energía e iniciativa de lograr tu objetivo. Todos esos puntos me permitieron crecer y fortalecerme para cuando ya sea tu proyecto de maestría o estés dentro de la industria; bien me decían mis padres que uno puede tener desaciertos, siempre y cuando, aprendas de ellos y no los cometes nuevamente. A lo que fue el aspecto físico, el estar trasladándome del CIATEJ a ITESO y regresar por la tarde a clases se tornó relativamente pesado, pero con tal de alcanzar a terminar esta primera parte lo valió. Te permite crecer de

forma personal y experimentar una pequeña muestra de lo que nos espera al finalizar los estudios universitarios.

Definitivamente buscaré realizar mi maestría en un tema biotecnológico, por ello buscaba aprender de esta rama, pero ya en el ámbito experimental porque en el plan de estudios nunca recibí alguna asesoría adecuada de ello. Para lograr esta experiencia tuve que acercarme a mi profesora de bioquímica para que me recomendara qué investigadores trabajaban concretamente con ciertos temas de mi interés; a lo que ella accedió y me apoyó. Igualmente, ella y el Dr. Mario Flores me presentaron con otros investigadores y estudiantes de posgrado para que socializara y entablara alguna relación por si en algún momento requería de su ayuda; siendo un gran consejo por parte de mi asesor, que una clave de la investigación son las relaciones que establezcas con los compañeros de tu entorno para lograr colaboraciones en su momento. Ultimadamente, confirmé claramente mi interés que siempre he tenido por este ámbito de la investigación, puesto a que me emocionaba mucho la idea de ir al CIATEJ día tras día.

## 5. Conclusiones

Los productos obtenidos confirman la correcta extracción y purificación de las proteínas recombinantes ESAT-6/CFP-10 y HspX, que se emplearán en el nanocomplejo como biomarcadores. No obstante, se requiere obtener el Western Blot identificando ambas proteínas y una caracterización previo a emplearlas en el nanocomplejo. Además, la obtención de las proteínas señala que se desarrollaron las destrezas necesarias dentro del primer periodo PAP, indicando que se entendieron los procedimientos empleados junto con las instrucciones de la M.C Wendy López dentro del laboratorio. Sin embargo, se deberá perfeccionar la formación adquirida para reducir los desaciertos y aprovechar mucho más el tiempo del siguiente periodo. Por lo tanto, en el siguiente periodo se realizarán las pruebas de unión biomarcador-superficie del electrodo, el análisis y confirmación de un

anclaje correcto de los biomarcadores, la selección y realización de las caracterizaciones adecuadas del nanocomplejo.

## 6. Bibliografía

[1] CENAPRECE. (2016). CENAPRECE Casos nuevos y morbilidad de Tuberculosis pulmonar Estados Unidos Mexicanos 1990-2016, 2016.

[2] Digital, C. (2017). Las cifras de la tuberculosis en México. Retrieved February 10, 2020, from <https://www.capitalmexico.com.mx/sociedad/las-cifras-de-la-tuberculosis-en-mexico/>

[3] Flores, M. A. (2017). ¿Cómo han evolucionado los métodos para diagnosticar tuberculosis latente? - Conacyt - | La Crónica de Hoy. Retrieved February 10, 2020, from <http://www.cronica.com.mx/notas/2017/1048841.html>

[4] Flores, M. A. (2017). Cómo mejorar diagnóstico de tuberculosis - Conacyt - | La Crónica de Hoy. Retrieved February 10, 2020, from <http://www.cronica.com.mx/notas/2018/1071912.html>

[5] Flores, M. A., López, W., & Aceves, M. de J. (2018). El diagnóstico oportuno de tuberculosis en personas diabéticas: ¿es posible? | México es ciencia - El Sol de México. Retrieved February 10, 2020, from <https://www.elsoldemexico.com.mx/analisis/el-diagnostico-oportuno-de-tuberculosis-en-personas-diabeticas-es-posible-mexico-es-ciencia-1678964.html>

[6] México, H. de. (2019). Tuberculosis, enfermedad que cobra cuatro mil 500 muertes al día en el mundo: UNAM. Retrieved February 10, 2020, from <https://heraldodemexico.com.mx/tendencias/tuberculosis-enfermedad-que-cobra-cuatro-mil-500-muertes-al-dia-en-el-mundo-unam/>

[7] Romero, L. (2019). La tuberculosis aún es causa de muerte - Gaceta UNAM. Retrieved February 10, 2020, from <https://www.gaceta.unam.mx/la-tuberculosis-aun-es-causa-de-muerte/>

[8] Secretaría de Salud & Dirección General de Epidemiología. (2020). Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información | Secretaría de Salud | Gobierno | gov.mx. Retrieved April 23, 2020, from <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-231750>

[9] WHO. (2019). Regional and global profiles. Global Status Report of Tuberculosis, 251–258. Retrieved from [www.who.int/tb/data](http://www.who.int/tb/data)



- [10] WHO. (2020). México. Global Status Report of Tuberculosis. Retrieved from [www.who.int/tb/data](http://www.who.int/tb/data)
- [11] Okkels, L. M., & Andersen, P. (2004). Protein-Protein Interactions of Proteins from the ESAT-6 Family of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Bacteriology*, 186(8), 2487–2491. <https://doi.org/10.1128/JB.186.8.2487-2491.2004>
- [12] Chen, L., Xu, M., Wang, Z. Y., Chen, B. W., Du, W. X., Su, C., ... Wang, G. Z. (2010). The development and preliminary evaluation of a new Mycobacterium tuberculosis vaccine comprising Ag85b, HspX and CFP-10:ESAT-6 fusion protein with CpG DNA and aluminum hydroxide adjuvants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(1), 42–52. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00660.x>
- [13] Yousefi-Avarvand, A., Tafaghodi, M., Soleimanpour, S., & Khademi, F. (2018). HspX protein as a candidate vaccine against Mycobacterium tuberculosis: an overview. *Frontiers in Biology*, 13(4), 293–296. <https://doi.org/10.1007/s11515-018-1494-2>
- [14] Derrick, S. C., & Morris, S. L. (2007). The ESAT6 protein of Mycobacterium tuberculosis induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular Microbiology*, 9(6), 1547–1555. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00892.x>
- [15] Ruhwald, M., De Thurah, L., Kuchaka, D., Zaher, M. R., Salman, A. M., Abdel-Ghaffar, A. R., ... Andersen, P. (2017). Introducing the ESAT-6 free IGRA, a companion diagnostic for TB vaccines based on ESAT-6. *Scientific Reports*, 7(April), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep45969>
- [16] Restrepo, B. I. (2004). Nuevas herramientas para la detección de la tuberculosis latente. *Biomédica*, 24(0), 202. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24isupp1.1318>
- [17] Choi, H. H., Shin, D. M., Kang, G., Kim, K. H., Park, J. B., Hur, G. M., ... Song, C. H. (2010). Endoplasmic reticulum stress response is involved in Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6-mediated apoptosis. *FEBS Letters*, 584(11), 2445–2454. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.050>
- [18] Pierre-louis, M. H., Rouzier, V., Rivera, V., System, H. K., Julma, P., Jean, E., ... Wright, P. F. (2020). OUP accepted manuscript. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, (Xx Xxxx), 1–5. <https://doi.org/10.1093/jpids/piaa012>
- [19] Atkinson, K., Mabey, D., Ng, B. Y. C., Wee, E. J. H., West, N. P., & Trau, M. (2019). Nucleic Acid Detection of Tuberculosis Via Innovative Point-of-Care Nanotechnologies Targeted for Low Resource Settings. *Revolutionizing Tropical Medicine*, 584–599. <https://doi.org/10.1002/9781119282686.ch33>

- [20] Tsai, T. T., Shen, S. W., Cheng, C. M., & Chen, C. F. (2013). Paper-based tuberculosis diagnostic devices with colorimetric gold nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*, 14(4). <https://doi.org/10.1088/1468-6996/14/4/044404>
- [21] Neves, C. P., Costa, A. G., Safe, I. P., Brito, A. D. S., Jesus, J. S., Kritski, A. L., ... Cordeiro-santos, M. (2020). The role of mini-bronchoalveolar lavage fluid in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in critically ill patients. *Journal of Bacteriology*, 1–7.
- [22] Wang, S. Q., Inci, F., De Libero, G., Singhal, A., & Demirci, U. (2013). Point-of-care assays for tuberculosis: Role of nanotechnology/microfluidics. *Biotechnology Advances*, 31(4), 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.006>
- [23] Bhusal, N., Shrestha, S., Pote, N., & Alocilja, E. C. (2019). Nanoparticle-based biosensing of tuberculosis, an affordable and practical alternative to current methods. *Biosensors*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/bios9010001>
- [24] Bélanger, D., & Pinson, J. (2011). Electrografting: A powerful method for surface modification. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 3995–4048. <https://doi.org/10.1039/c0cs00149j>
- [25] Hernández, D. M., González, M. A., Astudillo, P. D., Hernández, L. S., & González, F. J. (2014). Modification of Carbon Electrodes by Anodic Oxidation of Organic Anions. *Procedia Chemistry*, 12, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.12.034>
- [26] Andrieux, C. P., Gonzalez, F., & Savéant, J. M. (1997). Derivatization of carbon surfaces by anodic oxidation of arylacetates. Electrochemical manipulation of the grafted films. *Journal of the American Chemical Society*, 119(18), 4292–4300. <https://doi.org/10.1021/ja9636092>
- [27] Galicia, M., González-Fuentes, M. A., Valencia, D. P., & González, F. J. (2012). The effect of substituents on the anodic oxidation of aliphatic carboxylates and the passage towards a pseudo-Kolbe reaction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 672, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.03.001>
- [28] Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>
- [29] Leonor, C. L., & Torres, T. (2016). Medios de Cultivos Microbiología. *Universidad Nacional de Nordeste. Facultad de Agroindustrias. Microbiología.*, 1, 15-20. Retrieved from <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>

- [30] Aquihuatl, M. de los A., & Pérez, M. de L. (2004). *Manual de prácticas del laboratorio general de Microbiología. Manual de prácticas laboratorio*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- [31] Malajovich, M. A. (2015). Introducción a las Técnicas Microbiológicas. *BTeduc*, 45.
- [32] Gómez, L. (2011). Técnicas de siembra para hongos y bacterias, 1, 1–6. Retrieved from <https://docplayer.es/109622542-Tecnicas-de-siembra-para-hongos-y-bacterias.html>
- [33] Soto, P., Monteavaro, D. C., Bottini, V. E., & Marco, A. F. De. (2015). Carpeta de mesa, UNCPBA: Facultad de Ciencias. 25–28.
- [34] Aryal, S. (2020). Bacterial Growth Curve Protocol | Protocols | Online Microbiology Notes. Retrieved March 23, 2020, from <https://microbenotes.com/bacterial-growth-curve-protocol/>
- [35] Ecuaci, R. (2013). Crecimiento microbiano Conceptos. UAM: Facultad de Ciencias Biológicas.
- [36] Abril Díaz, N., Antonio Bárcena Ruiz, J., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado Peinado, J., ... Túnez Fiñana, I. (n.d.). 8. *Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*.
- [37] Fernández, G. (2015). Esquema de un espectrofotómetro | Química Orgánica. Retrieved March 23, 2020, from <http://www.quimicaorganica.net/esquema-espectrofotometro.html>
- [38] Medical-EXPO. (2005). Lector de microplacas para absorbancia / ELISA - xMark™ - Bio-Rad. Retrieved March 23, 2020, from <https://www.medicalexpo.es/prod/bio-rad/product-80676-750847.html>
- [39] Medical-Biological Research y technologies. (2006). LMC-4200R, Centrífuga refrigerada de laboratorio| Biosan. Retrieved March 23, 2020, from <https://biosan.lv/es/products/lmc-4200r/>
- [40] Balasundaram, B., Harrison, S. & Bracewell, D.G. (2009). Los avances en las estrategias de lanzamiento de productos y el impacto en el diseño de bioprocesos. *Tendencias en Biotecnología* 27(8). pp. 477-485.
- [41] Mayor, C., La, D. E. I., Marido, Y. D. E. S. U., Poeta, E. L., Manrique, G., & Barcelona, U. De. (2007). Identificación de feromonas y proteínas implicadas en la percepción feromonal de lepidópteros plaga., 139–180.

- [42] Nexo. (2013). Sonicator Q500 – NEXO EQUIPAMIENTO Y SERVICIOS S.A.C. Retrieved March 23, 2020, from <https://nes.pe/sonicador-q500/>
- [43] Qiagen, F. S. (2003). *The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins Fifth Edition* QIAGEN Distributors QIAGEN Companies QIAGEN Worldwide Orders 800-572-9613 • Fax 800-713-5951 • Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737). Qiagen GmbH, Diisseldorf, Germany. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2006.10.010.Use>
- [44] Scientific, T. F. (2010). Thermo Scientific™ Resina HisPur™ Ni-NTA: Purificación de proteínas Extracción y purificación de proteínas | Fisher Scientific. Retrieved March 23, 2020, from <https://www.fishersci.es/shop/products/hispur-ni-nta-resin/p-4531406>
- [45] UNAM. (2007). *Técnicas Cromatográficas*. Facultad de Química. Retrieved from [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)
- [46] Abokine. (2016). Robust PurKine™ His-Tag Ni-NTA Resin 6FF - Abbkine - Antibodies, proteins, biochemicals, assay kits for life science research. Retrieved March 23, 2020, from <https://www.abbkine.com/high-tolerance-purkine-his-tag-ni-super-resin/>
- [47] C Menor-Salvan. (2019). SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida – ChemEvol. Retrieved from <http://www3.uah.es/chemevol/index.php/sds-page-electroforesis-en-gel-de-poliacrilamida/>
- [48] Alcalá, U. (2013). Electroforesis SDS, 1–5. Retrieved from [http://www3.uah.es/jcdiez/biologia\\_sanitaria/metodos\\_biologia\\_molecular/practicas.pdf](http://www3.uah.es/jcdiez/biologia_sanitaria/metodos_biologia_molecular/practicas.pdf)
- [49] BIO-RAD. (2006). Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, 4-gel, for 1.0 mm thick handcast gels, with Mini Trans-Blot® Module #1658029FC | Investigación Científica | Bio-Rad. Retrieved March 23, 2020, from <https://www.bio-rad.com/es-mx/sku/1658029fc-mini-protean-tetra-vertical-electrophoresis-cell-4-gel-for-1-0-mm-thick-handcast-gels-with-mini-trans-blot-module?ID=1658029FC>
- [50] Amarós, L., Amaya, E., ErricoMariana, Lambertucci, M., Miers, J., Mogro, E., ... Tocho, E. (2013). *Diálisis y Ultrafiltración. Bioquímica I*. Retrieved from [http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BQblog/Dialisis\\_y\\_ultrafiltracion.pdf](http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BQblog/Dialisis_y_ultrafiltracion.pdf)
- [51] Rodriguez, C. (2008). *Separación de proteínas por diálisis*. Retrieved from <http://iespoetaclaudio.centros.educa.jcyl.es/sitio/upload/06.dialisis.pdf>

- [52] Scientific, T. F. (2012). SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10K MWCO, 22 mm. Retrieved March 23, 2020, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/68100#/68100>
- [53] Gressner, A. M., & Gressner, O. A. (2018). Western blot. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 1–2). [https://doi.org/10.1007/978-3-662-49054-9\\_3674-1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-49054-9_3674-1)
- [54] Company, A. (2011). Análisis de Proteínas, 1, 11–17. Retrieved from <http://www.ecogen.com/upfiles/A56009.pdf>
- [55] BIO-RAD. (2005). Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell | Investigación Científica | Bio-Rad. Retrieved March 23, 2020, from <https://www.bio-rad.com/es-mx/product/trans-blot-sd-semi-dry-transfer-cell?ID=b92801aa-76b7-45c9-825e-672589d01b00>
- [56] Calderón, R. V. (2007). *Inmunoquímica. Instituto de Biotecnología UNAM*. 40-43.
- [57] Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350–1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>
- [58] Park, J. and Kang, T. (2015). DNA Slot Blot Repair Assay. *Bio-protocol* 5(8): e1453. DOI: [10.21769/BioProtoc.1453](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1453).
- [59] Johnson M. (2012). Cuantificación de proteínas. *Labome*, 1–10. <https://doi.org/10.13070/mm.es.2.115>
- [60] Abyntek. (2018). 5 métodos para cuantificar proteínas. Retrieved March 23, 2020, from <http://www.abyntek.com/5-metodos-para-cuantificar-proteinas/>
- [61] Ampules, A. S. (2000). Pierce BCA Protein Assay Kit, 0747(23225). Retrieved from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225#/23225>
- [62] Ampules, A. S. (2000). Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit. Retrieved March 23, 2020, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23236#/23236>

Anexos (en caso de ser necesarios)