



## **BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO**

# **BIOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DE IL-4 PRESENTE EN ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y SÍNDROME HIPEREOSINOFÍLICO**

Autora  
Katherine Andrea Montoya Cano

GRUPO DE BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL DE  
MACROMOLÉCULAS

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES



**BIOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DE IL-4 PRESENTE EN  
ENFERMEDADES  
ALÉRGICAS Y SÍNDROME HIPEREOSINOFÍLICO**

Autora  
Katherine Andrea Montoya Cano

Asesor  
MSc and PhD Edwin Bairon Patiño González

Trabajo de grado para optar por el título de profesional en Química

INSTITUTO DE QUÍMICA

MEDELLÍN

2022

## **Agradecimientos y dedicatoria**

Este trabajo de grado fue desarrollado gracias al Grupo de Bioquímica Estructural de Macromoléculas y Grupo Tandem Nanoingeniería Max Planck quienes me acompañaron en el desarrollo de mi trabajo de grado para optar al título de profesional en Química, en especialme a mi asesor al MSc y PhD Edwin Patiño, PhD Jahir Orozco y su estudiante de PhD Andrés Cruz por su asesoría y aportes en el campo de la bioquímica y la electroquímica. También, le doy las gracias a todos mis docentes que hicieron parte de mi formación profesional. Además, a mi familia y amigos por apoyarme en este proceso, especialmente a mis padres por creer en mí y estar de manera incondicional en este camino, sé que se sienten muy orgullosos de mi logro alcanzado.

“La ciencia es la estética de la inteligencia”  
-Gaston Bachelar

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	13
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 General.....	13
3.2 Específicos.....	13
4. HIPÓTESIS.....	13
5. MARCO TEÓRICO.....	14
5.1 Dispositivos de detección: Biosensores Electroquímicos.....	14
5.1.1 ¿Qué es un biosensor electroquímico?.....	14
5.1.2 Características de un biosensor electroquímico.....	15
5.1.3 Electroodos serigrafados (SPE).....	16
5.1.4 Tipos de inmovilización.....	17
5.1.5 Tipos de biosensores electroquímicos.....	18
5.2 Inmunosensores electroquímicos.....	20
5.2.1 Componentes y funcionamiento de los inmunosensores electroquímicos.....	21
5.3 Interleuquina 4 humana.....	22
5.3.1 Relación entre interleuquina 4 con la inflamación alérgica y síndrome hipereosinofílico.....	23
5.4 Técnicas analíticas para la síntesis de proteínas recombinantes.....	24
5.4.1 Espectroscopia de Absorción.....	24
5.4.2 Electroforesis SDS PAGE.....	25
5.4.3 Lisis de bacterias por Sonicación.....	25
5.4.4 Cromatografía por intercambio catiónico.....	25
5.5 Técnicas de verificación de plegamiento de proteínas recombinantes.....	26
5.5.1 Digestión con tripsina.....	26
5.5.2 Espectroscopia Infrarroja.....	27
5.6 Técnicas de caracterización de la interacción anticuerpo-citoquina.....	29
5.6.1 ELISA.....	29
5.7 Técnicas de caracterización de inmunosensores electroquímicos.....	29
5.7.1 Voltametría Cíclica.....	29
5.7.2 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica.....	30
5.7.3 Cronoamperometría.....	33

6. METODOLOGÍA.....	33
6.1 Expresión de hIL-4.....	33
6.1.1 Células competentes por el método de Cloruro de Rubidio (RbCl).....	33
6.1.2 Transformación bacteriana .....	34
6.1.3 Expansión del cultivo y preparación de cuerpos de inclusión.....	34
6.1.4 Renaturalización de la rhIL-4.....	35
6.1.5 Purificación de hIL-4 por cromatografía de intercambio catiónico.....	36
6.2.1 Digestión con tripsina.....	36
6.2.2 Espectroscopía Infrarroja con FT .....	37
6.3 Caracterización de la interacción de anti-rhIL-4 con rhIL-4.....	37
6.3.1 ELISA.....	37
6.4 Diseño del biosensor de detección electroquímico de rhIL-4.....	36
6.4.1 Método 1: Voltametría Cíclica y Espectroscopía de Impedancia Electroquímica .....	38
6.4.2 Método 2: Cronoamperometría .....	39
7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
7.1 Expresión de rhIL-4 .....	40
7.1.1 Transformación bacteriana .....	40
7.1.2 Expansión y preparación de cuerpos de inclusión.....	41
7.1.3 Renaturalización de rhIL-4.....	41
7.1.4 Purificación de rhIL-4 por cromatografía de intercambio catiónico .....	42
7.2 Verificación del plegamiento de la estructura de rhIL-4.....	43
7.2.1 Digestión con Tripsina.....	43
7.2.2 FT-IR .....	44
7.3 Caracterización de la interacción de anti-rhIL-4 con rhIL-4.....	46
7.3.1 ELISA.....	46
7.4 Diseño del biosensor de detección electroquímico de rhIL-4.....	48
7.4.1 Método 1: Voltametría Cíclica .....	49
7.4.2 Método 1: Espectroscopía de Impedancia Electroquímica.....	51
7.4.3 Método 2: Cronoamperometría .....	52
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS .....	54
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diseño del experimento de interacción de ELISA. Control positivo (CP), control negativo (CN). Cada pozo esta por duplicado. ....	37
<b>Tabla 2.</b> Soluciones Stock de rhIL-4 y anti-rhIL-4. ....	37
<b>Tabla 3.</b> Soluciones Stock de 5% BSA-PBS.....	37
<b>Tabla 4.</b> Soluciones Stock de anti-rhIL-4. ....	38
<b>Tabla 5.</b> Soluciones Stock de anti-IgG-HRP .....	38
<b>Tabla 6.</b> Cantidad de rhIL-4 obtenida en cada paso de la expresión y purificación empleando la ecuación 1 y teniendo en cuenta como coeficiente de extinción 0.592 M/cm, un factor de dilución de 10 y la longitud de la cubeta de cuarzo de 1.0 cm. ....	43
<b>Tabla 7.</b> Cantidad de estructura secundaria obtenida por FT-IR de rhIL-4 sintetizada .....	45
<b>Tabla 8.</b> Contenido de estructura secundaria reportada de rhIL-4 por FT-IR.....	45
<b>Tabla 9.</b> Absorbancias obtenidas del experimento de ELISA.....	48
<b>Tabla 10.</b> Áreas electroactivas en cada modificación del electrodo de trabajo para detectar rhIL-4. ....	51
<b>Tabla 11.</b> Parámetros establecidos en los circuitos equivalentes de Randles para cada una de las modificaciones del electrodo de trabajo para detectar rhIL-4.....	52

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Componentes de un biosensor. Tipos de analitos (muestras), transductores de señal (transductores) y procesadores o amplificadores de señal (sistemas electrónicos).....	14
<b>Figura 2.</b> Esquema de los elementos de un SPE. ....	16
<b>Figura 3.</b> Tipos de inmovilización presentes en un biosensor electroquímico. ....	17
<b>Figura 4.</b> Algunas formas alotrópicas del carbono empleadas para el diseño de biosensores. ....	18
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de inmovilización de la EDC-NHS en SPCE. ....	19
<b>Figura 6.</b> Representación de la estructura química general de un anticuerpo.....	21
<b>Figura 7.</b> Aplicaciones de los inmunosensores electroquímicos. ....	22
<b>Figura 8. A)</b> hIL-4(PDBe: 1bbn) <b>B)</b> Complejo de hIL-4 con hIL-4Ra (PDBe :1iar) <b>C)</b> Secuencia de aminoácidos de hIL-4.....	23
<b>Figura 9.</b> Transiciones electrónicas en espectroscopia UV-Visible.....	24
<b>Figura 10.</b> Representación esquemática de CIC .....	26
<b>Figura 11.</b> Modos vibracionales en FT-IR.....	29
<b>Figura 12.</b> Representación esquemática de un gráfico VC. ....	30
<b>Figura 13.</b> EIE <b>A)</b> Circuito Equivalente de Randles <b>B)</b> Curva de Nyquist.....	32
<b>Figura 14. A)</b> Representación esquemática del plásmido de rhIL-4 <b>B)</b> Transformación bacteriana .....	40
<b>Figura 15.</b> Gel SDS-PAGE expansión del cultivo de rhIL-4 <b>A)</b> 0h <b>B)</b> CI lote 1 <b>C)</b> CI lote 2 <b>D)</b> CI lote 3.....	41
<b>Figura 16.</b> Gel SDS-PAGE expansión de cultivo de rhIL-4 <b>A)</b> 0h <b>B)</b> 4h <b>C)</b> 0h <b>D)</b> 4h <b>E)</b> 0h <b>F)</b> 4h. ....	41
<b>Figura 17. A)</b> Representación esquemática del proceso termodinámico de rhIL-4 <b>B)</b> Gel SDS-	

PAGE renaturalización de rhIL-4 A) Lote 1 B) Lote 2 C) Lote 3.....	41
<b>Figura 18.</b> A) Esquema del cambio de pH de rhIL-4 respecto a su pI B) Cromatograma por intercambio catiónico de hIL-4, corrido 1. ....	42
<b>Figura 19.</b> Gel SDS-PAGE de rhIL-4 A) Fracciones colectadas de hIL-4 corrido 1 A) 72 B) 73 C) 74 D) 75 E) 76 F) 77 G)78 H)79 B) Pool corrido 1 A) Sin diálisis B) Con diálisis.....	42
<b>Figura 20.</b> A) Superposición de los cromatogramas de intercambios catiónico de hIL-4 de 4 corridos B) Gel SDS-PAGE pools de hIL-4 A) Sin diálisis B) Con diálisis C) Sin diálisis D) Con diálisis E) Sin diálisis F) Con diálisis. ....	43
<b>Figura 21.</b> Gel SDS-PAGE digestión de hIL-4 A) Primeros 15 min de digestión A) Control renaturalizada (R) B) Control desnaturalizada (D) C) R D) D E) R F) D G) R H) D B) Pasados 15 min de digestión A) Control R B) Control D C) R D) D. ....	44
<b>Figura 22.</b> Análisis de FT-IR de hIL-4 con su respectivo movimiento vibracional correspondiente a la banda amida I.....	45
<b>Figura 23.</b> Representación esquemática de la interacción de enlace anti-rhIL-4 con rhIL-4. ....	46
<b>Figura 24.</b> Mecanismo de reacción del TMB en una ELISA.....	47
<b>Figura 25.</b> Desviación estándar del experimento de ELISA.....	48
<b>Figura 26.</b> Diseño del biosensor electroquímico serigrafiado para detectar hIL-4.....	48
<b>Figura 27.</b> A) Electrodo serigrafiado usados para el diseño del dispositivo de detección de hIL-4 B) Voltagramas cíclicos del biosensor para la detección de hIL-4 con 5mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . ....	50
<b>Figura 28.</b> A) Circuito equivalente de Randles. B) Curvas de Nyquist del biosensor de detección de hIL-4 con 5mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . ....	52
<b>Figura 29.</b> Representación esquemática del biosensor modelo para detectar la interacción de rhIL-4 con anti-rhIL-4 en un electrodo de trabajo de oro.....	53
<b>Figura 30.</b> Diseño del biosensor electroquímico serigrafiado para detectar rhIL-4 .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

### LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAAAI</b>	American Academic of Allergy, Asthma & Immunology
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>Anti-hIL-4</b>	Anticuerpo de Interleuquina 4 humana
<b>AP</b>	Alkaline phosphatase
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AuNP</b>	Nanotubos de oro
<b>AuO(II)</b>	Óxido de oro (II)
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CA</b>	Cronoamperometría
<b>CBU</b>	Cystein Bicyclic Urea
<b>Cdot</b>	Carbon dots
<b>CI</b>	Cuerpos de inclusión
<b>CIC</b>	Cromatografía de Intercambio Catiónico
<b>CN</b>	Control negativo
<b>CNT</b>	Nanotubos de carbono
<b>CP</b>	Control positivo
<b>DC</b>	Direct Current
<b>EDS</b>	Carbodimida
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EIE</b>	Espectroscopía de Impedancia Electrónica
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
<b>FT-IR</b>	Fourier Transformation Infrared
<b>GO<sub>x</sub></b>	Grafeno oxidado
<b>GuHCl</b>	Cloruro de guanidinio
<b>hIL-4</b>	Interleuquina 4 humana
<b>hIL-4R<math>\alpha</math></b>	Interleuquina 4 humana receptor $\alpha$
<b>HES</b>	Hypereosinophilic syndrome
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgD</b>	Inmunoglobulina D
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>JAK</b>	Janus Kinasa
<b>Kan</b>	Kanamicina
<b>Medio LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>Medio MES</b>	Medio 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida
<b>PBS</b>	Buffer fosfato
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeno
<b>pI</b>	Punto Isoeléctrico

<b>pKa</b>	Constante de disociación ácida
<b>PTAA</b>	Politiofenoácido acético
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<b>SPCE</b>	Screen Printed Carbon Electrode
<b>SPE</b>	Screen Printed Electrode
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription
<b>TEMED</b>	Tetrametilendiamina
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
<b>Turn</b>	Espiral
<b>VC</b>	Voltametría Cíclica
<b>VD</b>	Voltametría Diferencial
<b>VPD</b>	Voltametría de pulso diferencial
<b>WAO</b>	World Allergy Organization

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>A</b>	Absorbancia o área de superficie electroactiva
<b>B (v)</b>	Densidad del poder espectral
<b>D</b>	Diferencia del camino óptico
<b>E</b>	Potencial
<b>E<sup>o</sup></b>	Potencial formal a ciertas condiciones
<b>F</b>	Constante de Faraday
<b>I</b>	Corriente
<b>I<sub>p</sub></b>	Pico de corriente
<b>I<sub>δ</sub></b>	Intensidad de caída del detector
<b>n</b>	Número de electrones transportados o exponente de la constante de fase
<b>R</b>	Constante de los gases ideales
<b>R<sub>ct</sub></b>	Resistencia a la transferencia de carga
<b>R<sub>s</sub></b>	Resistencia de la solución
<b>W</b>	Impedancia de Warburg
<b>[Ox]</b>	Concentración de la especie oxidada
<b>[Red]</b>	Concentración de la especie reducida
<b>V</b>	Flujo de barrido en VC
<b>D<sub>0</sub></b>	Coeficiente de difusión del analito
<b>C<sup>o</sup></b>	Concentración del analito en solución
<b>w</b>	Frecuencia radial
<b>ε</b>	Coeficiente de extensión
<b>C</b>	Concentración del analito
<b>L</b>	Longitud del paso óptico

## RESUMEN

La relación de la Interleuquina-4 humana (hIL-4) con la inflamación alérgica y el síndrome hipereosinofílico (HES) ha sido bien establecida. La hIL-4 bloquea la producción de IFN- $\gamma$  con lo cual se presenta un aumento de los eosinófilos que son los responsables de obstrucción de los bronquios, hiperreactividad y remodelación de las vías aéreas. La IL-4 tiene 129 aa, con un peso de 14.96 KDa, es secretada por las células Th2. La cuantificación de este biomarcador es esencial para un control temprano de la inflamación de las vías aéreas en enfermedades relacionadas con el aumento de eosinófilos como las alergias y HSE. Este trabajo comprendió primero la expresión, la renaturalización a su estructura nativa y luego la purificación de la hIL-4; segundo, la confirmación por métodos bioquímicos y físicos de su estructura nativa (plegamiento); y por último abordó el desarrollo de un inmunosensor para la detección de hIL-4 que fuera útil en el diagnóstico de enfermedades caracterizadas por la sobreexpresión de hIL-4 como las alergias y el síndrome hipereosinofílico. La hIL-4 fue producida de forma recombinante en *E. coli* mediante transformación bacteriana por choque térmico. En la primera etapa de este proyecto la hIL-4 se aisló de los cuerpos de inclusión (CI) a partir de cultivos, inducidos y expandidos. Los CI se solubilizaron para liberar la hIL-4, luego se renaturalizaron, dializaron y se purificaron por cromatografía de intercambio catiónico. Las fracciones cromatográficas se evaluaron por electroforesis de poliacrilamida y dializaron. Posteriormente la proteína se cuantificó, se liofilizó y se realizaron ensayos de verificación de plegamiento a partir de digestión con tripsina y FT-IR. Como control de interacción se realizó un ensayo de ELISA colorimétrico en donde se utilizó la hIL-4 y un anticuerpo anti-hIL-4 de ratón. Luego, en la superficie de electrodos serigrafados comerciales de oro y tinta de carbono y por dos métodos diferentes se detectó hIL-4. Uno de los métodos consistió en activar la superficie del electrodo de trabajo de carbono con PTAA y ensamblar el anticuerpo anti-hIL-4. Posteriormente, se añadió la hIL-4 y se analizó mediante transducción electroquímica. Se demostró que la hIL-4 a pH de 7.4 se cargó positivamente favoreciendo el proceso de atracción con el mediador  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  y se difundió más fácilmente con menor repulsión electrostática. Finalmente, se concluyó que el diseño del biosensor fue exitoso para ser un modelo a priori; fácil de manipular, bajo costo de producción, flexible y selectivo para cuantificar el aumento de hIL-4 principalmente en la inflamación alérgica y HES.

**Palabras claves:** Alergias, Biosensor electroquímico, hIL-4, Enfermedades, , EIE.

## ABSTRACT

The relationship of human Interleukin-4 (hIL-4) with allergic inflammation and hypereosinophilic syndrome (HES) has been well established. hIL-4 blocks the production of IFN- $\gamma$ , which results in an increase in eosinophils, which are responsible for bronchial obstruction, hyperreactivity, and airway remodeling. IL-4 is 129 aa, weighing 14.96 KDa, and is secreted by Th2 cells. The quantification of this biomarker is essential for early control of airway inflammation in diseases related to increased eosinophils such as allergies and HSE. This work first comprised the expression, renaturation to its native structure, and then purification of hIL-4; second, confirmation by biochemical and physical methods of its native structure (folding); and finally addressed the development of an immunosensor for the detection of hIL-4 that would be useful in diagnosing diseases characterized by overexpression of hIL-4 such as allergies and hypereosinophilic syndrome. hIL-4 was recombinantly produced in *E. coli* by bacterial heat shock

transformation. In the first stage of this project, hIL-4 was isolated from inclusion bodies (IB) from cultures, induced and expanded. IB were solubilized to release hIL-4, then renatured, dialyzed and purified by cation exchange chromatography. Chromatographic fractions were evaluated by polyacrylamide electrophoresis and dialyzed. Subsequently, the protein was quantified, lyophilized and folding verification assays were carried out from digestion with trypsin and FT-IR. As an interaction control, a colorimetric ELISA assay was performed in which hIL-4 and a mouse anti-hIL-4 antibody were used. Then, hIL-4 was detected on the surface of commercial screen-printed gold and carbon ink electrodes by two different methods. One of the methods was to activate the carbon working electrode surface with PTAA and assemble anti-hIL-4 antibody. Subsequently, hIL-4 was added and analyzed by electrochemical transduction. It was shown that hIL-4 at pH 7.4 was positively charged, favoring the attraction process with the mediator  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  and diffused more easily with less electrostatic repulsion. Finally, it was concluded that the biosensor design was successful to be an a priori model; easy to manipulate, low cost of production, flexible and selective to quantify the increase of hIL-4 mainly in allergic inflammation and HES.

**Key Words:** Allergies, Electrochemical Biosensor, hIL-4, Diseases, EIS.

## 1. INTRODUCCIÓN

Un biosensor está compuesto por un bioreceptor, un transductor y un detector [1]. Existen muchos tipos de electrodos como los piezoeléctricos, ópticos y electroquímicos, de este último hace parte los electrodos serigrafados, estos se caracterizan por tener tres electrodos; un electrodo auxiliar, uno de referencia y uno de trabajo; en este último se inmoviliza el material biológico ya sea mediante un proceso físico (atrapamiento y adsorción), o químico (enlace covalente y capa intermedia). La señal puede ser medida a partir de técnicas electroquímicas como la voltametría, cronoamperometría y/o espectroscopia de impedancia electrónica. Adicionalmente, los electrodos serigrafados pueden ser modificados comercialmente con metales nobles como oro, plata y platino o el electrodo de trabajo se puede modificar con nanomateriales de estos metales ya mencionados; además con nanotubos de carbono y quantum dots para amplificar la señal. Cabe anotar que este tipo de técnicas analíticas se han convertido en un plus para muchos campos, entre ellos la parte biomédica porque posee una alta sensibilidad, portabilidad, selectividad, flexibilidad, bajo costo de producción. Adicionalmente, se emplea poca cantidad de muestra y los tiempos de diagnóstico son más cortos en comparación con las técnicas convencionales.

La hIL-4 es una glicoproteína monomérica compuesta de 129 aminoácidos con un peso molecular de 14.96320 kDa [2]. Se caracteriza por ser una citoquina inmunoregulatoria prototípica secretada por células Th2 CD4+, basófilos y mastocitos. La hIL-4 se encarga de la activación de la actividad de la Janus kinasa, coestimular y diferenciar células B, activar macrófagos y brindar una respuesta inmune. Una sobreexpresión de hIL-4 está asociada a la inflamación alérgica como son el asma y los diferentes tipos de alergias principalmente ocasionada por los alimentos o factores ambientales [3]. En consecuencia, el proyecto se enfoca en producir hIL-4 recombinante (rhIL-4) a partir de *E. coli* para utilizarla en el diseño de un inmunosensor electroquímico serigrafado. Para ello, se inmovilizo covalentemente un anti-hIL-4 mediante la cupla ECD-NHS al electrodo de trabajo y mediante interacciones antígeno (rhIL-4) y anticuerpo se puede determinar la presencia de hIL-4 en la muestra. La señal se mide a través de EIS en suero humano dopado con rhIL-4. Se percibe

mediante una curva de Nyquist e interpolada, que la resistencia al paso de electrones en el electrodo de trabajo es proporcional a la concentración de hIL-4. Este inmunosensor abre la posibilidad de determinar la IL-4 en enfermedades como las alergias brindando un nuevo sistema de detección a costos más bajos que los actualmente existentes como la ELISA o el Western blot.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Los reportes de la literatura afirman que en el ámbito clínico las prueba en plasma y cutáneas son las formas más empleadas para el análisis de pacientes alérgicos, pero el resultado solo es cualitativo, por ende, tratar el paciente se convierte en un ensayo- error porque no se posee un valor cuantitativo. Alrededor de los años noventa la electroquímica, nanotecnología y biotecnología han logrado revolucionar los avances en la ciencia y muchos experimentos que no se lograban obtener con éxito, fueron posibles de realizar porque las técnicas se optimizaron y validaron; esto permitió el desarrollo de técnicas electroquímicas como la voltametría, amperometría, cronoamperometría y espectroscopía de impedancia electrónica, aparición de nanomateriales como los nanotubos de carbono, nanopartículas de metales de transición y quantum dots, también la ingeniería de proteínas recombinantes, DNA híbridos, síntesis de péptidos entre otros. La fusión de estas tres ramas mencionadas anteriormente, han permitido que a la fecha se obtengan diferentes biosensores para detectar múltiples materiales biológicos en alimentos, aguas residuales y en la parte clínica; pero los biosensores de citoquinas son pocos los reportes que se encuentran. Por tal motivo, surge la idea de diseñar un dispositivo de detección serigrafiado de la citoquina hIL-4. La construcción de un biosensor electroquímico serigrafiado para la detección de hIL-4 se convierte en un propósito bastante promisorio para el campo de la investigación y la clínica. La intención de este dispositivo de detección de hIL-4 es: 1) Evaluar la respuesta electroquímica de hIL-4 y anti-hIL-4, y 2) medir los niveles de hIL-4 en suero humano dopado con hIL-4.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 General**

Diseñar un biosensor para la detección de interleuquina 4 (hIL-4) en suero humano.

### **3.2 Específicos**

- ❖ Producir hIL-4 recombinante en *E. coli*.
- ❖ Comprobar el plegamiento de la rhIL-4 por métodos biofísicos y bioquímicos
- ❖ Evaluar la respuesta electroquímica del biosensor para la detección de la hIL-4 en suero humano dopado con hIL-4 recombinante.

## **4. HIPÓTESIS**

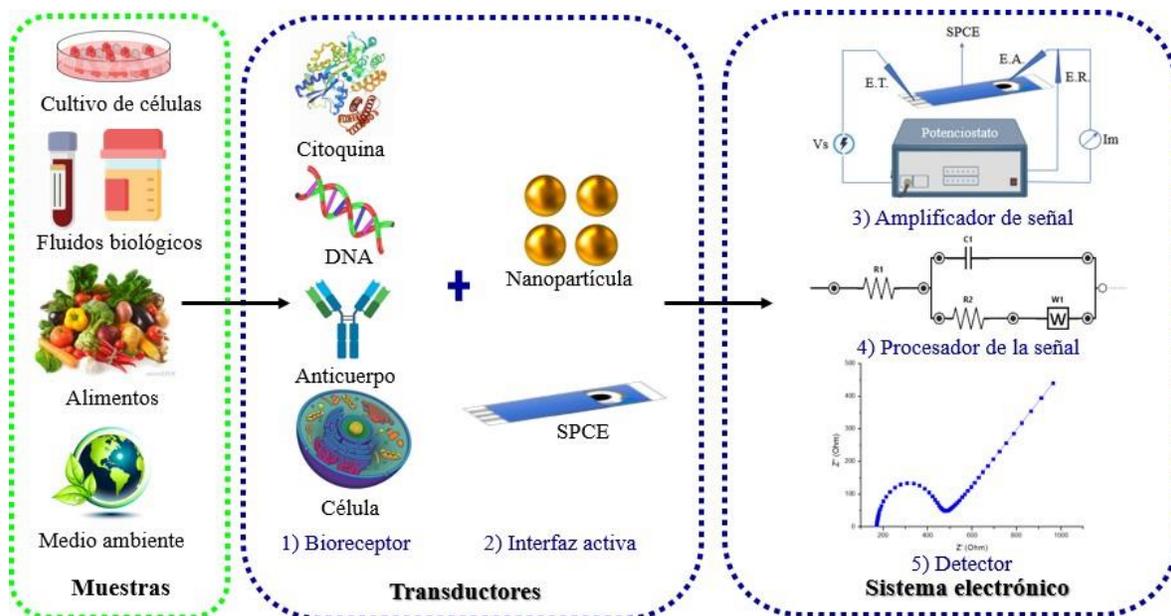
El proceso de síntesis y refolding de rhIL-4 produce una proteína en su conformación nativa ideal para el diseño de un biosensor que detecte rhIL-4 en suero humano.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Dispositivos de detección: Biosensores Electroquímicos

#### 5.1.1 ¿Qué es un biosensor electroquímico?

Se entiende por biosensor como el dispositivo que es capaz de incorporar un material biológicamente activo con un transductor para generar una señal medible proporcional a la concentración de las especies químicas presentes en la muestra de interés las cuales son detectadas por un instrumento electrónico (Fig 1) [4][5]. Los biosensores pueden ser clasificados de acuerdo al transductor y el bioreconocimiento del material; la señal puede ser medida electroquímicamente, ópticamente, acústicamente, mecánicamente, calorimétricamente o electrónicamente. El bioreceptor puede ser enzimas, anticuerpos, citoquinas, DNA, microorganismos, tejidos y células [1]. Cuando el enlace del biomaterial y el analito es detectado, se considera como un sensor de afinidad; si la interacción que se presenta entre el biomaterial y el analito está acompañada por un cambio químico en el cual uno de los substratos o productos es medido, se habla de un sensor de metabolismo y si la señal es medida después de enlazar el analito sin un cambio químico, pero si mediante un catalizador, el biosensor es llamado un sensor catalítico [4]. El primer biosensor fabricado fue el biosensor de glucosa de Clark y Lyons en 1962 [6], desde entonces este se ha venido perfeccionando hasta llegar a los avances actuales. Los biosensores electroquímicos se caracterizan por tener una alta sensibilidad en la medida, selectividad, miniaturización, poca cantidad de muestra, bajo costo de producción, flexibilidad y capacidad de multiplexado. Las técnicas electroquímicas implementadas para medir la señal son potenciometría, amperometría, voltametría y espectroscopia de impedancia electrónica.



**Figura 1.** Componentes de un Biosensor. Tipos de analitos (muestras), transductores de señal (transductores) y procesadores o amplificadores de señal (sistemas electrónicos).

## **5.1.2 Características de un biosensor electroquímico**

El desempeño y la eficiencia del biosensor es determinada mediante las características funcionales y técnicas descritas por la IUPAC [7], quienes afirman que los parámetros que deben variar son la linealidad, sensibilidad, límite de detección, selectividad, repetibilidad y reproducibilidad, exactitud, tiempo de respuesta, tiempo de recuperación, condiciones de almacenamiento y robustez.

### **5.1.2.1 Linealidad**

La linealidad del sensor es medida por el grado de su curva de calibración que se parece a la línea base [5].

### **5.1.2.2 Sensibilidad**

La sensibilidad es definida en técnicas analíticas como la pendiente de la curva de calibración, mientras la sensibilidad analítica es la pendiente de la curva de calibración dividido la desviación estándar [8]. En otras palabras, la sensibilidad es la menor cantidad de diferencia leída por un instrumento.

### **5.1.2.3. Límite de detección**

El límite de detección es la concentración más baja de un analito que puede ser detectada con el sensor [8] con una fracción baja señal/ruido (S/N).

### **5.1.2.4. Selectividad**

La selectividad se define como la capacidad de discriminación que tiene el sensor por dos o más sustancias o posiciones de la misma sustancia [8]. Los factores que intervienen en la selectividad del biosensor son: El analito, el transductor empleado y el pH de la solución [5].

### **5.1.2.5 Tiempo de respuesta y recuperación**

El tiempo de respuesta es un factor determinante en el biosensor porque de este depende si es escalado desde el laboratorio a nivel industrial. Este tiempo es influenciado por la temperatura y concentración de la muestra, espesor del bioreceptor, geometría y permeabilidad, por supuesto la velocidad de agitación de la mezcla analizar. Por otro lado, el tiempo de recuperación es el tiempo mínimo requerido entre dos medidas consecutivas que dependen de factores como el espesor y permeabilidad del bioreceptor como de la concentración del analito [5].

### **5.1.2.6 Reproducibilidad y repetibilidad**

La reproducibilidad hace referencia a la capacidad que tiene el sistema de censado para producir una señal idéntica bajo condiciones de medida similares [5]. En cambio, la repetibilidad es la habilidad de producir varias veces la misma señal manteniendo las condiciones de periodo y

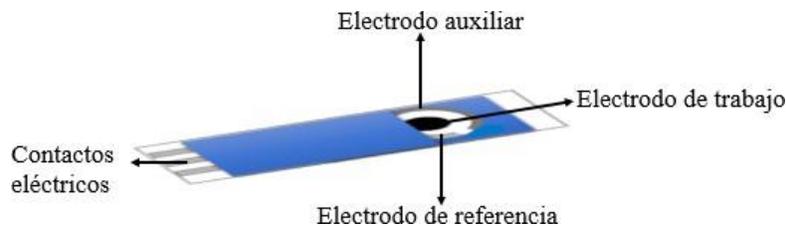
tiempo sin alterar. Si un biosensor posee una alta reproducibilidad y repetibilidad, se considera un dispositivo de alta confianza.

### 5.1.2.7 Exactitud

La exactitud se verifica comparando el biosensor con una medida estándar o con un sistema de medida de mayor exactitud [5].

### 5.1.3 Electrodo serigrafiados (SPE)

Los electrodos serigrafiados (SPEs) han revolucionado la industria electrónica debido a que poseen una alta demanda por su bajo costo y reproducibilidad. SPE pueden ser hechos de tinta de carbón, oro, platino, bismuto, nanotubos de carbono, etc. Además, los SPEs se pueden modificar con nanopartículas, polímeros o agentes quelantes, los cuales pueden ser muy selectivos para un análisis en particular; se modifican de acuerdo al analito de interés, de lo contrario, se deja sin modificar; en muchos casos este se utiliza como control. Estos materiales deben ser conductores para aumentar el área de superficie activa. Este tipo de electrodo consisten en una tarjeta que está compuesta por la siguiente configuración: Electrodo de trabajo, referencia y auxiliar (Fig 2) [9]. El área de interés es el electrodo de trabajo, este permite utilizar cantidades muy pequeñas en escala micro para los análisis de cuantificación. El electrodo de trabajo es donde se lleva a cabo el suceso electroquímico de interés, el electrodo de referencia posee un potencial de equilibrio estable por naturaleza este electrodo es perdurable en el tiempo, por lo general, es de plata/ cloruro de plata, y el electrodo auxiliar, su función es cerrar el circuito eléctrico [10][11]. Los SPEs se fabrican con materiales conductores y un sustrato plano, los sustratos más empleados son cerámica y materiales basados en plástico [12], que son la base del electrodo de trabajo. El material se aplica sobre la plantilla que tiene el sustrato, luego bajo un curado térmico se solidifica el material, la temperatura de curado tiene efecto en las características físicas y electroquímicas del carbono [10]. A temperaturas de 80 °C el carbón empieza a tener bordes activos mientras a 120° C se forman grietas que mejoran y activan la superficie activa del electrodo [10]. Finalmente, el material se aísla con una película para analizar cuál es el área activa del electrodo. Si el sustrato es cerámica se requiere de altas temperaturas para su producción.



**Figura 2.** Esquema de los elementos de un SPE.

### 5.1.4 Tipos de inmovilización

Existen varias técnicas de inmovilización físicas como la adsorción y el atrapamiento, y químicas mediante enlace covalente y capa intermedia (Fig 3). La adsorción en los SPEs se da cuando se colocan en contacto con una solución acuosa del componente por un tiempo determinado. Las fuerzas de Van der Waals, enlaces por puente de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones mediadas por electrones  $\pi$  [13] son las responsables de este fenómeno de adsorción, el componente que no es adsorbido se retira lavando con una solución tampón. Mientras en el atrapamiento, el componente es atrapado en una película delgada de un polímero dentro del electrodo; la especie también puede ser atrapada en una matriz polimérica tridimensional [13] que se encuentra con especies radicalarias adsorbidas en la superficie del electrodo como consecuencia de una oxidación anódica [14]. Por otro lado, en la inmovilización por enlace covalente interviene grupos nucleófilos como aminas, grupos carboxílicos, alcoholes, tioles o grupos imidazol para activar la superficie de trabajo y el grupo saliente luego de la reacción es un éster activado o un halogenuro de ácido. En cambio, la inmovilización por capa intermedia consiste en utilizar capas mono o multi ensambladas que permiten hacer un enlace selectivo para la unión del biocomponente favoreciendo la formación de compuestos de coordinación y sándwiches moleculares, también se conoce como inmovilización por afinidad; es muy usada por su selectividad de interacción. El éxito de este tipo de inmovilización depende de las etiquetas de afinidad, el sistema biotina-avidina, proteínas como A o G [13] en inmunosensores entre otras.

#### 5.1.4.1 Inmovilización con la cupla carbodimida (EDC)- N-hidroxisucinimida (NHS)

Las modificaciones covalentes son realizadas mediante reacciones químicas como halogenación, cicloadiciones, oxidaciones y reacciones electroquímicas. Según la literatura, las modificaciones del grafeno se llevan a cabo induciendo interacciones de los átomos de carbono con hibridación  $sp^2$  y rehibridizando de  $sp^2$  a  $sp^3$  [15]. Cuando se modifica la superficie del electrodo de trabajo se altera la forma, longitud y estructura del carbono debido a que se agregan nuevos grupos funcionales como los carbonilos, los cuales son sitios de entrecruzamiento para grupos aminos mediante la molécula EDC. El carbono en una de sus formas alotrópicas (Fig 4) carboxilado reacciona con EDC para formar el ester intermedio O-acilourea. Posteriormente, se une a la molécula de N-hidroxisuccinimida (NHS) para formar un ester intermedio semiestable para poder proceder con la formación del enlace peptídico entre los grupos carbonilo del carbono y la amina primaria de la biomolécula para que el enlace conformado sea estable [16][17]–[22](Fig 5). Se suele utilizar esta cupla para que la orientación sea directa al sitio enlace.

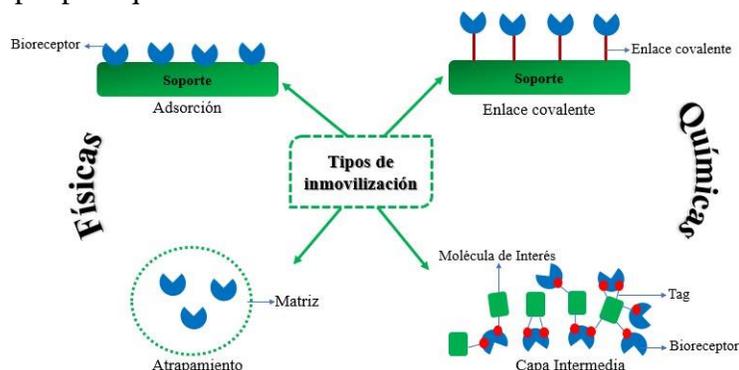
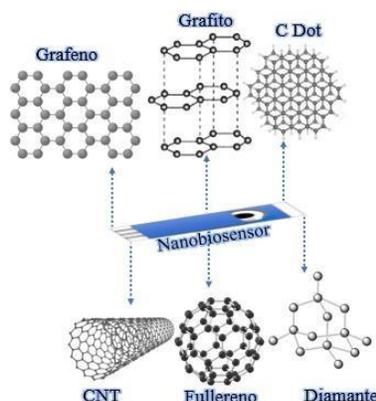


Figura 3. Tipos de inmovilización presentes en un biosensor electroquímico.



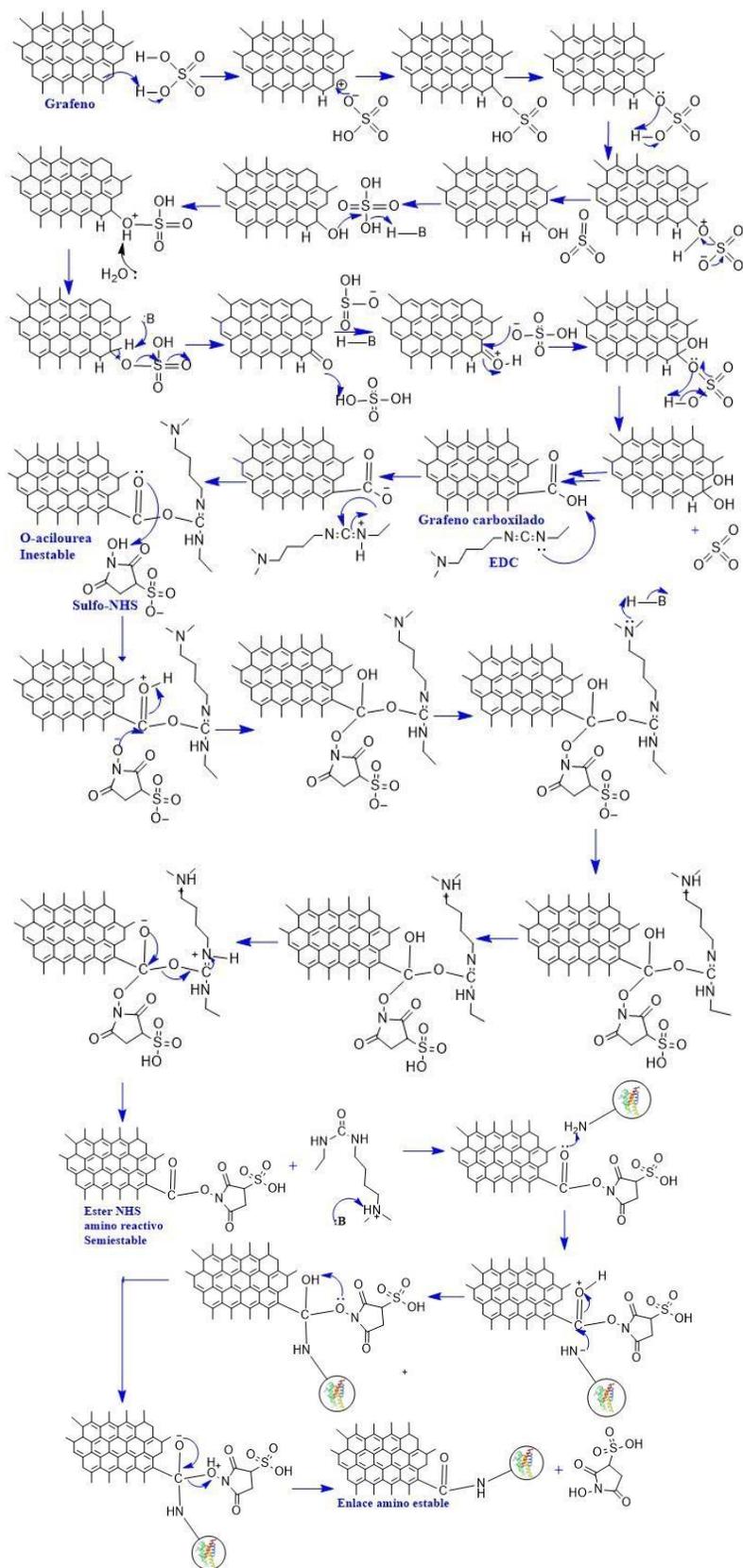
**Figura 4.** Algunas formas alotrópicas del carbono empleadas para el diseño de biosensores.

### 5.1.5 Tipos de biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos de acuerdo con el tipo de inmovilización se dividen en tres categorías que son biosensores enzimáticos, a base de células y por afinidad.

#### 5.1.5.1 Biosensores enzimáticos

Las enzimas son catalizadores biológicos que poseen un sitio activo para unir un sustrato específico y favorecer reacciones químicas [13]. Los sensores enzimáticos electroquímicos emplean un electrodo modificado con una enzima que actúa como bioreceptor para la transducción de la señal. La función de la enzima es producir especies electroactivas en una relación estequiométrica a la concentración del sustrato y finalmente se detecta una reacción redox como respuesta del sistema [13]. Este tipo de biosensores emplean las técnicas de inmovilización físicas y diferentes matrices para modificar el electrodo de trabajo del SPE como son matrices poliméricas, matrices porosas de sílica y nanomateriales, que permiten mantener las condiciones de bioactividad de la enzima, así como la transferencia de electrones. Los sistemas redox que se emplean son glucosa oxidasa (GOx), peroxidasa de rábano (HPR), bilirrubina oxidasa, entre otras. Además, se requieren de diferentes reactivos para activar la superficie del electrodo como son EDC/NHS y glutaraldehído seguido de las cuplas redox [23]. De acuerdo con la literatura, se fabricó un sensor de glucosa usando un ensamble de MPA (ácido mercaptopropionico), basado en un compuesto de nanopartículas de oro (AuNP) y ureas bicíclicas soportadas en cisteína (CBU), el electrodo fue de oro policristalino. El sensor exhibe un límite de detección de 100 nM con un rango de linealidad de 100 nM a 1 mM, una sensibilidad de 217.5 uA/mM cm<sup>2</sup> a un potencial de -0.3 V [24].



**Figura 5.** Mecanismo de inmovilización de la EDC-NHS en SPCE.

### **5.1.5.2 Biosensores de células**

Los biosensores de células son empleados para medir toxicidad y detectar la demanda de oxígeno [25]. Las técnicas de inmovilización más usadas son la adsorción y el atrapamiento, aquí las fuerzas implicadas son electroestáticas, Van der Waals, hidrofóbicas e hidratación [13]. Los bioreceptores que se unen al electrodo son bacterias, virus y células enteras; obteniendo un sensor con buena estabilidad y tiempo de vida media adecuado.

### **5.1.5.3 Biosensores por afinidad**

Este tipo de dispositivos reconocen elementos como ADN, ARN, anticuerpos, receptores o ligandos de proteína y material biomimético [26]. Se caracterizan por poseer una alta selectividad, sensibilidad, estabilidad y bioafinidad por el material biológico. Los sensores de anticuerpos o antígenos son conocidos como inmunosensores, los métodos para inmovilizar anticuerpos son adsorción, atrapamiento, enlace covalente (directa o indirectamente) y entrecruzamiento. También, a esta categoría existen los sensores de ADN donde los ácidos nucleicos son usados como bioreceptor. En este biosensor se inmoviliza una hélice de ADN y la otra se hibridiza, esta última es la responsable de la señal del transductor [13].

Los sensores de ADN pueden determinar enfermedades genéticas y patogénicas monitoreando las hebras de ADN de interés relacionadas con la enfermedad [13]. En los biosensores de ADN electroquímicos, las señales están basadas en oxidaciones de las bases de ADN, las reacciones redox de las sondas reportadas presentes en el electrodo por interacciones específicas de la molécula de interés o por el transporte de carga realizado a través de los pares de bases  $\pi$ -apiladas que son utilizadas [24]. También es posible modificar la superficie del electrodo para amplificar la señal proporcionando medidas en el rango de femto a zepto molar [13]. La exactitud en la medida de los sensores de ADN depende principalmente del tipo de inmovilización y su orientación en la superficie [13]. Las técnicas de inmovilización más empleadas son mediante adsorción electroestática o por enlace covalente.

## **5.2 Inmunosensores electroquímicos**

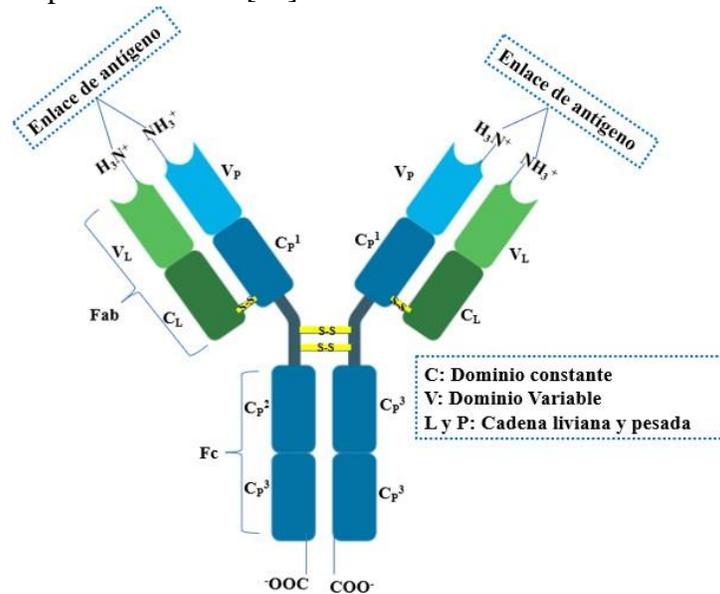
### **5.2.1 Componentes y funcionamiento de los inmunosensores electroquímicos**

Los anticuerpos son proteínas globulares formadas por cientos de aminoácidos [13], los cuales se arreglan en una secuencia altamente ordenada. Un anticuerpo contiene dos fragmentos uno es el enlace de antígeno (Fab) que se encuentra al final de los dos brazos y el otro fragmento es la región cristalizable (Fc) (Fig 6) [13]. Cada anticuerpo comprende cuatro polipéptidos, dos son cadenas pesadas (P) con un peso molecular alrededor de 55.0 kDa y dos de cadena liviana (L) con un peso molecular aproximado de 22.0 kDa. Cada cadena liviana está unida a la cadena pesada mediante enlace disulfuro y por interacciones no covalentes como enlaces de hidrogeno, puente salino e interacciones hidrofóbicas para formar un heterodímero (P-L)[27].

La cadena liviana se caracteriza por contener 220 aminoácidos, 110 de estos aminoácidos se encuentran en el N- terminal (amino terminal) y se conoce como la región variable mientras los otros 110 aminoácidos se localizan en el C-terminal (extremo carboxilo terminal) y se conoce como la región constante [27]. Existen dos tipos de región constante en la cadena liviana, lambda

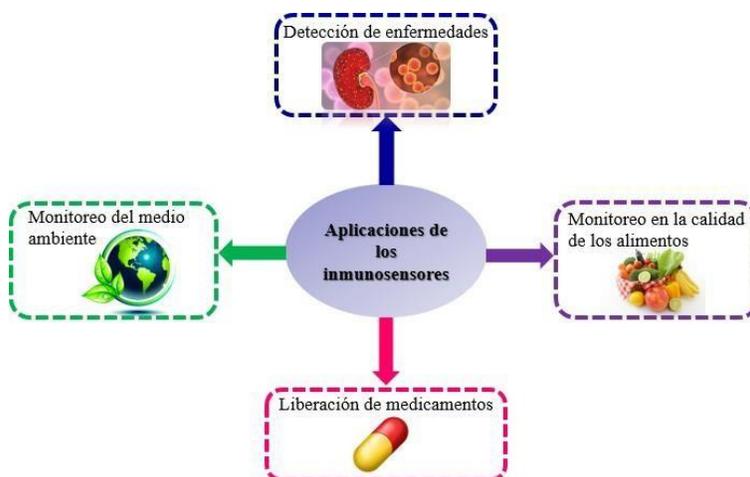
( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ), estas se presentan por pares ( $2\lambda$  o  $2\kappa$ ). Por otro lado, la cadena pesada está compuesta por 110 aminoácidos ubicados en el N-terminal y se conocen como la región variable del anticuerpo. La cadena pesada tiene cinco tipos de constantes:  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\gamma$ . Según su isotipo es la clase de anticuerpo, esto quiere decir,  $\mu$  (IgM),  $\alpha$  (IgA),  $\delta$  (IgD),  $\epsilon$  (IgE) y  $\gamma$  (IgG). La longitud de la región constante para  $\alpha$  y  $\delta$  son de 330 aminoácidos [27]. La región constante es la responsable de la función inmune [13].

Los anticuerpos se pueden dividir en monoclonales y policlonales, los monoclonales provienen de hibridomas, mientras los policlonales son producto de diversas células B plasmáticas [13]. Un anticuerpo se une de manera específica y selectiva a los antígenos que estos reconocen. Los parámetros como sensibilidad, selectividad, estabilidad, tipo de inmovilización y tamaño del anticuerpo son los responsables de la eficiencia del biosensor [13]. Las técnicas de inmovilización empleadas para este tipo de biosensores son adsorción, atrapamiento, entrecruzamiento, enlace covalente y el uso de la proteína A o G [13].



**Figura 6.** Representación de la estructura química general de un anticuerpo.

Los inmunosensores funcionan de manera fácil y rápida a comparación de otras técnicas de análisis convencionales. Los electrodos empleados son los SPE, estos pueden modificarse con diferentes estrategias para ampliar la señal. Algunas de las estrategias empleadas son la electrodeposición, uso de polímeros conductores, nanomateriales o estructuras metaloorgánicas [13]. Luego, se emplea un agente oxidante para activar la superficie con grupos funcionales, seguido de una inmovilización covalente, normalmente se emplea la cupla EDC-NHS donde se adhiere el bioreceptor. Posteriormente, se inhiben los sitios que no son de interés con albumina (BSA), estreptavidina o biotina/caseína, se lava el electrodo de trabajo con un buffer PBS o suplementado para eliminar el material no adsorbido, se calibra el electrodo de trabajo con  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  en KCl y finalmente se procede a realizar las medidas en tiempo real empleando un fluido biológico que está en la misma solución calibradora, normalmente se emplea plasma [28]. Algunas de las aplicaciones de los inmunosensores se presentan en la figura 7.

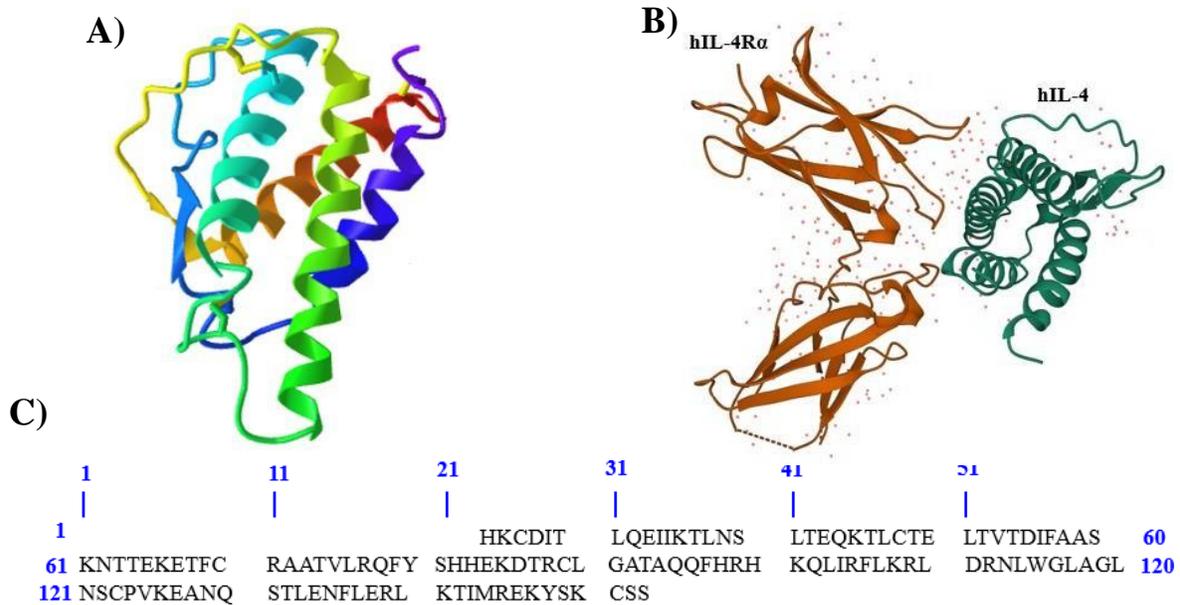


**Figura 7.** Aplicaciones de los inmunosensores electroquímicos.

### 5.3 Interleuquina4 humana

La hIL-4 (Fig 8A) es una glicoproteína monomérica compuesta de 129 aminoácidos con un peso molecular de 14.96320 kDa [2]. Se caracteriza por ser una citoquina inmunoregulatoria prototípica secretada por células Th2 CD4+, basófilos y mastocitos. La hIL-4 se encarga de la activación de la actividad de la Janus kinasa, coestimular y diferenciar células B, activar macrófagos y brindar una respuesta inmune. La hIL-4 también se conoce como factor estimulador de células B tipo 1, factor estimulador de linfocitos tipo 1 y Pitrakinra [2].

Esta citoquina se caracteriza por tener todos los aminoácidos del código estándar, siendo el ácido glutámico (7.8%), leucina (12.4%) y lisina (9.3%) los residuos con mayor composición en la secuencia de hIL-4 (Fig 8C). De acuerdo con los datos reportados en la base de datos de UniProt, hIL-4 posee un total de 14 residuos cargados negativamente (Asp+Glu) y 21 residuos totales cargados positivamente (Arg+Lys) [29]; su punto isoeléctrico teórico es de 9.26 y su coeficiente de extinción es de 0.592 M/cm. Adicionalmente, tiene en su posición 62 una N glicosilación correspondiente al aminoácido asparagina (N-glicosilación) y dispone de tres puentes disulfuros formados entre la posición 27 con 151, 48 con 89 y 70 con 123 donde se encuentran los residuos de cisteína [29]. La composición atómica de la hIL-4 son 653 carbonos (C), 1062 hidrógenos (H), 192 nitrógenos (N), 196 oxígenos (O) y 7 azufres (S). Por lo tanto, químicamente la hIL-4 es conocida con la formula  $C_{653}H_{1062}N_{192}O_{196}S_7$  [29]. En consecuencia, Una sobreexpresión de hIL-4 está asociada a la inflamación alérgica como son el asma y los diferentes tipos de alergias principalmente ocasionada por los alimentos o factores ambientales. El receptor de hIL-4 (Fig 8B) es un heterodímero compuesto por una subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  [30].



**Figura 8.** A) hIL-4(PDBe:1bbn) B) Complejo de hIL-4 con hIL-4Ra (PDBe:1iar) C) Secuencia de aminoácidos de hIL-4.

### 5.3.1 Relación entre interleuquina 4 con la inflamación alérgica y el síndrome hipereosinofílico

La relación de hIL-4 con la inflamación alérgica y el síndrome hipereosinofílico (HES sus siglas en inglés) ha sido bien establecida, cerca del 30% de la población mundial sufre de alergias de acuerdo con los datos de WAO y AAAAI. Muchos de los procesos alérgicos cursan con un incremento de los eosinófilos que causan daño en las vías aéreas. El 90% de las alergias corresponden a los alimentos y el 10% a factores del medio ambiente [3],[31],[32]. Se entiende por inflamación alérgica como el desorden de hipersensibilidad asociado al aumento en la producción de células Th. Las personas pueden presentar alergia a los medicamentos, a los alimentos como mariscos en países como Canadá, Estados Unidos y parte de México; la soya en Centroamérica y Suramérica; los lácteos y el pescado en Europa; nueces, maní y trigo en África y huevo en Australia principalmente. También, hay alergia a factores ambientales como el polen, pelo de mascotas, ácaros, pasto y moho. Los síntomas más comunes de la inflamación alérgica son picazón, lagrimeo de los ojos, estornudadera, dolor de cabeza, irritación y enrojecimiento, vomito, mareo, tos y dificultad para respirar (asma y choque anafiláctico). En la alergia como en HES hay un aumento de los eosinófilos. HES es un desorden caracterizado por el aumento de eosinofilia igual o mayor de  $1.5 \times 10^9/L$  en sangre [34]; los síntomas asociados a este tipo de síndrome es la fatiga, falta de aliento, dolor muscular, sarpullido y fiebre. La hIL-4 tiene un efecto indirecto en este aumento de eosinófilos al bloquear la producción de IFN- $\gamma$ , que es el responsable de una disminución en la eosinofilia [33].

El mecanismo de la inflamación alérgica se presenta con un alérgeno, una célula que presenta el antígeno, aumento de células Th2 (aumento de hIL-4) y células B productoras de IgE. En un segundo evento con el alérgeno, las IgE reconocen el alérgeno, este complejo (alérgeno/IgE) se

unen a los mastocitos que liberan entre otras moléculas histamina. En consecuencia, ocurre una degranulación de células como resultado de un alto contenido de histamina en el citoplasma de la célula. Para contrarrestar los síntomas de la inflamación alérgica, se suministran una serie de antihistamínicos. Por tal motivo, se requiere conocer la concentración de hIL-4 en plasma para usar la cantidad mínima de este tipo de medicamentos.

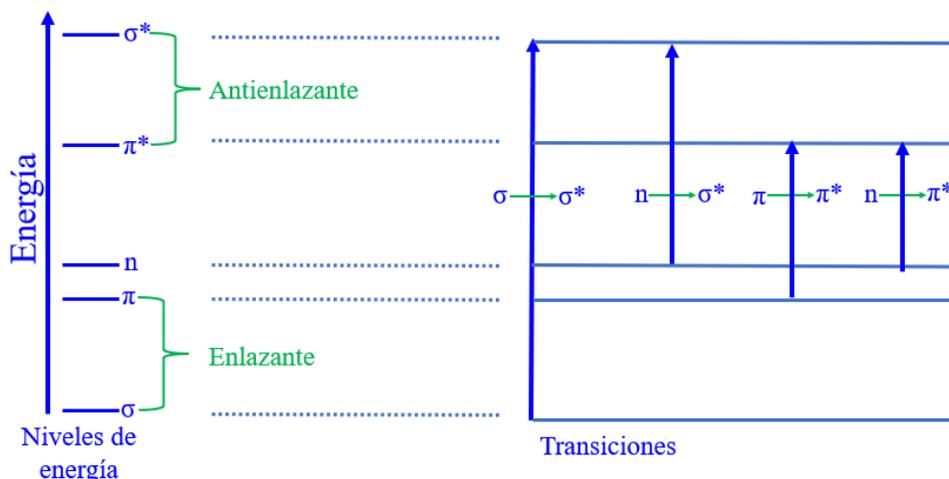
## 5.4 Técnicas analíticas para la síntesis de proteínas recombinantes

### 5.4.1 Espectroscopia de Absorción

La absorción espectroscópica emplea radiación electromagnética entre 200 nm y 800 nm [36] y es dividida entre regiones del ultravioleta (200 nm-400nm) y el UV-visible (400-780 nm). En espectroscopia, solo los efectos asociados con el elemento eléctrico de las ondas electromagnética son fundamentales. El principio de la adsorción son los electrones de valencia que se pueden encontrar en tres tipos de orbitales: 1) orbitales de enlace,  $\sigma$  y singletes; 2) orbitales  $\pi$  enlazantes; y 3) orbitales no enlazantes, es decir, con pares de electrones libres [36] (Fig 9). El orbital  $\sigma$  tiende a ser más bajo en energía que los orbitales  $\pi$  y no enlazantes. Cuando la onda de luz pasa a través del monocromador e impacta la muestra, esta adsorbe una radiación electromagnética con una frecuencia óptima que permite la transición de uno de los electrones de valencia a un orbital vacío, normalmente es un orbital antienlazante  $\sigma^*$  o  $\pi^*$ ; la diferencia de energía de un orbital a otro depende de los átomos presentes y la naturaleza del sistema de enlace. Así, las transiciones permitidas son  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$  y  $n \rightarrow \pi^*$ . El análisis cuantitativo de esta técnica analítica se hace mediante la Ley de Lambert Beer (Ec. 1) y se correlaciona entre la cantidad de luz adsorbida por la molécula. De esta manera, se puede cuantificar la concentración de la molécula de interés dentro de la muestra [37],[38][39].

$$A = \epsilon Cl \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde, A es absorbancia,  $\epsilon$  coeficiente de absorción molar o extinción ( $M^{-1}cm^{-1}$ ), C concentración molar (M) y l longitud del paso óptico (cm).



**Figura 9.** Transiciones electrónicas en espectroscopia UV-Visible.

### **5.4.2 Electroforesis SDS PAGE**

La electroforesis es un método de separación y análisis cualitativo de proteínas [40]. Existen diferentes tipos de electroforesis como lo son por movimiento de enlace, isotacoforesis, electroforesis de zona y enfoque isoeléctrico. El más utilizado es mediante movimiento de enlace, esta fue inicialmente descrita por Tiselius [41] y consiste en un gel de poliacrilamida con dos fases (fase de apilamiento y fase de separación). Este gel está compuesto por un 40% de poliacrilamida: 20% de bisacrilamida que es un agente reticulador. También, se emplea un detergente polar (SDS: dodecilsulfato sódico) para cargar las proteínas negativamente, glicerol, agua, TEMED (ácido de Lewis) y APS (base de Lewis); la función del TEMED y el APS es acelerar la reacción de polimerización. Luego, se siembran las muestras en cada pozo, se emplea una solución buffer con SDS y se aplica un campo eléctrico para que por diferencia de peso molecular las muestras migren del polo negativo al polo positivo en función de un tiempo determinado (depende de la proteína que se esté corriendo). Cabe anotar que todas las muestras deben de llevar un buffer de carga por dos razones: 1) aumentar la densidad de la proteína y para que esta permanezca en el fondo del pozo y 2) ver el frente de corrido. Posteriormente, se realiza una tinción con azul brillante de coomassie R250 o G250 que tiene una relación 1:1, es decir, por una molécula de R250 o G250 se tiñe una molécula de proteína. Este colorante no reacciona químicamente con las proteínas, pero si forma complejos no covalentes donde las interacciones predominantes son iónicas por los aminoácidos básicos presentes en las proteínas y las fuerzas de Van Der Waals; es importante resaltar que el porcentaje de interacción no es el mismo para todas las proteínas [42]. Finalmente, mediante una solución de desteñido (10:10:80 de ácido acético, metanol y agua) se elimina el colorante en exceso para obtener las bandas limpias y discriminadas; a través de esta tinción se puede detectar hasta 0.1 ug de proteína [42].

### **5.4.3 Lisis de bacterias por Sonicación**

La sonicación es un proceso fisicoquímico que consiste en convertir la energía del sonido en oscilaciones físicas que se utilizan para romper partículas grandes en solución en pequeñas partículas [43]. Esto se logra mediante un baño de ultrasonido o un sonicador que trasmite la energía vibracional que contiene la solución ocasionando que las partículas colisionen a altas velocidades y una frecuencia específica. De esta manera, se forma un efecto de cavitación acústico [43][44], es decir, la perturbación en solución crea burbujas microscópicas con espacios entre las moléculas formadas que crecen y colapsan implosivamente para emitir ondas de choque a la solución

### **5.4.4 Cromatografía por intercambio catiónico**

La cromatografía por intercambio catiónico (CIC) (Fig 10) es una técnica de separación de molécula ionizables de acuerdo a las diferencias de propiedades de carga. El principio de esta técnica consiste en las moléculas cargadas son separadas gracias a las fuerzas de atracción electroestáticas que pasan a través de una resina a un pH y temperatura específica [46]. La separación se lleva a cabo por un intercambio reversible de iones los cuales están presentes en la solución y en la resina de intercambio catiónico; estas se caracterizan por ser intercambiadores cargados negativamente y contienen contraiones cargados positivamente, es decir, que la columna retiene cationes. Las resinas intercambiadoras de cationes pueden ser de naturaleza ácido fuerte,

ácido intermedio o ácido débil. Cuando se habla de “débil” se refiere a que los grupos en la resina de CIC son titulables mientras si los grupos funcionales están cargados positivamente independiente del rango de pH utilizado se dice que es un intercambiador “fuerte” [46][47].

La interacción es fuerte cuando la fuerza iónica del buffer es baja y el enlace es fortalecido por la fuerza iónica de las biomoléculas cargadas y el pH. Las moléculas en solución y la resina son balanceadas por contraiones como los iones de sales y buffer [47], los cuales son desplazados cuando la molécula de interés se enlaza a la resina mediante su grupo funcional cargado. La carga de enlace neto de la proteína será la misma que la carga de los contraiones desplazados de la resina [47].

Para la purificación de proteína es necesario conocer la carga neta de la proteína a un pH específico. Es por ello, en un pH definido como su punto isoeléctrico (pI), la carga neta de la proteína es cero y no debe de interactuar con la resina cargada. Cuando el pH está por debajo del pI, la proteína tiene una carga positiva y en pH por encima de pI, la proteína posee una carga neta negativa [47]. La desorción de las proteínas enlazadas a la resina se logra incrementando la fuerza iónica/ conductividad del buffer, ya sea en continuo o por gradiente salino [46]. La conductividad se puede aumentar agregando NaCl al buffer o incrementando la concentración de los iones presentes en el buffer. También, la elución se puede presentar cambiando el pH, en otras palabras, aumentar el pH para CIC para favorecer la competencia iónica.

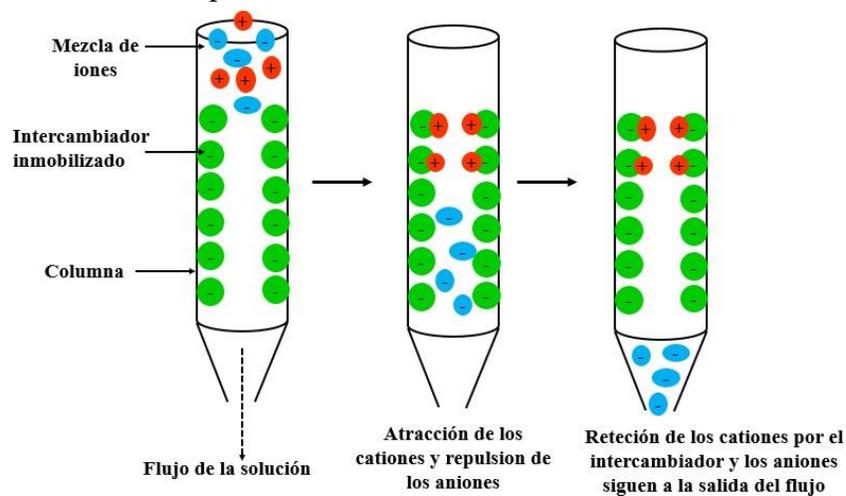


Figura 10. Representación esquemática de CIC.

## 5.5 Técnicas de verificación de plegamiento de proteínas recombinantes

### 5.5.1 Digestión con tripsina

La digestión con tripsina es una técnica analítica para verificar el plegamiento de una proteína, en otras palabras, examinar si la proteína tiene su estructura nativa. La tripsina (EC 3.4.21.4) es una enzima proteolítica de 23.746 kDa donde su precursor inactivo es el tripsinógeno formado por las células exocrinas del páncreas y secretado dentro del lumen del intestino [48]. El pH óptimo de activación es en el rango de 7.0-9.0 [48]. La enzima de digestión hidroliza los enlaces en las proteínas y péptidos del C-terminal de la lisina (K) y arginina (R) [48][49]. Las amidas y ésteres de estos aminoácidos también son digeridos y la reactividad aumenta siendo más fácil la ruptura de enlace de los péptidos, seguido las amidas y luego los ésteres [48]. De acuerdo con los reportes

presentados en la literatura, la digestión con tripsina se da a 37°C, pH constante y tiempo de incubación hasta 60 minutos aproximadamente; eso depende de la proteína de interés. Es un método muy utilizado y económico que se complementa con otras técnicas analíticas para la identificación y confirmación de que la proteína está plegada.

### 5.5.2 Espectroscopia Infrarroja

La espectroscopía infrarroja es una de las técnicas analíticas para determinar la estructura de moléculas pequeñas, a través de la vibración de los átomos en una molécula [50]. Un espectro IR es obtenido pasando radiación IR a través de la muestra de interés y estableciendo a una energía específica que fracción de radiación incidente es adsorbida [51][52]. De acuerdo con los reportes en la literatura, la energía a la que un pico de absorción resulta corresponde a la frecuencia de vibración de un parte de la molécula de la muestra de interés; las características químicas que debe tener una molécula para presentar absorción son: el momento dipolar eléctrico de la molécula debe estar cargado durante el movimiento y se debe comprender este momento dipolar cargado como vibraciones y rotaciones [52], es decir, que los enlaces pueden moverse en el plano (vibración de extensión simétrica o asimétrica); también se puede afectar el ángulo de enlace (vibración de balanceo y tijereteo) y fuera del plano hay cambio en el ángulo de enlace (rotación completa y media rotación) (Fig 11) [50][52].

Los espectrómetros infrarrojos se encuentran en el mercado desde 1940, pero solo en 1950 se introdujeron a máquinas dispersivas [52]. Posteriormente, resultaron los espectrómetros con transformada de Fourier (FT-IR) mejoran la calidad del espectro y minimiza el tiempo requerido en la medida. FT-IR funciona haciendo pasar a través de un interferómetro una radiación emergente proveniente de una fuente a la muestra antes de alcanzar el detector. Luego, se presenta una amplificación de la señal, gracias a dos cámaras donde el 50% de la radiación incidente es reflejada en dirección a la fuente y el otro 50% mediante un divisor de luz es transmitida, este haz de luz transmitido a 90°; este el dato analógico que es convertido por transformada de Fourier [52] (Ec 2,3 y 4).

$$I\delta = \int_0^{+\infty} B(\bar{\nu}) \cos 2\pi\bar{\nu} \delta d\bar{\nu} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $I\delta$  es la intensidad de caída en el detector,  $B(\bar{\nu})$  es la densidad de poder espectral a un número de onda específico  $\bar{\nu}$  y función  $\cos 2\pi$  es a una sola frecuencia

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I\delta \cos 2\pi\bar{\nu}\delta d\delta \quad \text{Ecuación 3}$$

Estas ecuaciones son el par de FT-IR y son interconvertibles. La segunda representa la variación de la intensidad como función del número de onda mientras la tercera ecuación representa la variación en la densidad del poder espectral como función de la diferencia de la longitud del camino, el cual es un patrón de interferencia [52]. Existen dos fuentes de error cuando se convierte el espectro IR inicial a un FT-IR; la primera, la etapa de integración de la transformación se hace en un desplazamiento infinito cuando se debe hacer en un desplazamiento finito [52]. La razón de esta aproximación se debe a la forma lineal espectral que puede demostrar un área de banda principal con lóbulos laterales positivos y negativos con amplitudes decrecientes; para eliminar

estos lóbulos se hace un proceso de anodización al multiplicar el interferograma por una función acertada antes de hacer la transformación de Fourier para que la intensidad del interferograma caiga suavemente a cero en sus extremos [52] como lo muestra la ecuación 4 y la segunda fuente de error son los intervalos de integración no son los mismos. Se necesita una corrección de los intervalos para que sean iguales al mismo a cada lado del primer intervalo y la diferencia de camino sea cero.

$$F(D) = [1 + \cos(\pi D)]/2 \text{ Ecuación 4}$$

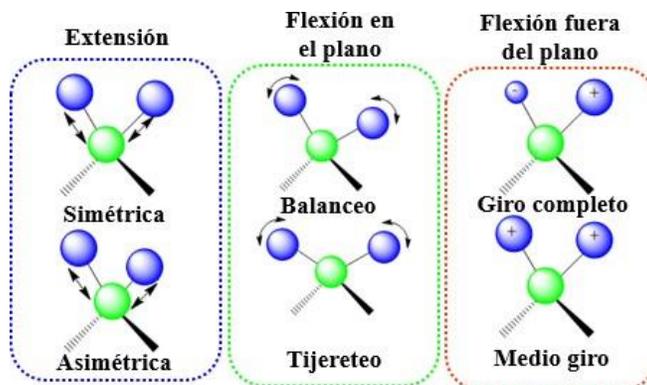
D es la diferencia del camino óptico y la función coseno genera una reducción en las oscilaciones y el deterioramiento en la resolución espectral.

Algunas ventajas de FT-IR son la velocidad de escaneo, el mejoramiento en la señal del ruido con relación a la raíz cuadrada del número de elementos monitoreados y la habilidad de moverse en distancias cortas rápidamente.

Existen varios métodos de muestreo en FT-IR, entre ellos está el método de transmisión (es el más usado para muestras líquidas, sólidas y gaseosas), reflectancia (empleada para muestras que son difíciles de analizar por transmitancia convencional), micromuestreo (combina espectrómetro IR con microscopía), entre otras técnicas de acople [52]. Por tal motivo, la espectroscopía IR es una técnica dispersiva muy común para caracterizar polímeros, moléculas biológicas, sistemas biológicos (lípidos, proteínas, péptidos, biomembranas, células microbianas, ácidos nucleicos, tejido animal, muestras clínicas y plantas [52]), en la industria farmacéutica y análisis de muestras ambientales (agua, aire, suelos).

En las proteínas, es característico percibir las vibraciones de las unidades repetidas que conforman la proteína resultan en frecuencias características en la región de IR medio ( $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ ) correspondientes a las bandas amidas; los diferentes patrones de absorción del enlace de hidrogeno, las interacciones dipolo-dipolo y la orientación geométrica en las estructuras  $\alpha$  hélices, hojas  $\beta$  y bucles (loops) implica frecuencias vibracionales diferentes del enlace C=O y N-H que son correlacionadas con el plegamiento estructural secundario de la proteína [50]. La banda amida I ( $1700-1600 \text{ cm}^{-1}$ ) nativa de la extensión del enlace C=O y la flexión en fase del enlace N-H; la vibración del grupo funcional amida ha sido identificada por ser la más sensible dentro de la estructura secundaria [53]. En cambio, se ha encontrado que la banda amida II ( $1600-1500 \text{ cm}^{-1}$ ) que se origina de la flexión del enlace N-H y la extensión del enlace C-N, también son vibraciones perceptibles en la estructura de la proteína [54].

Una de las limitaciones de trabajar con proteínas solubles en agua es la fuerte absorbancia de vibración de enlace H-O-H ubicado a  $1645 \text{ cm}^{-1}$ , que se solapa con la banda amida I de la proteína. Es por ello, que se restringe a longitudes  $< 10 \text{ um}$  [50] para prevenir este fenómeno. Es importante resaltar que se requieren altas concentraciones de la proteína para aumentar la intensidad de las bandas de IR [55].



**Figura 11.** Modos vibracionales en los enlaces C=O y NH en el FT-IR.

## 5.6 Técnicas de caracterización de la interacción anticuerpo-citoquina

### 5.6.1 ELISA

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es una técnica experimental rápida, de alto rendimiento y es un inmunoensayo cuantitativo para la detección selectiva de antígenos o anticuerpos [56]. Una ELISA consiste en la captura y detección intervenida por anticuerpos de un antígeno con un sustrato medible. El antígeno puede ser proteínas, péptidos, hormonas o un anticuerpo inmovilizado sobre la superficie sólida del plato de ELISA y luego se forma un complejo con un anticuerpo primario o secundario que está marcado con una enzima, la cual puede ser fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano (HRP) [56]. De acuerdo con los reportes de la literatura, la HRP tiene un tamaño de 40 kDa mientras AP pesa 140 kDa [56]; un tamaño más pequeño de la enzima permite que más moléculas se acoplen a los anticuerpos o avidina. Por ello, HRP es más empleada que AP porque se puede unir un mayor número de sustratos. La adición de sustratos (como el 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)) ocasiona productos de reacción colorimétricos, fluorescentes o luminiscentes que permiten determinar la concentración de los reactivos de interés a muy bajos niveles, ya sea con HRP o AP [56].

## 5.7 Técnicas de caracterización de inmunosensores electroquímicos

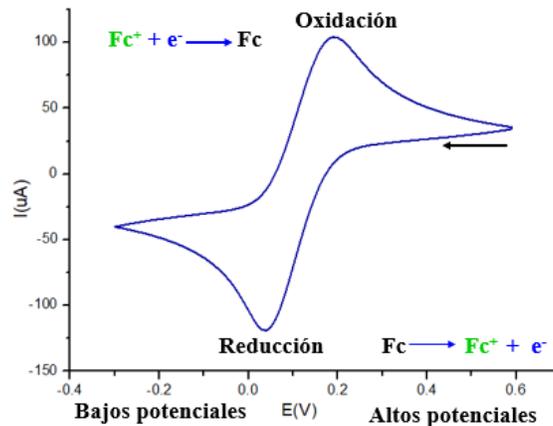
### 5.7.1 Voltametría Cíclica

La voltametría cíclica (VC) es una técnica electroquímica muy usada para investigar los procesos de oxidación y reducción de especies moleculares. También, VC es utilizada para estudiar la transferencia de electrones en reacciones químicas (catálisis). Un voltagrama es un gráfico de potencial (E) aplicado en función de la corriente (i) [57]. Existen dos convenciones para interpretar un voltagrama, la primera es la convención US, consiste en partir de un barrido de izquierda a derecha, es decir, de altos potenciales a bajos potenciales, teniendo en la parte superior del gráfico la reducción y en la parte inferior del gráfico la oxidación y la segunda convención es IUPAC, se caracteriza por hacer un barrido de derecha a izquierda partiendo de altos potenciales a bajos potenciales, logrando representar en la parte superior el proceso de oxidación y en la parte inferior la reducción (Fig 12). De hecho, esta última convención es la más usada. De acuerdo con la literatura, los voltagramas tienen forma de “pato” debido a que describe el equilibrio entre la especie oxidada y reducida mediante la ecuación de Nernst (Ec.5) [57]. La ecuación de Nernst

relaciona el potencial de la celda ( $E$ ) a un potencial estándar de una especie ( $E^0$ ) y las actividades relativas del analito oxidado (Ox) y reducido (Red) en el sistema de equilibrio [57].

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \log_{10} \frac{[Ox]}{[Red]} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde  $E^{0'}$  es el potencial formal a ciertas condiciones.  $R$  es la constante de los gases,  $T$  corresponde a temperatura,  $n$  es el número de electrones transportados (se considera como  $1e^-$ ),  $F$  es la constante de Faraday y  $[Ox]$  y  $[Red]$  concentración de las especies.



**Figura 12.** Representación esquemática de un gráfico VC.

Por otro lado, el volumen de solución en la superficie del electrodo que contiene la especie reducida se conoce como capa de difusión, este crece hasta el pico de corriente catódica, allí lentamente empieza a decrecer la corriente y se favorecen el proceso de transporte de masa de la especie oxidada [57]. Cuando se genera el cambio de potencial en dirección anódica, el barrido va en dirección invertida aumentando la concentración de la especie reducida para llegar a su punto de partida, satisfaciendo la ecuación de Nernst.

Si el proceso de reducción es electroquímicamente reversible, la separación entre pico y pico ( $\Delta E_p$ ) es de 57 mV a 25 C° y el ancho en el máximo pico es de 59 mV [57]. Para los procesos de transferencia de electrones reversibles implica especies redox que se difunden libremente, este fenómeno es explicado por la ecuación de Randles-Sevcik (Ec.6) [58].

$$i_p = 0.446nFAC^0 \left( \frac{nFvD_0}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Los términos de la ecuación se refieren  $i_p$  es el pico de corriente,  $v$  es flujo de barrido (V/s),  $n$  es el número de electrones transferidos en el proceso redox,  $A$  ( $cm^2$ ) corresponde al área de superficie electroactiva,  $D_0$  ( $cm^2/s$ ) es el coeficiente de difusión del analito oxidado y  $C^0$  ( $mol/cm^3$ ) es la concentración del analito en la solución. Asimismo, la ecuación 6 se puede emplear para despejar el área electroactiva del electrodo de trabajo y el coeficiente de difusión del analito. En resumen, la voltametría fue la primera técnica electroanalítica empleada para estudiar el comportamiento capacitivo o pseudocapacitivo de un material.

### 5.7.2 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica

La espectroscopía de impedancia electrónica (EIE) es una técnica analítica reciente empleada para realizar medidas electroquímicas y una de sus aplicaciones es en biosensores. En una celda electroquímica convencional se evidencia interacciones en el electrodo con las especies redox

presentes en la solución, donde la concentración de las especies, la transferencia de carga y la transferencia de masa, asimismo, la resistencia del electrolito están presentes; cada una de estas circunstancias son modeladas por un circuito eléctrico que consiste en resistencias, capacitores o elementos de fase que están conectados en paralelo o en serie para formar un circuito equivalente [58]. De esta manera, EIE puede ser empleada para estudiar procesos de transferencia de carga, masa y difusión [11]. La impedancia es diferente a la resistencia, debido a que la resistencia percibida en circuitos DC obedece directamente a la ley de Ohm. También, la respuesta de la celda en EIE es pseudolineal donde un desplazamiento de fase es logrado mientras una respuesta de corriente a un potencial sinusoidal es una curva de la función seno a una frecuencia aplicada [11]. De este modo, la señal de excitación es mostrada en función del tiempo como lo modela la ecuación 7

$$E_t = E_0 * Sen (wt) \text{ Ecuación 7}$$

Donde  $E_t$ ,  $E_0$  y  $w$  indican el potencial en el tiempo  $t$ , la amplitud de la señal y la frecuencia radial. La correlación entre la frecuencia radial ( $w$ ) y la frecuencia ( $f$ ) aplicada es calculada por la ecuación 8:

$$w = 2\pi f \text{ Ecuación 8}$$

En un sistema lineal, la señal es desplazada en fase ( $\Phi$ ) y presenta una amplitud diferente de  $I_0$  (Ec.9)

$$I_t = I_0 * Sen (wt + \Phi) \text{ Ecuación 9}$$

Precisamente, la impedancia de un sistema entero puede ser obtenida de la ecuación 10, como:

$$Z = \frac{E}{I} = Z_0 e^{(i\Phi)} = Z_0 (\cos \Phi + i \text{sen} \Phi) \text{ Ecuación 10}$$

Donde  $Z$ ,  $E$ ,  $I$ ,  $w$  y  $\Phi$  son impedancia, potencial, corriente, frecuencia y desplazamiento de fase entre E-I. Cabe anotar que la impedancia es expresada en términos de magnitud,  $Z_0$  y  $\Phi$ .

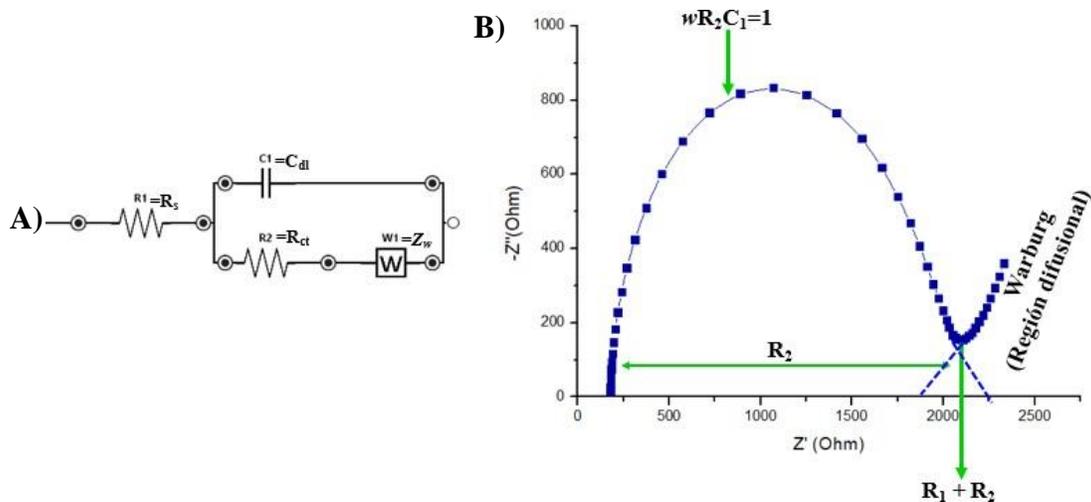
La representación de EIE está dividida en una parte real ( $Z_{\text{real}}$ ) en el eje x y una imaginaria ( $Z_{\text{inag}}$ ) en el eje y, se forma una curva de Nyquist (Fig 13A) ; cada punto en la curva de Nyquist es un valor de impedancia a una frecuencia específica [11]. La impedancia en el eje X va de altas frecuencias en el lado izquierdo y bajas frecuencias en el lado derecho mientras  $Z_{\text{inag}}$  es negativo. No obstante, la impedancia puede ser modelada como un vector de longitud  $|Z|$ . El ángulo que se forma entre el vector  $|Z|$  y el eje x se conoce como ángulo de fase [11].

La impedancia es medida aplicando una onda de potencial al electrodo de trabajo y el resultado registrado es la onda de corriente. De las dos ondas anteriores se esbozan  $Z$ ,  $\Phi$ ,  $Z_{\text{real}}$  y  $Z_{\text{inag}}$  [11]. De acuerdo con la información reportada en la literatura, el primer reporte de EIE fue realizado en 1975[59]. Existen dos formas de expresar EIE, Faradaica y no Faradaica. En la primera, la impedancia es producida cuando las reacciones redox están presentes y en la segunda es una impedancia apoyada en DC, sus características eléctricas son expresadas por la capacitancia de doble capa. La transferencia de electrones a través de la superficie del electrodo es producida como una corriente faradaica, la cual es empleada para análisis cuantitativo [60]. Es importante resaltar, la curva de Nyquist es normalmente empleada para análisis de procesos resistivos [61]. Para hallar la impedancia neta del circuito, se aplica la ley de Ohm, consiste en sumar las impedancias de cada elemento [62][11].

En otro orden de ideas, la difusión de moléculas o especies redox pueden establecer una resistencia adicional llamada impedancia de Warburg (W); esta impedancia es dependiente de la frecuencia. De esta forma, W es pequeña a altas frecuencias, donde los reactantes se difunden poco mientras a bajas frecuencias, las especies redox presentan mayor fuerza para difundirse y por ende aumenta la resistencia de Warburg. En la curva de Nyquist, la impedancia de Warburg es representada como una regresión lineal con una pendiente de  $45^\circ$  [11].

Los procesos electroquímicos evalúan fenómenos de interfase. Por ello, son modelados con un circuito eléctrico equivalente para comprender los componentes individuales de un sistema EIE. Estos componentes son: resistencia de solución ( $R_s$ ), resistencia de doble capa en la superficie del electrodo de trabajo ( $C_{dl}$ ), resistencia a la transferencia de carga ( $R_{ct}$ ) y la resistencia de Warburg ( $Z_w$ ) los cuales son simplificados en un circuito equivalente de Randles (Fig 13B) [63].

Experimentalmente, el capacitor perfecto no existe, se tiene es un elemento de fase constante aplicado para modelar un comportamiento no ideal. Es importante destacar, la forma de la curva de Nyquist es resultado de la composición del electrodo de trabajo y la respuesta electroquímica es producto de la superficie del electrodo o en el seno de la solución. Asimismo, se puede generar curvas de Nyquist en forma de un solo semicírculo, dos semicírculos o dos semicírculos medios para un procedimiento electroquímico particular [63][11].



**Figura 13.** EIE A) Circuito Equivalente de Randles B) Curva de Nyquist.

### 5.7.3 Cronoamperometría

La cronoamperometría (CA) consiste en aplicar un potencial constante al electrodo de trabajo y medir la corriente en función del tiempo [58]. Es muy empleada para cuantificar analitos en sistemas fluidos y en sensores portables. CA cumple con el principio de la ecuación de Cottrell (Ec.11).

$$i(t) = nFAC \left( \frac{v}{\pi t} \right)^{\frac{1}{2}} = \frac{k}{(t)^{\frac{1}{2}}} \text{ Ecuación 11}$$

Donde n, F, A, C, D, t y i corresponden al número de electrones, constante de Faraday, área de superficie del electrodo, concentración del analito (especie activa electroquímicamente), coeficiente de difusión, tiempo y corriente.

La ecuación de Cottrell es una derivada de la segunda ley de difusión de Fick. Esta ecuación permite encontrar el coeficiente de difusión D (cm<sup>2</sup>/s) de las especies electroactivas presentes en la superficie del electrodo de trabajo. La ecuación de Cottrell solo puede ser usada cuando la corriente es difusional y la solución no necesita estar en agitación [40].

Cuando se obtiene el gráfico de cronoamperometría, en el eje x se representa el tiempo mientras en el eje y la corriente; estas dos variables son inversamente proporcionales. Por ello, su forma es un decrecimiento exponencial a potencial negativo y un crecimiento exponencial a potencial positivo. Este potencial es dado por el electrodo de trabajo y el potencial incrementa en CA del punto donde la reacción no faradaica toma lugar, allí la concentración de las especies electroactivas se convierte en cero. Es por ello, el perfil de corriente decrece [64].

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Expresión de rhIL-4

#### 6.1.1 Células competentes por el método de Cloruro de Rubidio (RbCl)

Se incubó durante la noche 1mL de cultivo de *E. coli* (Cepa BL-21) en 100 mL de medio LB y kanamicina (kan) a 50ug/mL a 37 °C a 150 rpm en un agitador orbital (shaker BIOBASE). Al día siguiente, 1 ml de cultivo fue nuevamente inoculado en 100 mL de medio LB y se crecieron las células a 37 °C a 150 rpm hasta que la densidad óptica (OD<sub>600nm</sub>) del cultivo fue 0.4 (Multiskan go de Thermo Fisher). Las células se concentraron por centrifugación a 4500 rpm por 5 min a 4 °C (Hermle ZK 32). Posteriormente, se resuspendió el precipitado de bacterias en 40 mL de buffer I frío y se dejó en hielo por 15 min. Luego se centrifugó el cultivo a 4500 rpm por 5 min a 4 °C. Paso seguido, se resuspendió nuevamente el precipitado en 10 mL de buffer II frío, y dejadas en hielo por 15 min. Finalmente, se alicuotaron a 200 uL, congeladas por baño en nitrógeno líquido y almacenadas a -74 °C hasta su uso.

**Medio LB (para un 1L)**

10g de triptona

5 g de extracto de levadura

10 g de NaCl

Se ajustó el pH entre 7.2-7.4 con NaOH 2M.

Esterilizado por medio de autoclave y finalmente se almacenó a temperatura ambiente.

**Buffer I (para 40 mL)**

30 mM de CH<sub>3</sub>COOK

100 mM de RbCl

10 mM de CaCl<sub>2</sub>

50 mM de MgCl<sub>2</sub>

15% V/V de glicerina (6.0 mL)

pH de 5.8.

**Buffer II (para 50 mL)**

10 mM de MOPS

10 mM de RbCl

75 mM de CaCl<sub>2</sub>

15% V/V de glicerina

pH de 6.5.

**6.1.2 Transformación bacteriana**

Se mezclaron de 100 uL de *E. coli* competentes por RbCl con 10 ng del plásmido pQE-82L de a que contenía el gen de hIL-4 y resistente a kan. El control fueron células sin el plásmido. Ambos viales se incubaron en hielo por 30 min. Luego, la mezcla se colocó en un baño maría a 42 °C por 1 min y de nuevo se llevaron los viales a un baño de hielo 2 min. Posteriormente, a cada vial se le agregaron 300 uL de medio LB sin kan, y se incubaron con agitación en un agitador orbita a 150 rpm a 37 °C durante 1 h. Después, 200 uL de cada vial fueron colocados en cajas de Petri con agar y 50 ug/ml de Kan, y esparcidos con asa de vidrio. Luego, las cajas de Petri fueron colocadas en una incubadora a 37 °C toda la noche para el crecimiento de las colonias.

**Preparación de cajas petri**

Se tomaron 100 mL de medio LB, se agregó 1.5 g de agar y un agitador magnético. Se autoclavó durante media hora. A continuación, se dejó enfriar hasta 35 °C. En ese punto se le adiciono 100 uL de kanamicina 50 mg/mL y se sirvieron las cajas en una atmosfera estéril. Por último, se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

**6.1.3 Expansión del cultivo y preparación de cuerpos de inclusión**

Una colonia fue crecida durante la noche con 100 mL de medio LB más kan a 50 ug/mL, a 37 °C y 150 rpm. Luego, se expandió en 2.0 L de medio LB con kan más 50 ug/mL a 37 °C y a 150 rpm hasta que alcanzo una OD<sub>600 nm</sub> entre 0.5. Luego, la expresión de hIL-4 se indujo agregando IPTG a una concentración final de 0.5 mM por 3 h. Cada hora 1 ml fue sacado de cultivo para analizar

la expresión de la proteína por SDS-PAGE al 12%. De acuerdo con el protocolo de Irina Wietek [65], las células se concentraron por centrifugación a 4500 rpm, 4 °C. El precipitado se resuspendió en 30 mL buffer TE pH 8.0. Después de esto, la suspensión bacteriana se centrifugó a 6000 rpm por 10 min; el precipitado se resuspendió en 10 volúmenes de buffer TE (vol/masa) y se congeló a -20 °C. Posteriormente, se añadió buffer TE a la suspensión celular descongelada hasta aproximadamente 50 volúmenes de masa húmeda (la obtenida antes de congelar). Las células bacterianas se lisaron 8 veces (cada 30 segundos sonicación seguido por 30 segundos de descanso) a 300W. Durante la lisis, la solución se mantuvo en hielo. La suspensión se centrifugó a 11000 rpm por 30 min a 4 °C (Hermle ZK 32). Seguido de esto, el precipitado se resuspendió y se lavó una sola vez con 100 mL de buffer TE y luego se centrifugo a 11000 rpm por 20 min. El precipitado final se resuspendió en 10 volúmenes de buffer TE (vol/masa)

### **Gel SDS-PAGE 12%**

40:20 Poliacrilamida/bisacrilamida (1.5 mL)

Buffer de corrido 4x: 1.5 M Tris-HCl, 0.4% SDS, pH 8.8 (1.25 mL)

87% glicerina (1.0 mL)

H<sub>2</sub>O (1.25 mL)

TEMED (10uL)

40% APS (10 uL)

Buffer de corrido 1x (para 1L): 25mM Tris-HCl, 190 mM glicina, 0.10% SDS

Solución de tñido: 0.25% azul brillante de Coomassie R250 en solución de desteñido

Solución de desteñido: 10% CH<sub>3</sub>COOH, 10% CH<sub>3</sub>OH, 80% H<sub>2</sub>O

Condiciones de corrido: 300 V, 400 mA por 35 min aproximadamente.

### **Preparación de muestras para gel SDS-PAGE 12%**

Se centrifugaron los viales a 15000 rpm por 1 min (centrifuga para tubos eppendorf de 1.5 mL THERMO SCIENTIFIC), los precipitados se les agrego aproximadamente 50 uL de buffer no reductor a cada uno y se desnaturalizaron por calor a 95 °C por 5 min. Por último, se sembraron en el gel SDS- PAGE al 12 %.

### **Buffer TE**

10 mM Tris- HCl

1.0 M EDTA pH 8.0

### **6.1.4 Renaturalización de la rhIL-4**

Según el protocolo de Irina Wietek [65], la suspensión que contiene los cuerpos de inclusión se le agregaron lentamente 3 volúmenes de 6M de GuHCl y 0.1% (por volumen) de 2-mercaptoetanol. La mezcla se agitó por 30 min a temperatura ambiente y luego se centrifugo a 11000 rpm por 15 min a 4 °C. Posteriormente, 4 volúmenes de H<sub>2</sub>O estéril y autoclavada se añadieron gota por gota al sobrenadante. La muestra se centrifugo a 11000 rpm por 20 min a 4 °C. A continuación, se prosiguió a dializar el sobrenadante contra 20 volúmenes de PBS pH 7.4 por 16-20 h a 4 °C en una membrana de 5 kDa de tamaño de poro (MWCO, Membrana Spectra-port 3). Después de esto, la primera suspensión turbia se ajustó a un pH 5.0 y se empleó 4M CH<sub>3</sub>COOH y después se centrifugo a 11000 rpm por 20 min a 4 °C. La proteína contenida en el sobrenadante se concentró a un volumen de 5-10 mL mediante un sistema amicon con una membrana YM3 de poro 3.5 kDa (MWCO) y una presión máxima de 75 psi (Amicon 8050 UltraFiltration Stirred Cell de

MILLIPORE) y se cuantificó con absorbancia a 280 nm. La hIL-4, se purificó por cromatografía de intercambio catiónico siguiendo el protocolo reportado por Irina Wietek [65].

#### **Buffer 6M GuHCl**

6M GuHCl  
100 mM Tris-HCl pH 8.0

#### **Buffer PBS**

120 mM NaCl  
2 mM KCl  
3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
El pH del buffer se ajustó a 7.4

### **6.1.5 Purificación de hIL-4 por cromatografía de intercambio catiónico**

Buffer A: 25mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 5.0  
Buffer B: 25mM NH<sub>4</sub>OAc, 1.0 M NaCl pH 5.0  
Columna: 2.5\*20 cm  
Intercambiador catiónico: SP-Sefarosa  
Detector: UV (280 nm)  
Colector: F1 (tubos 12-13 mm \*100 mm)  
Bomba: F10  
Presión máxima de precolumna: 70 psi  
Presión máxima del delta de columna: 50 psi  
Equipo: Cromatógrafo NGC (Biorad)  
Software: ChromLab. Versión: 2.0.0.24

SP-Sefarosa de flujo isocrático (1mL/min) se equilibró con 20 mL del buffer A hasta alcanzar el pH 5.0. Luego, la columna se cargó con 10 mL de hIL-4 a un flujo de 1 ml/min. La columna fue lavada con 30 mL del buffer A para eliminar contaminantes. La elución de hIL-4 se realizó por un gradiente salino de 0 a 100% de NaCl con una velocidad de flujo de 1mL/min. Se colectaron fracciones 1.0 mL y la cantidad de proteína se analizó en un gel SDS-PAGE. En adición, las muestras se prepararon como se mencionó en la sección 6.1.3. Las fracciones, las cuales tenían la proteína pura en una cantidad suficiente se combinaron y luego se dializaron 20 volúmenes de PBS pH 7.4 durante 16-20 h a 4 C° para eliminar el alto contenido de sales. Posteriormente, la hIL-4 se cuantifico a una absorbancia de 280 nm y se liofilizo

### **6.2.1 Digestión con tripsina**

La digestión con tripsina se realizó a una relación 100:1 proteína: tripsina, es decir, se emplearon 500 ug de IL-4 resuspendidos en 100 uL de buffer (100 mM Tris pH 8.5) para alcanzar una concentración de 5 ug/uL. La tripsina se preparó a una concentración de 0.5 ug/uL en el mismo buffer. La hIL-4 se alícuotó de 50 uL en dos viales (250 ug/vial). Para tener la proteína desnaturalizada, un vial se sometió a 95 °C por 5 min, y luego se llevó a 10 min en baño de hielo (4°C). El vial 1 fue la proteína desnaturalizada y el vial 2 la proteína renaturalizada. Posteriormente, 5 uL de hIL-4 desnaturalizada fue agregada a 5 viales de 200 uL, y 5 uL de IL-4 plegada se agregaron a otros 5 viales de 200 uL (ensayo pareado). De cada muestra se tomó un vial como control y a los viales restantes se les adicono 5 uL tripsina a una concentración de 0.5

ug/uL. Las muestras se incubaron a 37 °C por 0, 1, 5, 10, 15 y 30 min. Terminado el tiempo para cada una de las muestras, se les agrego 10 uL de buffer de carga no reductor e inmediatamente se llevó a 95 °C por 5 min. Después de esto, se corrió un gel SDS-PAGE al 12%.

### 6.2.2 Espectroscopía Infrarroja con FT

Se tomó un vial liofilizado de hIL-4 y se resuspendió en buffer PBS comercial para obtener una concentración de 2 mg/mL. El blanco de la medida fue el buffer PBS comercial (se inyectó 10 uL) y luego de blanquear 10 uL de 2 mg/ mL de hIL-4. La medida para identificar la banda amida de hIL-4 se realizó con un ESPECTROFOTÓMETRO IR TENSOR II de BRUKER y la celda AQUASPEC a 20 °C.

## 6.3 Caracterización de la interacción de anti-rhIL-4 con rhIL-4

### 6.3.1 ELISA

Para verificar la interacción de anti-hIL-4 con hIL-4 se llevó a cabo un ensayo de ELISA de acuerdo a la tabla 1. Para ello, se prepararon los stocks reportados en la tabla 2 y se tomó para cada pozo 100 uL de hIL-4 en la columna 1 y 2, PBS comercial la columna 3 y anti- hIL-4 en la columna 4; se incubaron a 4 °C toda la noche.

**Tabla 1.** Diseño del experimento de interacción de ELISA. Control positivo (CP), control negativo (CN). Cada pozo esta por duplicado.

	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4
A	CP hIL-4	CN anti-hIL-4	CN BSA	CP anti hIL-4
B	CP hIL-4	CN anti-hIL-4	CN BSA	CP anti hIL-4

**Tabla 2.** Soluciones Stock de rhIL-4 y anti-rhIL-4.

	Stock rhIL-4 (100 µg /mL)
<b>Volumen total (µL)</b>	450
# µL hIL-4 (2 mg/ mL)	22.5
# µL PBS 1X, pH 7.4	427.5
	Stock anti-rhIL-4 (10 µg/ mL)
<b>Volumen total (µL)</b>	200
# µL anti-hIL-4 (10 µg/ mL)	2
# µL PBS 1X, pH 7.4	198

Al día siguiente, se lavó 3 veces con 300 uL de PBST y se adicionó de la solución stock reportada en la tabla 4, 250 uL de buffer bloque (5% BSA-PBS) (ver tabla 3) y se incubó a temperatura ambiente por 1 h.

**Tabla 3.** Soluciones Stock de 5% BSA-PBS.

	5% BSA-PBS
<b>Volumen total (µL)</b>	2000
# mg BSA (5%)	100
# µL PBS 1X, pH 7.4	1500

Pasada una hora, se lavó 3 veces con 300 uL de PBST y se agregó de la solución stock (tabla 4) 100 uL de anti-hIL-4 en las columnas 1 y 3; y PBS en las columnas 2 y 4. De nuevo, se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Paso seguido, se procedió a lavar 3 veces con 300 uL de PBST y se añadió de la solución stock (tabla 5) 100 uL del anticuerpo secundario anti-IgG-HRP y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Luego, se lavó 3 veces con 300 uL de PBST, se adicionó 100 uL de TMB, se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Después, se procedió con la lectura del plato de ELISA con el software Skanlt Software 6.0.1 for microplate Readers RE, ver. 6.0.1.6 con una compensación de respuesta óptica; el instrumento Varioskan LUX, versión ESW 1.00.38, n° de serie: 3020-80067, adaptador de 96 pozos para plato sin luz, 2 es el número de adaptador de la placa, activación de incubadora, dispensador 1 y óptica superior e inferior. Adicionalmente, el orden de medición fue de 3, la longitud de onda empleada fue 650 nm en un tiempo de medición de 100 ms a una temperatura de 23.1 °C y una calibración fotométrica 1.0 31033.

**Tabla 4.** Soluciones Stock de anti-rhIL-4.

	<b>Stock anti-rhIL4</b>
<b>Volumen total (µL)</b>	500
# µL anti-hIL4	5
# mg BSA (1 %)	5
# µL PBS 1X, pH 7.4	495

**Tabla 5.** Soluciones Stock de anti-IgG-HRP.

	<b>Stock anti-IgG-HRP</b>
<b>Volumen total (µL)</b>	2000
# µL Anti-IgG-HRP	1
# mg BSA (1%)	20
# µL PBS	1999

## 6.4 Diseño del biosensor de detección electroquímico de rhIL-4

### 6.4.1 Método 1: Voltametría Cíclica y Espectroscopía de Impedancia Electroquímica

#### Condiciones de VC

Tiempo de calibración: 2 s

Potencial de inicio: 0.6 V

Potencial vertex 1: -0.3

Potencial vertex 2: 0.6 V

Paso de potencial: 0.01 V

Velocidad de escaneo: 0.05 V/s

Número de escaneos: 3

Rango de corriente: 1nA a 10 mA (1 uA)

#### Condiciones de EIE

Tiempo de calibración: 5s

Tipo de escaneo: Potencial mezclado

Potencial dc: 0.105 V  
Potencial ac: 0.01V  
Tipo de frecuencia: Escaneo  
# frecuencias: 57=9.8 /dec  
Max frecuencia: 50000.0 Hz  
Rango de corriente: 1nA a 10 mA (1 uA)

Se emplearon electrodos serigrafiados de tinta de carbono para desarrollar el dispositivo de detección. Inicialmente, se examinó como se encontraba la superficie del electrodo de trabajo (tinta de carbono), electrodo de referencia (plata) y electrodo auxiliar (platino) con 60 uL de 5mM de la cupla  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  y se procedió hacer la medida por CV y EIE. Luego se lavó con  $H_2O$  destilada y se secó. Se activo la superficie del electrodo de trabajo con 60 uL de 10mM de PTAA (contiene 0.1 M de  $LiClO_4^-$ ) por 300 s. Luego se lavó con  $H_2O$  destilada y se secó. De nuevo, se midió con 60 uL de 5mM de la cupla  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  y se procedió hacer la medida por CV y EIE; se lavó con  $H_2O$  destilada y se secó. Después, se inmovilizo la superficie del electrodo con 20 uL de la cupla EDC/NHS por 1 min, se lavó con  $H_2O$  destilada, se secó y con 60 uL de 5mM de la cupla  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  y se procedió hacer la medida por CV y EIE; se lavó con  $H_2O$  destilada, se secó y se adiciono 20 uL de 100 ug/uL de anti-hIL-4 que se encuentra en buffer PBS comercial y se dejó interactuar con la superficie durante 2h en una cámara húmeda a 4°C. Después de este tiempo, se lavó con PBS 1X, se secó y con 60 uL de 5mM de la cupla  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  y se procedió hacer la medida por CV y EIE. A continuación, se agregó 20 uL de 1% de BSA que se encuentra en buffer PBS comercial para bloquear los sitios donde no se enlazo anti-hIL-4 por 30 min en una cámara húmeda a 4°C, se lavó con PBS 1X, se secó y con 60 uL de 5mM de la cupla  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  y se procedió hacer la medida por CV y EIE. Posteriormente, se estabilizó la superficie con 20 uL de PBS 1X por 60 min en una cámara húmeda a 4°C, se lavó con PBS 1X y se secó. Paso seguido, se adicionó 20 uL de 1 ug/ uL de hIL-4 que se encuentra en buffer PBS comercial durante 12h en cámara húmeda a 4°C. Por último, se lavó con PBS 1X, se secó y con 60 uL de 5mM de la cupla  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  y se procedió hacer la medida por CV y EIE donde se observó la detección de la hIL-4. Todas las medidas se hicieron por triplicado usando el potenciostato MultiPalmSens4 y el software MultiTrace 4.3; el diseño del dispositivo de detección fue por duplicado.

#### **Preparación de la cupla EDC/NHS (para 100 uL)**

80 mM EDC (1.47 uL)  
25 mM MES pH 6.0 (88.5uL)  
20 mM NHS (10 uL)

#### **6.4.2 Método 2: Cronoamperometría**

Se usaron electrodos serigrafiados de oro. El electrodo de trabajo y auxiliar eran de oro mientras el electrodo de referencia era de plata. Se empleó 60 uL de 1M de  $H_2SO_4$  para activar la superficie de los electrodos, se lavó con buffer PBS 1X, se dejó secar y se calibró con 60 uL de 5mM de la cupla  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  durante 1 min y se realizó la medida. Luego, se lavó con buffer PBS 1X, se dejó secar y se utilizó 10 uL de blanco proveniente del pozo 2 empleado para hacer la ELISA que contenía anticuerpo secundario anti- IgG de ratón e hIL-4 y se hizo la medida a -0.2 V, en un rango de corriente de 100 nA a 10 mA (1 uA) por 60 s (potenciostato MultiPalmSens4 y el software MultiTrace 4.3). Paso seguido, se lavó con buffer PBS 1X, se dejó secar y se utilizó 10 uL del pozo 1 usado para hacer la ELISA que contiene hIL-4 anclada a al anticuerpo primarioanti-

hIL-4 de ratón y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón y se realizó la medida a las condiciones antes mencionadas. Todo el experimento se hizo por duplicado.

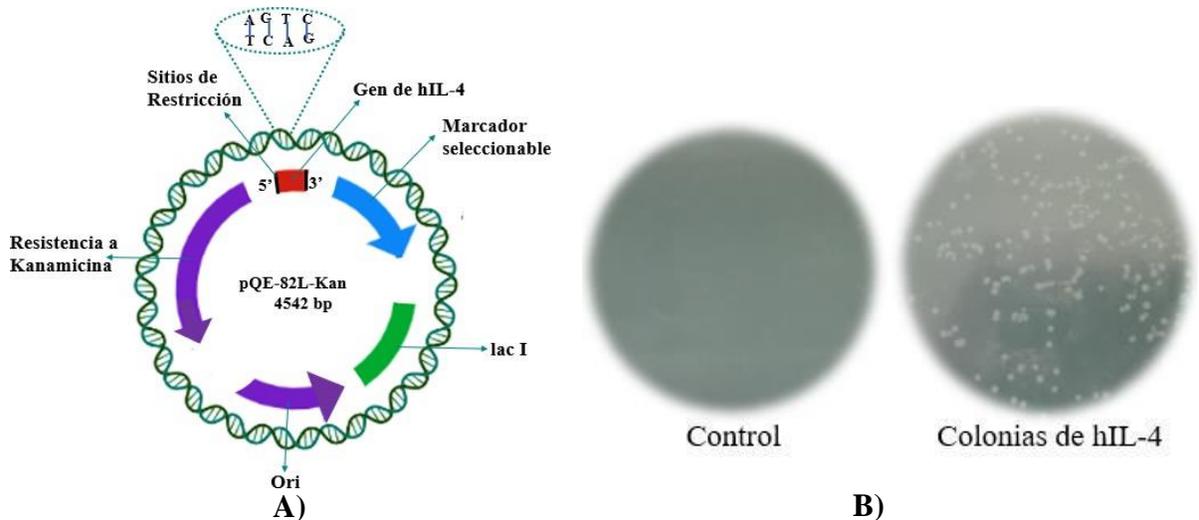
## 7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Expresión de rhIL-4

#### 7.1.1 Transformación bacteriana

La transformación bacteriana por choque térmico es una de las técnicas más implementadas para iniciar la síntesis de proteínas recombinantes a partir de *E. coli* capacitadas o competentes. Para ello, se necesitó un plásmido ADN circular (Fig 14A). Las partes de este plásmido son: el origen de replicación (ORI), es la secuencia de ADN que permite iniciar el proceso de replicación; el gen de resistencia al antibiótico de kanamicina que permite la selección *E. coli* BL-21 que contiene el plásmido; los sitios múltiples de clonación (MSC) que permite una fácil inserción del ADN heteróloga.

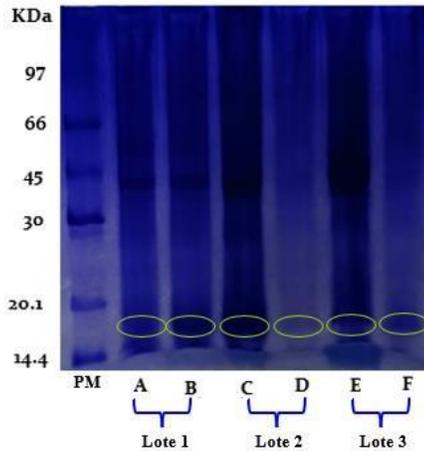
Por otro lado, se emplearon *E. coli* competentes que permiten generar un ambiente neutro dentro del citoplasma para que cuando ingrese el plásmido a la bacteria no lo expulse y pueda expresarlo como una proteína propia. Es por ello, posible visualizar en la figura 14B, el control que solo son células de *E. coli* sin plásmido y las colonias que resultaron luego de mezclar las bacterias y el plásmido antes del choque térmico.



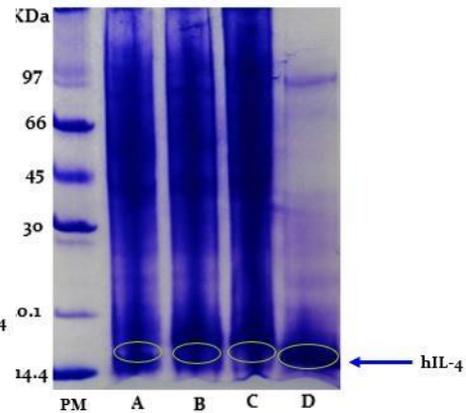
**Figura 14.** A) Representación esquemática del plásmido de rhIL-4 B) Transformación bacteriana. Expansión y preparación de cuerpos de inclusión

En la figura 15 se puede ver en el gel SDS-PAGE la primera expresión de hIL-4 en *E. coli*, añadiendo IPTG para que *E. coli* pueda producir hIL-4 en su citoplasma de manera exponencial, al cabo de 4h se percibe la producción de hIL-4 en el lote 1,2 y 3. Por otra parte, en la figura 16, se perciben los CI, básicamente son agregados de hIL-4 debido a que las proteínas de *E. coli* no tiene residuos de cisteína, la bacteria no posee la capacidad de asignarle la estructura nativa a hIL-4 y se comparan con 0h para mirar como aumenta la banda, por ende, se relaciona con la cantidad

de proteína recuperada de *E. coli*. También, se percibe que la proteína está en presencia de otras proteínas de mayor peso molecular. Adicionalmente, se cuantifico los CI (ver tabla 6).



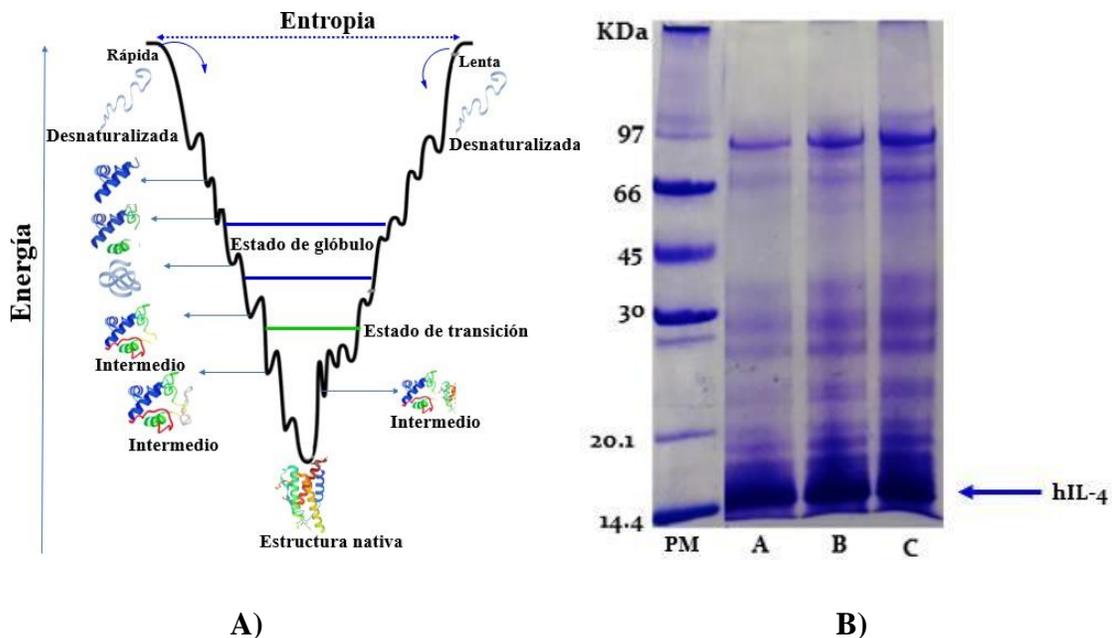
**Figura 15.** Gel SDS-PAGE expansión de cultivo de rhIL-4 A) 0h B) 4h C) 0h D)4h E) 0h F) 4h.



**Figura 16.** Gel SDS-PAGE expansión del cultivo de hIL-4 A) 0h B) CI lote 1 C) CI lote 2 D) CI lote 3.

### 7.1.2 Renaturalización de rhIL-4

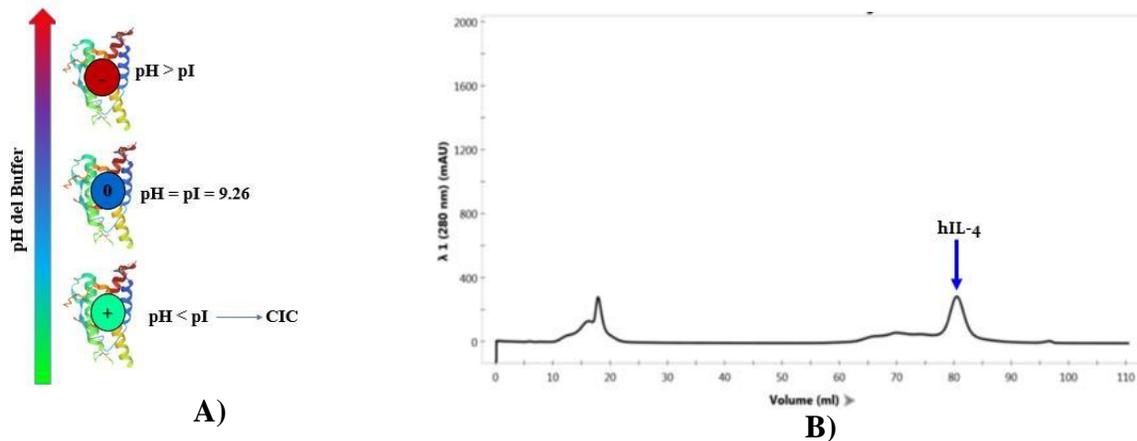
La renaturalización de la rhIL-4 presente en los CI se realizó para que la proteína rhIL-4 obtuviera en su estructura nativa. La proteína pasa por un estado de glóbulo “fundido”, luego hay un estado de transición y posteriormente, varios monómeros de rhIL-4 se van plegando y forman intermedios renaturalizados hasta llegar a la estructura nativa (Fig 17A). En adición, se cuantifico cada lote de hIL-4 renaturalizada (Fig 17B) y concentrada por amición (ver tabla 7).



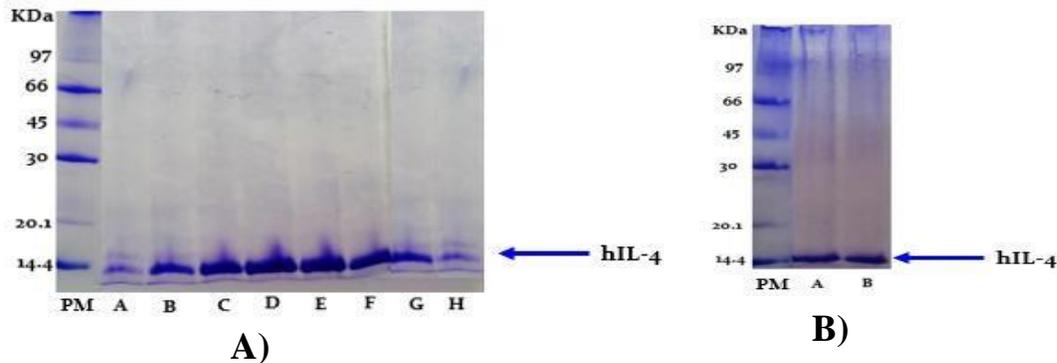
**Figura 17.** A) Representación esquemática del proceso termodinámico de rhIL-4 B) Gel SDS-PAGE renaturalización de rhIL-4 A) Lote 1 B) Lote 2 C) Lote 3.

### 7.1.3 Purificación de rhIL-4 por cromatografía de intercambio catiónico

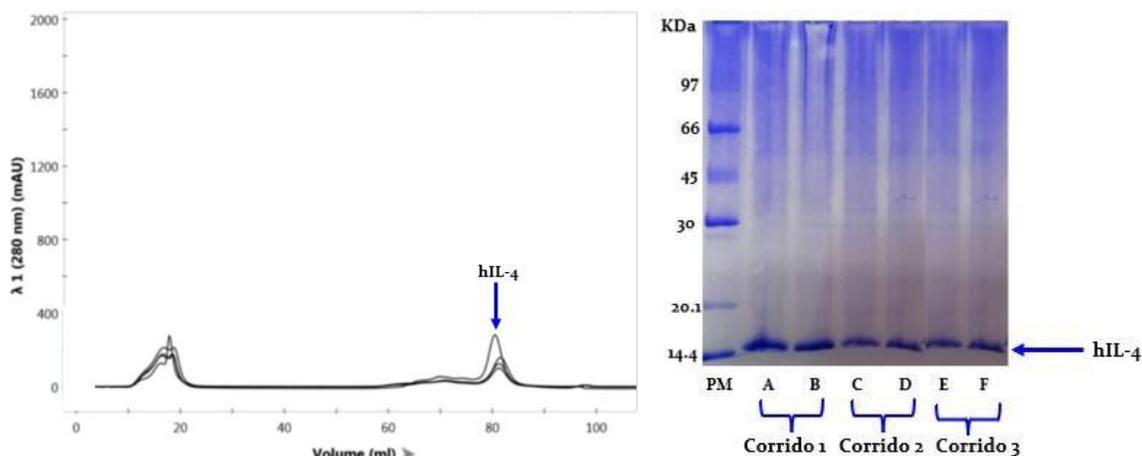
La purificación de rhIL-4 por cromatografía de intercambio catiónico se realizó para descartar las impurezas asociadas con otras proteínas propias de *E. coli* o monómeros de IL-4 parcialmente plegados. Para ello, se empleó una resina SP-Sefarosa (compuesta de moléculas de sulfopropil que se une a moléculas de agarosa). La rhIL-4 posee un pI de 9.26 [29], por debajo de este pI la proteína se encuentra cargada positivamente (Fig 18A) favoreciendo una retención en la columna por la interacción electroestática entre las moléculas de la SP-Sefarosa y algunos residuos de la rhIL-4 (principalmente ácido aspártico y ácido glutámico). Para disminuir el tiempo de retención en la columna, se empleó un gradiente salino de 1M de NaCl y un pH ácido con los buffers de acetatos. La hIL-4 eluyó con un 80% del buffer B (Fig 18B), estrictamente, en las fracciones A72-A79 (Fig 19A); se observa bandas muy limpias y relativamente puras. En la figura 19B se muestra un gel SDS-PAGE, la proteína fue dializada para eliminar el exceso de NaCl. Asimismo, para verificar que el protocolo implementado era reproducible, en la figura 20A se visualiza los cromatogramas de los corridos 1,2 y 3 y en la figura 20B el resultado cualitativo corroborado mediante el gel SDS-PAGE. Además, en la tabla 6 se percibe la concentración de todos los lotes de rhIL-4 sin dializar y dializados.



**Figura 18.** A) Esquema del cambio de pH de rhIL-4 respecto a su pI B) Cromatogramapor intercambio catiónico de hIL-4, corrido 1.



**Figura 19.** Gel SDS-PAGE de rhIL-4 A) Fracciones colectadas de hIL-4 corrido 1 A) 72 B)73 C) 74 D) 75 E) 76 F) 77 G)78 H)79 B) Pool corrido 1 A) Sin diálisis B) Con diálisis



**A)**

**B)**

**Figura 20.** A) Superposición de los cromatogramas de intercambios catiónico de rhIL-4 de 4 corridos B) Gel SDS-PAGE pools de hIL-4 A) Sin diálisis B) Con diálisis C) Sin diálisis D) Con diálisis E) Sin diálisis F) Con diálisis.

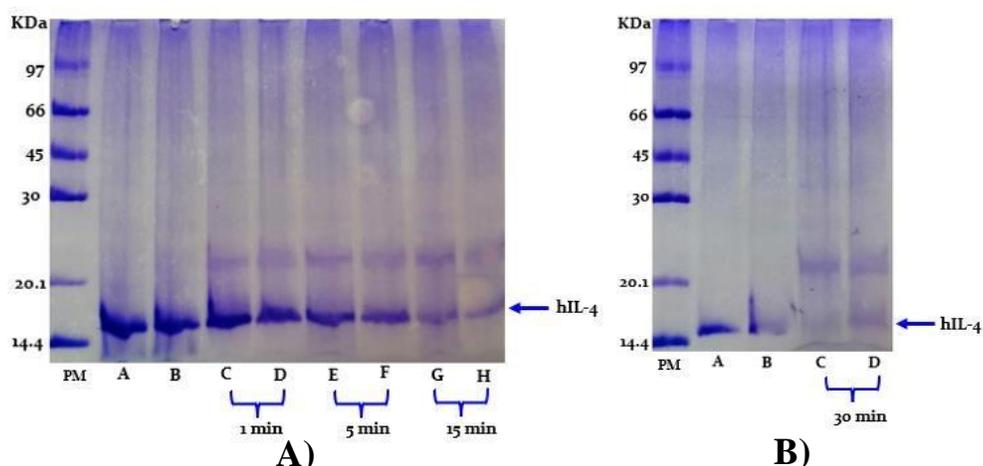
**Tabla 6.** Cantidad de rhIL-4 obtenida en cada paso de la expresión y purificación empleando la ecuación 1 y teniendo en cuenta como coeficiente de extinción 0.592 M/cm, un factor de dilución de 10 y la longitud de la cubeta de cuarzo de 1.0 cm.

<b>Peso húmedo de <i>E. coli</i></b>	3.0 g
<b>Peso húmedo de CI</b>	120,04 mg
<b>rhIL-4 desnaturalizada</b>	86,3 mg
<b>rhIL-4 renaturalizada</b>	4,0 mg
<b>Rendimiento</b>	4,63 %

## 7.2 Verificación del plegamiento de la estructura de rhIL-4

### 7.2.1 Digestión con Tripsina

La digestión con tripsina de hIL-4 se puede observar en la figura 21A y B donde se demostró que la proteasa se tardaba más tiempo en digerir la proteína renaturalizada que la proteína que se mantenía desnaturalizada. La tripsina hidroliza los enlaces en C-terminal de la lisina y arginina [48] [49], logrando digerir en 21 posiciones diferentes. Al estar las muestras pareadas se observa que a los tiempos de 10 y 15 min que la banda perteneciente a la proteína desnaturalizada está más [49] degradada. Si dejaba más tiempo se iba a visualizar el mismo fenómeno.



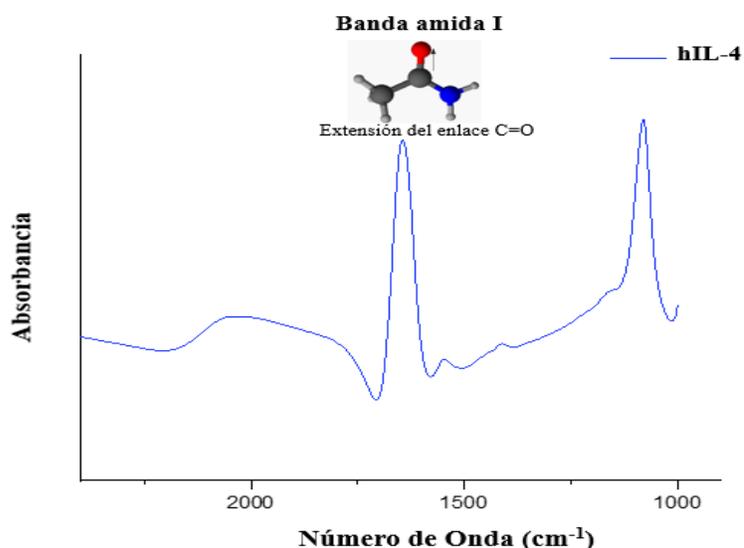
**Figura 21.** Gel SDS-PAGE digestión de rhIL-4 **A)** Primeros 15 min de digestión A) Control renaturalizada (R) B) Control desnaturalizada (D) C) R D) D E) R F) D G) R H) D **B)** Pasados 15 min de digestión A) Control R B) Control D C) R D) D.

### 7.2.2 FT-IR

La rhIL-4 fue verificada en por FT-IR mediante la banda amida I ( $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ ) [50] donde se perciben las vibraciones de estiramiento del C=O, tijeeteo de  $\text{NH}_2$  y contribuciones menores fuera de fase de la vibración del estiramiento del enlace C-N (Fig 22); la banda amida I es la más empleada para el análisis de estructura secundaria de proteínas. De acuerdo con la estructura de la proteína, la absorción de la banda amida I se va ver afectada, las hélices alfa presentan su principal banda de absorción en  $1655 \text{ cm}^{-1}$  y a bajos números de onda [66][67]. La posición de la banda se desplaza hacia abajo al incrementar la longitud de la hélice [66]. En cambio, las láminas  $\beta$  antiparalelas presentan una banda alrededor de  $1630 \text{ cm}^{-1}$ , esta banda se ve afectada por la cantidad de grupos aminos presentes en las láminas, pero también del número de láminas presentes en la proteína [68][69].

La rhIL-4 está compuesta por cuatro hélices  $\alpha$  y dos láminas  $\beta$  antiparalelas. De acuerdo con la literatura, el porcentaje de hélice  $\alpha$  de hIL-4 se encuentra entre 58-62 % [70] mientras la lámina  $\beta$  entre 5-10% de la estructura secundaria total de la proteína. En la tabla 7 se muestra la cantidad de hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$  obtenidas de la proteína sintetizada con su respectiva banda de absorción; la medida se hizo por duplicado y se percibe que no hay una fluctuación relevante en los datos obtenidos. Posteriormente, se comparó los datos experimentales con los reportados en la literatura (Tabla 8) y se encontró que el porcentaje de hélice  $\alpha$  experimental teniendo en cuenta el promedio de las dos medidas fue de 58.371% y una absorción de  $1653.0 \text{ cm}^{-1}$  mientras en la literatura es 60.4% y una banda de absorción de  $1654.1 \text{ cm}^{-1}$  [71], se concluye que los valores experimentales están en el rango esperado. Sin embargo, cuando se analizó el porcentaje de lámina  $\beta$  se encontró un promedio experimental de 37.163% y una banda de absorción de  $1629 \text{ cm}^{-1}$  entretanto la lámina  $\beta$  reportada posee aproximadamente un 15.9% teniendo en cuenta las láminas  $\beta$  de las cadenas laterales y banda de absorción en promedio de  $1629.05 \text{ cm}^{-1}$ [71]; la banda de absorción está en el rango esperado, no obstante, el porcentaje experimental es más del doble del porcentaje de la literatura. Una suposición podría ser que esto puede deberse a que los resultados del FT-IR muestran las láminas  $\beta$  y el giro (turn) como sistemas organizacionales lineales. Es por ello, que no diferencia entre una estructura y otra, aunque el número de onda sea diferente. Si se tiene en

cuenta esto, el porcentaje de láminas  $\beta$  y giros reportados es de 39.6%, un valor dentro de la desviación estándar del valor obtenido experimental. En consecuencia, se concluyó que hIL-4 tiene su estructura secundaria plegada.



**Figura 22.** Análisis de FT-IR de hIL-4 con su respectivo movimiento vibracional correspondientes a la banda amida I.

**Tabla 7.** Cantidad de estructura secundaria obtenida por FT-IR de rhIL-4 sintetizada.

Estructura Secundaria	Primera Medida		Segunda Medida	
	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	%	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	%
Hélice- $\alpha$	1653.0	58.424	1653.0	58.317
Lámina- $\beta$	1629.0	37.270	1629.0	37.056

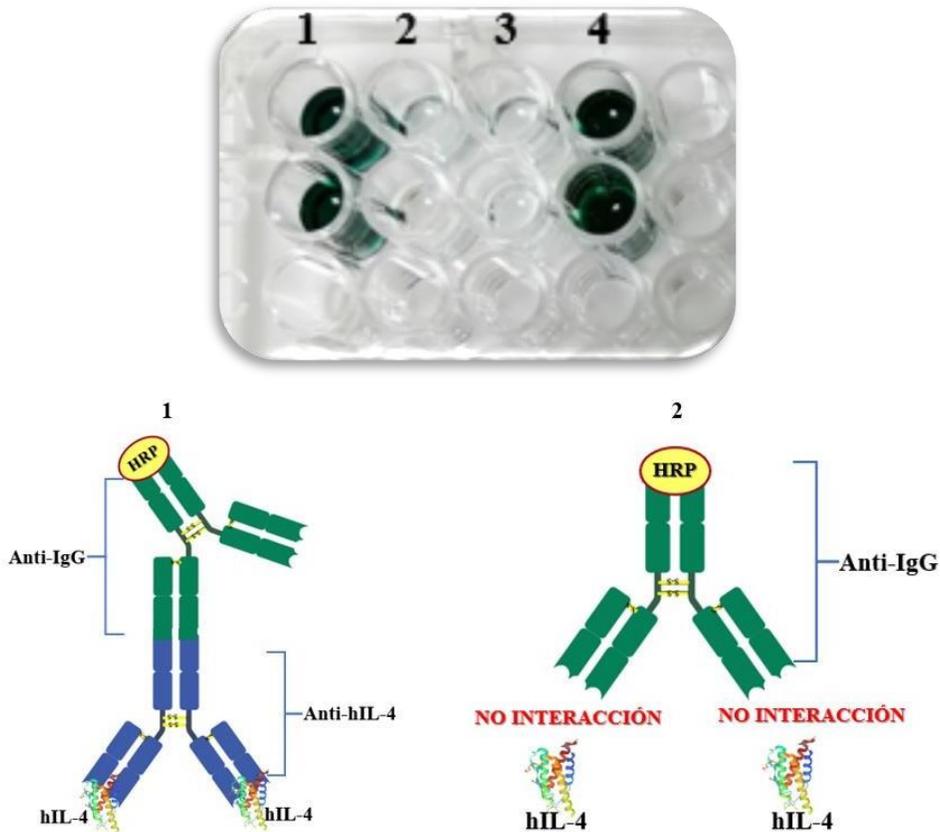
**Tabla 8.** Contenido de estructura secundaria reportada de rhIL-4 por FT-IR [71].

Estructura Secundaria	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	%
Turn	1681.5	8.4
Turn	1669.0	15.3
$\alpha$ -hélice	1654.1	60.4
Lámina- $\beta$	1636.1	10.5
Lámina- $\beta$ /Cadenas laterales	1622.0	5.4

## 7.3 Caracterización de la interacción de anti-rhIL-4 con rhIL-4

### 7.3.1 ELISA

En la figura 23 se presenta el resultado de la ELISA, la primera columna (pozo 1), se representa la interacción de interés donde la hIL-4 está inmovilizada al plato es reconocida por el anticuerpo anti-hIL-4 de ratón, y a su vez el anti-hIL-4 es reconocido por anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP. En la segunda columna (pozo 2), se muestra que la hIL-4 inmovilizada no interacciona con el anti-IgG de ratón (Ab secundario), por lo tanto, no hay reacción de la HRP (1<sup>er</sup> CN). En la tercera columna (pozo 3) se representa que la BSA no interacciona con el anti-hIL-4 (2<sup>do</sup> CN). En la cuarta columna (pozo 4) la inmovilización del anti-IgG (Ab secundario) al plato de ELISA para que estas reacciones con el anti-hIL-4 y posteriormente se una la hIL-4 (CP). Es posible, percibir un cambio de color (CP) cuando se mide la absorbancia a 650 nm por la presencia de TMB, el cual en presencia de HRP se comporta como un medidor redox radicalario donde se forma el catión radical  $TMB^{+}$  como se muestra en la figura 24 y esto va relacionado con el cambio de color de un amarillo a un azul verdoso y como se aprecia en la tabla 9, los controles positivos que fueron las columnas 1 y 4 presentan la mayor absorbancia y los controles negativos que fueron las columnas 2 y 3 presentaron las absorbancias cercanas a cero. Adicionalmente, en la figura 25 se percibe la desviación estándar del experimento de ELISA donde se muestra que los valores están en el rango esperado tanto los controles positivos como negativos. En conclusión, el anticuerpo y el antígeno presentan interacción.



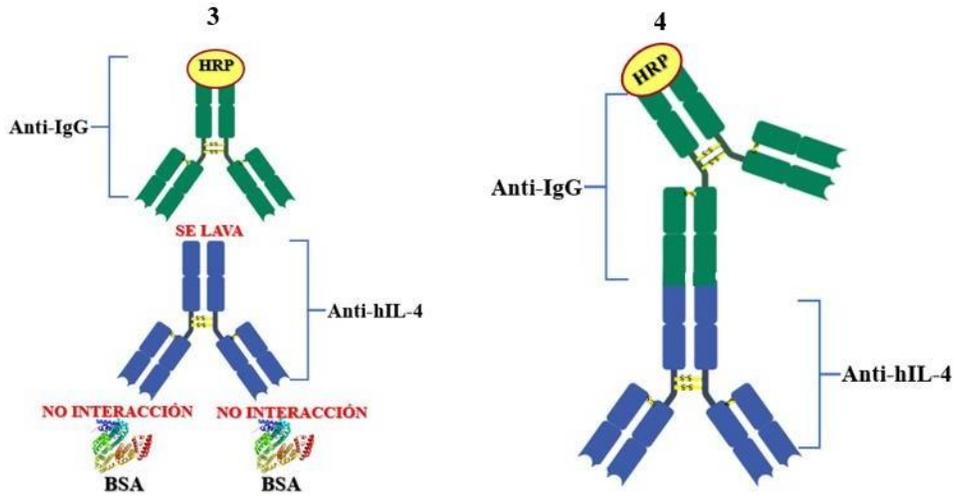


Figura 23. Representación esquemática de la interacción de enlace anti-rhIL-4 con rhIL-4.

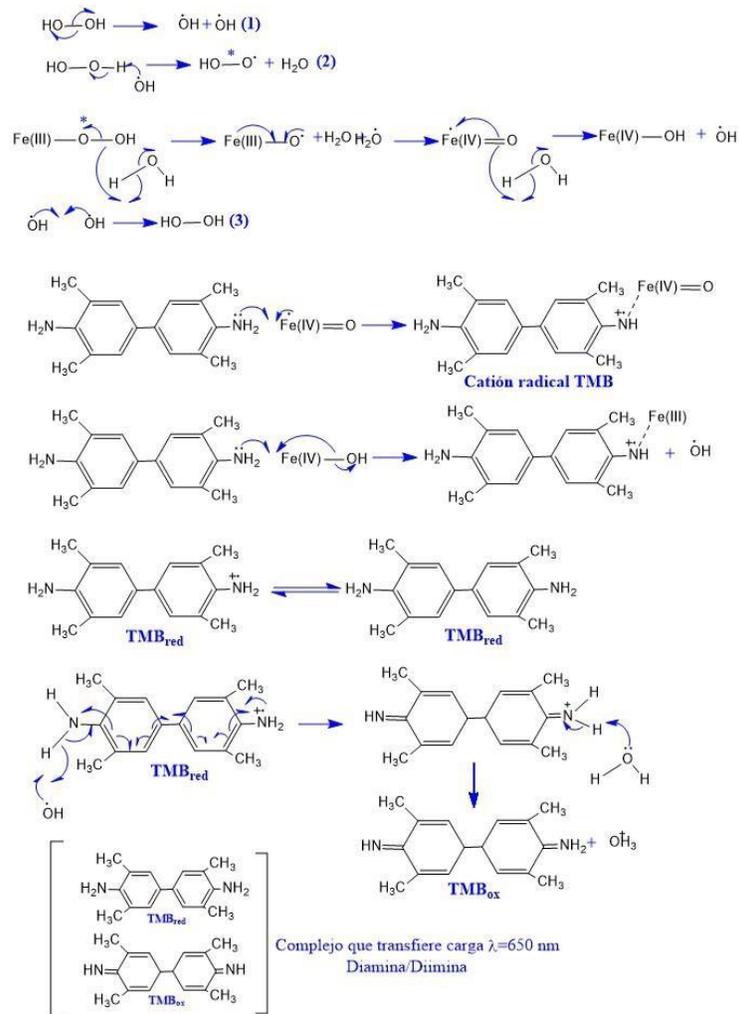
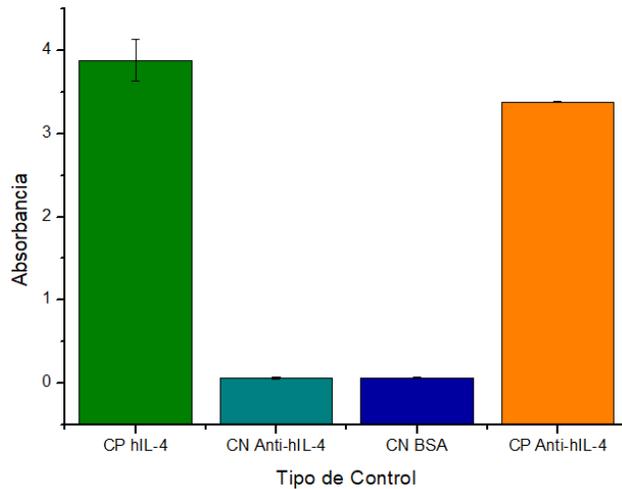


Figura 24. Mecanismo de reacción del TMB en una ELISA.

**Tabla 9.** Absorbancias obtenidas del experimento de ELISA.

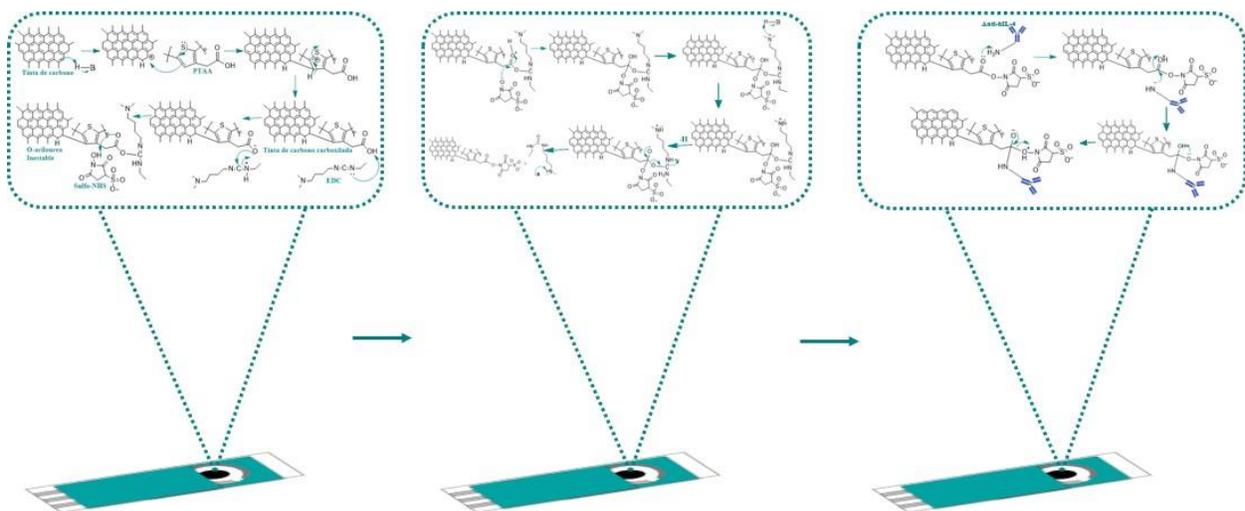
Absorbancia	CP hIL-4	CN Anti-hIL-4	CN BSA	CP Anti-hIL-4
A	4.0553	0.0725	0.0691	3.3754
B	3.7001	0.0516	0.0609	3.3836

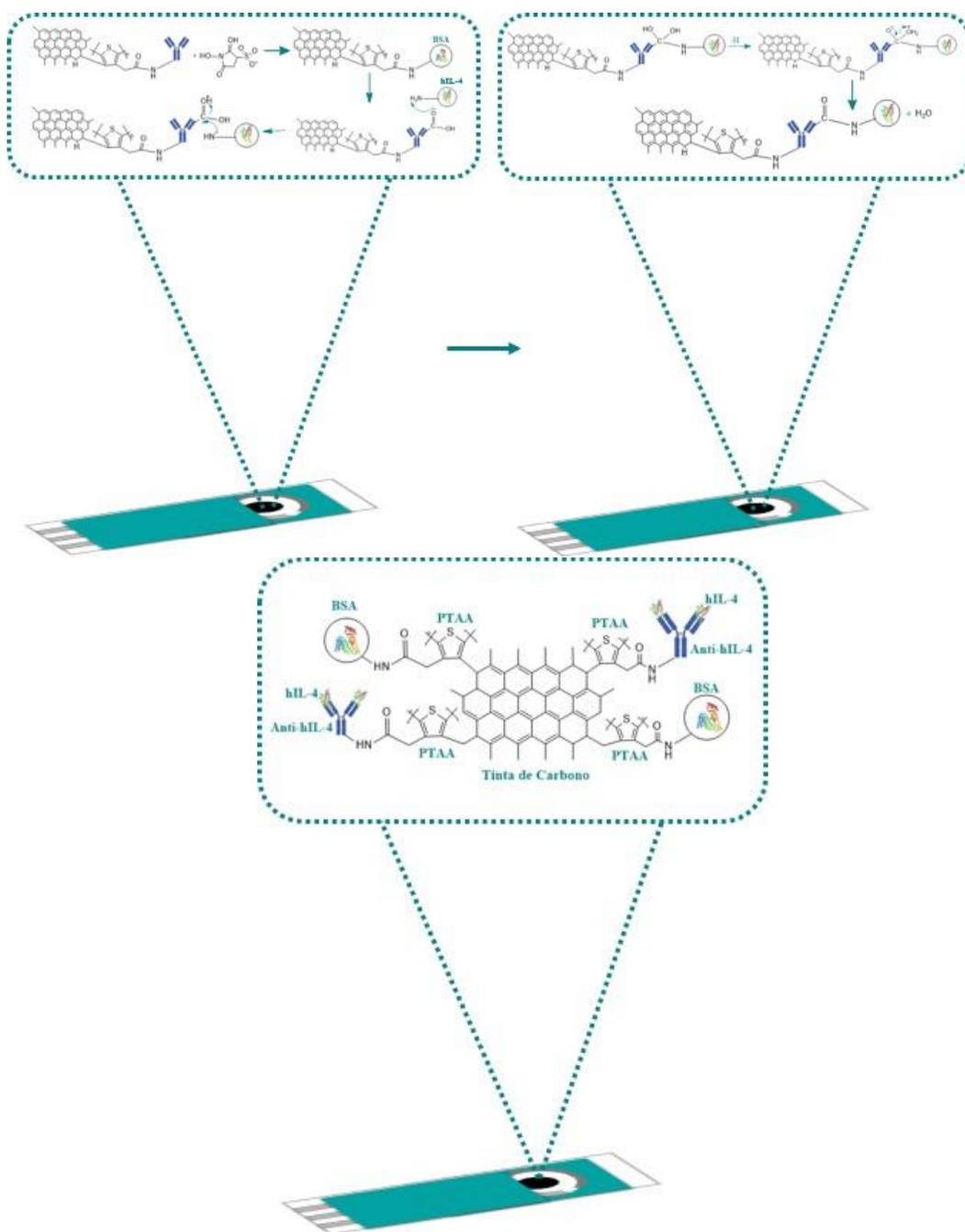


**Figura 25.** Desviación estándar del experimento de ELISA.

#### 7.4 Diseño del biosensor de detección electroquímica de rhIL-4

Por otro lado, en la figura 26 se puede percibir el diseño del biosensor de detección de hIL-4 para cuantificar el aumento en la expresión de hIL-4, asociada principalmente a la inflamación alérgica inmovilizando primero el anticuerpo y en un segundo momento se une el antígeno, empleando un electrodo de trabajo de tinta de carbono.





**Figura 26** Diseño del biosensor electroquímico serigrafiado para detectar hIL-4.

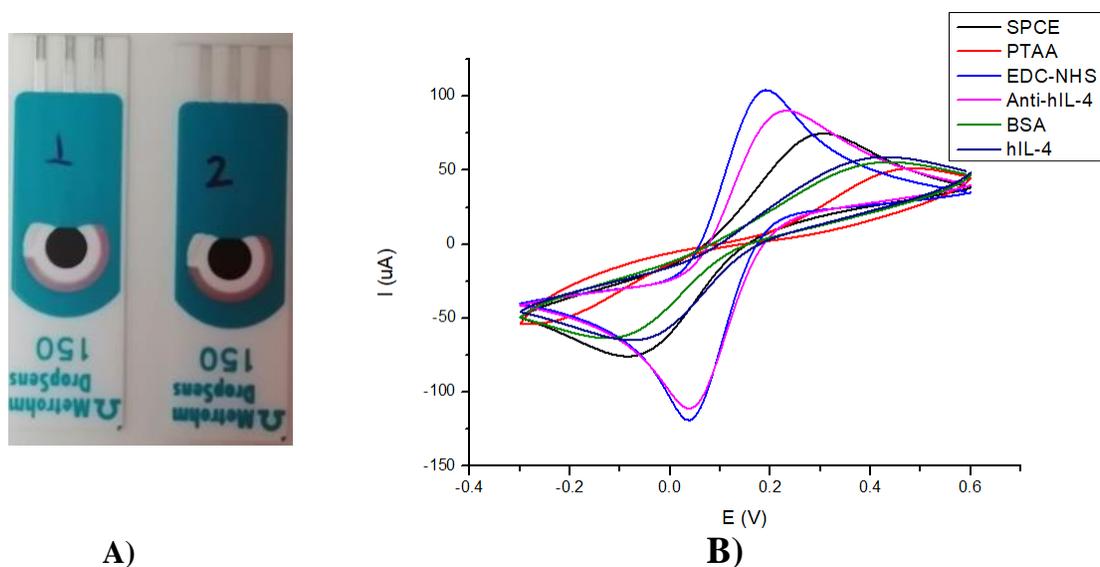
#### 7.4.1 Método 1: Voltametría Cíclica

La figura 27 A y B muestra los electrodos empleados y la caracterización electroquímica de la superficie del electrodo con voltametría cíclica después de cada modificación. Todas las medidas se realizaron con 5mM del mediador redox  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ , con una velocidad de barrido de 50 mV/s y un rango de potencial de -0.6 a +0.6. De acuerdo con la literatura, en la voltametría cíclica se forma una capa de difusión gracias a la especie reducida que crece hasta el pico de corriente

catódica, luego lentamente decrece la corriente para favorecer el proceso de transporte de masa de la especie oxidada [57]. Posteriormente, se genera un cambio de potencial en dirección anódica, el barrido va en dirección invertida incrementando la concentración de la especie reducida para llegar a su punto inicial; así favorece la ecuación de Nernst.

El proceso de reducción del biosensor de detección es casi reversible porque  $\Delta E_p$  es menor a 57mM a 25°C [57]. A pesar de ello, la transferencia de electrones es reversible indicando que las especies se difunden libremente. Por lo tanto, fue posible despejar de la ecuación de Randles-Sevcik (Ec. 6) el área electroactiva en cada modificación (ver tabla 10) donde esta disminuye al paso que la difusión del mediador es interferida y el área electroactiva aumenta cuando las especies electroactivas interaccionan atractivamente con el mediador redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ .

En el caso donde se tiene el SPCE  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  se presenta un  $\Delta E_p$  de 0.36 V, cuando el electrodo se modifica con el polímero PTAA se exhibe una disminución en la corriente faradaica y la separación del pico es mayor de 0.45V en comparación con el electrodo desnudo. Esto confirma que la superficie del electrodo hay presencia de grupos funcionales carbonilos. Después de la activación con EDC/NHS la corriente faradaica incrementa y el  $\Delta E_p$  disminuye. Esto se debe a la disminución de grupos carbonilos libres en la superficie del electrodo porque la gran mayoría de carbonilos están acoplados con EDC/NHS. En adición, los grupos carbonilos libres presentan una repulsión con los aniones del mediador  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . La inmovilización covalente del anti-hIL-4 dentro de la superficie del electrodo presenta una disminución en el pico de corriente. Adicionalmente, los picos de corriente son más anchos. La razón es porque el anticuerpo bloquea la transferencia de electrones e interfiere con la difusión del mediador redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  en la superficie del electrodo de trabajo. Estos resultados permiten demostrar que la inmovilización fue exitosa en la superficie del electrodo. Luego, se adiciona el BSA para bloquear los sitios de la superficie donde no se unió anti-hIL-4, se percibe una disminución del pico de corriente faradaica y un aumento en la separación de pico. Finalmente, cuando se añadió la hIL-4 se visualiza un aumento del pico de corriente faradaica y una disminución en el  $\Delta E_p$  pequeño entre el anti-hIL-4 y la cupla EDS/HHS.



**Figura 27.** A) Electrodo serigrafado usado para el diseño del biosensor para la detección de hIL-4 B) Voltogramas cíclicos del biosensor para la detección de rhIL-4 con 5mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ .

**Tabla 10.** Áreas electroactivas en cada modificación del electrodo de trabajo para detectar rhIL-4.

Modificación del electrodo de trabajo	Área electroactiva (cm <sup>2</sup> )
SPCE	1.20*10 <sup>-7</sup>
PTAA	5.45*10 <sup>-8</sup>
EDC-NHS	2.34*10 <sup>-10</sup>
Anti-hIL-4	2.04*10 <sup>-10</sup>
BSA	5.29*10 <sup>-8</sup>
hIL-4	7.99*10 <sup>-8</sup>

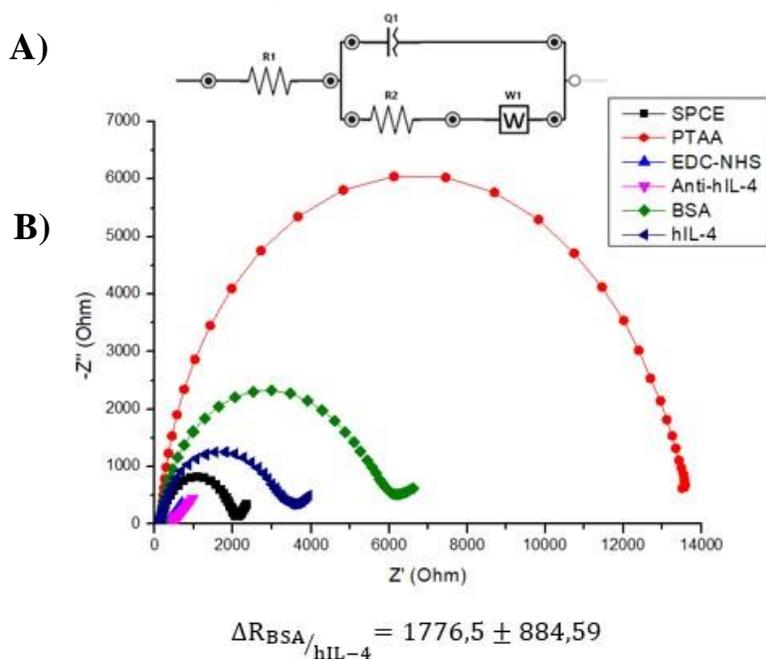
#### 7.4.2 Método 1: Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

La figura 28A se modela el circuito equivalente de Randles y la figura 28B las curvas de Nyquist del espectro de impedancia con 5mM del mediador  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  en un potencial de 0.105V y un rango de frecuencia de 0.01 a 50000.0 Hz. Además, se empleó una resistencia en corriente alterna. También, es importante resaltar que solo se transfirió un electrón del mediador  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  en el proceso de oxidación y reducción al potencial indicado anteriormente para poder lograr el fenómeno de interfases entre la superficie del electrodo de trabajo y el mediador  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Por otra parte, el diámetro del semicírculo en la curva de Nyquist a altas frecuencias corresponde a la resistencia a la transferencia de electrones ( $R_{ct}=R_2$ ) mientras la parte lineal a frecuencias bajas corresponde al proceso de difusión [72].

La CV como la EIE son técnicas complementarias. En la curva de Nyquist SPCE se presenta un semicírculo con resistencia de transferencia de carga ( $R_2$ ) de 0.955 ohm (tabla 11) para el electrodo de trabajo desnudo. Luego, se modificó con el polímero PTAA aumento a 1.296\*10<sup>+4</sup> ohm, comportamiento similar al obtenido en CV y una vez más se demuestra que a superficie del electrodo de trabajo fue modificada con grupos funcionales carbonilo debido a que se presenta una repulsión con los aniones del mediador  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Cuando se adiciono EDC/NHS la mayoría de los grupos carbonilos se acoplaron a la cupla presentando una disminución en la  $R_2$  a 120.5 ohm como consecuencia de que EDC/NHS tiene una carga neutra. Posteriormente, se agregó el anticuerpo anti-hIL-4 y  $R_2$  aumento a 299.1 ohm. Paso seguido, aumento más  $R_2$  a 5457.0 ohm cuando se agregó el BSA para bloquear los sitios donde no se enlazo anticuerpo porque se presentó una resistencia a la transferencia de electrones por el tamaño de las proteínas presentes, anti-hIL-4 posee un peso molecular de 150 KDa [29] y BSA tiene un peso molecular de 66.43 KDa [29], estas ensambladas en la superficie del electrodo de trabajo forman una capa de proteína. Eventualmente, se adiciono la hIL-4 y la  $R_2$  disminuyo a 3055.0 ohm porque al pH del PBS que se empleó para estabilizar la superficie del electrodo la hIL-4 se encuentra cargada positivamente favoreciendo el proceso de atracción con el mediador redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  y va a difundir más fácilmente hacia el interior de la superficie del electrodo y por supuesto con menor repulsión electrostática. A pesar de que la incertidumbre del delta de la resistencia de BSA con respecto a la hIL-4 está fuera del rango esperado, para ser un diseño a priori del dispositivo de detección se pudo demostrar que si hay una transducción electroquímica y una detección de hIL-4.

En efecto, en la tabla 11 se puede ver la resistencia de la solución ( $R_s=R_1$ )( respecto al mediador  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ), el elemento de fase constante ( $Q_1$ ) porque no se tiene un capacitor ideal, el ángulo de fase (n) y la impedancia de Warburg (W) que hacen parte del circuito equivalente de Randles. En resumen, los resultados obtenidos con EIE son acordes con los resultados obtenidos de CV y

validan la funcionalización exitosa de la modificación con PTAA y la inmovilización de anti-hIL-4 en la superficie del electrodo de trabajo.



**Figura 28.** **A)** Circuito equivalente de Randles. **B)** Curvas de Nyquist del biosensor de detección de rhIL-4 con 5mM  $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-/4-}$ .

**Tabla 11.** Parámetros establecidos en los circuitos equivalentes de Randles para cada una de las modificaciones del electrodo de trabajo para detectar hIL-4.

Modificación del electrodo de trabajo	R <sub>1</sub> (ohm)	R <sub>2</sub> (ohm)	Q <sub>1</sub> (kg/A s <sup>2</sup> )	n (rad)	W (ohm)
SPCE	175.3	0.955	1.0*10 <sup>-6</sup>	0.955	307.0
PTAA	170.1	1.296*10 <sup>+4</sup>	1.126*10 <sup>-3</sup>	0.966	0.537
EDC-NHS	184.6	120.5	2.0*10 <sup>-6</sup>	0.889	306.0
Anti-hIL-4	168.4	299.1	2.0*10 <sup>-6</sup>	0.924	385.0
BSA	168.5	5457.0	2.0*10 <sup>-6</sup>	0.929	708.0
hIL-4	167.0	3055.0	2.0*10 <sup>-6</sup>	0.909	542.0

### 7.4.3 Método 2: Cronoamperometría

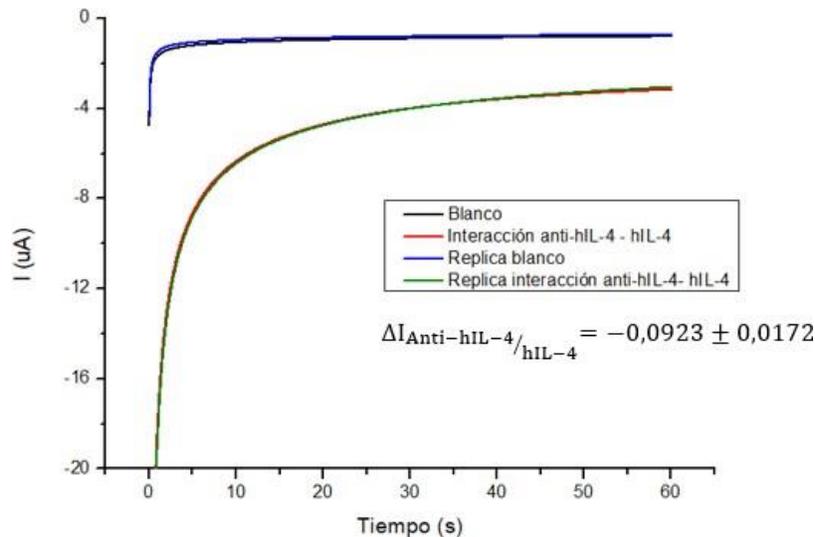
En resumen, por dos técnicas diferentes como son la ELISA y la cronoamperometría; dos de los productos utilizados en ELISA fueron empleados para hacer la cronoamperometría se puede mostrar que efectivamente hay interacción antígeno-anticuerpo.

La figura 29 se muestra como fue el diseño esquemático del biosensor modelo para evaluar la interacción del antígeno-anticuerpo de interés donde la rhIL-4 que estaba interaccionando con el doble enlace del estireno que es el monómero del polímero del cual está hecho el plato de ELISA que permite que se adhiera allí la rhIL-4, se rompieron las fuerzas de adhesión y cohesión en el plato y se extrajo la plantilla formada (rhIL-4, anti-rhIL-4 y anti-IgG conjugado con HRP) para que

interactuara sobre la superficie de óxido de oro (II), que previamente había sido oxidado con 1M de  $H_2SO_4$  y calibrado con el blanco (hIL-4 sin interactuar con el anti-IgG conjugado con HRP). En la figura 30 se puede visualizar el cronoamperograma obtenido para este modelo que partió de una corriente de -20uA hasta -3.8 uA donde la concentración de las especies electroactivas se convierte en cero durante 60 s como consecuencia de un incremento del potencial en la cronoamperometría dado por el electrodo donde la reacción no faradaica toma lugar [58]. Finalmente, se concluye por duplicado y teniendo en cuenta el delta de la corriente del anti-rhIL-4 respecto a la rhIL-4 con un bajo porcentaje de incertidumbre que la medida es confiable y efectivamente hay interacción del antígeno con el anticuerpo.



**Figura 29.** Representación esquemática del biosensor modelo para detectar la interacción de hIL-4 con anti-hIL-4 en un electrodo de trabajo de oro.



**Figura 30.** Cronoamperograma del biosensor modelo para la detección de la interacción de enlace anti-rhIL-4 con rhIL-4 y su desviación estándar.

## 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En este proyecto de investigación se logró diseñar un biosensor de detección para hIL-4 en suero humano. Adicionalmente, se expresó la hIL-4 recombinante en *E. coli*, en esta parte del proyecto se comprendió el rol de la hIL-4 en la respuesta inmune. Asimismo, se verificó el plegamiento de hIL-4 mediante la digestión con tripsina y FT-IR. Entre tanto, se estudió la interacción del anticuerpo de anti-hIL-4 de ratón con hIL-4 por ELISA y cronoamperometría. Además, se evaluó la respuesta electroquímica del dispositivo de detección en electrodos serigrafados comerciales a partir de voltametría cíclica y espectroscopia de impedancia electrónica.

Las perspectivas futuras del proyecto son la optimización del biosensor especialmente en el tiempo de incubación del anticuerpo anti-hIL-4 y el tiempo de incubación de la BSA. Posteriormente, hacer las medidas en muestras de pacientes alérgicos para finalmente llevarlo al ámbito clínico como dispositivo de análisis de bajo costo, portable, flexible, selectiva, sensible, fácil y rápida de utilizar.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Baican, M.C. “Polymeric Nanobiosensors”. En 4. *Polymeric Nanomaterials in Nanotherapeutics*. Elsevier Inc, 2019. pp.151-181.
- [2] «IL4 - Interleukin-4 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt», jul. 05, 2022. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P05112/entry> (accedido ago. 19, 2022).
- [3] «Basophil, Eosinophil & Mast Cell Disorders in Allergic Disease | World Allergy Organization». <https://www.worldallergy.org/disease-focus/basophil-eosinophil-mast-cell-disorders-in-allergic-disease> (accedido ago. 19, 2022).
- [4] A. Touhami, “Biosensors and Nanobiosensors: Design and Applications.”En 15. *Nanomedicine*. One Central Press (OCP),2014. pp.374-403.
- [5] A. A. Ensafi, «An introduction to sensors and biosensors», en *Electrochemical*

- Biosensors*, Elsevier, 2019, pp. 1-10.
- [6] T. Lakshmi Priya y S. C. B. Gopinath, «An introduction to biosensors and biomolecules», en *Nanobiosensors for Biomolecular Targeting*, Elsevier, 2018, pp. 1-21.
- [7] D. Thevenot, K. Toth, R. Durst, G. Wilson, y G. W. Electrochemical, «Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, pp. 121-131, 2001, doi: 10.1081/AL-100103209i.
- [8] Skoog, D.A. West, D.M. Holler, F.J. Crouch, S.R. “Potenciometría”. En 21. *Analytical Chemistry*. Ed 9°. Brooks/Cole Cengage Learning, 2014, pp. 536-537.
- [9] M. Li, Y. T. Li, D. W. Li, y Y. T. Long, «Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-A review», *Analytica Chimica Acta*, vol. 734. Elsevier, pp. 31-44, jul. 13, 2012, doi: 10.1016/j.aca.2012.05.018.
- [10] Kauffmann, J.M. Ozkan, S.A & Zuman, P. “Screen-Printed Electrode (SPE) for Drug Compounds Determination”. En 5. *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2019, pp. 119-139. DOI 10.1007/978-3-662-47138-8.
- [11] H. S. Magar, R. Y. A. Hassan, y A. Mulchandani, «Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): Principles, construction, and biosensing applications», *Sensors*, vol. 21, n.º 19, 2021, doi: 10.3390/s21196578.
- [12] J. Wang, B. Tian, V. B. Nascimento, y L. Angnes, «Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks», *Electrochim. Acta*, vol. 43, n.º 23, pp. 3459-3465, jul. 1998, doi: 10.1016/S0013-4686(98)00092-9.
- [13] N. Sandhyarani, «Surface modification methods for electrochemical biosensors», en *Electrochemical Biosensors*, Elsevier, 2019, pp. 45-75.
- [14] Ortega Ortiz de Apocada, D.F. “Métodos de Inmovilización”. *Biosensores y Biochips: Herramientas para el Diagnóstico y la Terapéutica*, 2006, pp. 36-42. Instituto de España Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid.
- [15] E. N. Özmen, E. Kartal, M. B. Turan, A. Yazıcıoğlu, J. H. Niazi, y A. Qureshi, «Graphene and carbon nanotubes interfaced electrochemical nanobiosensors for the detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) and other respiratory viral infections: A review», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 129, n.º July, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112356.
- [16] Y. Gao y I. Kyratzis, «Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the», *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, n.º 10, pp. 1945-1950, 2008.
- [17] Q. Palomar, C. Gondran, R. Marks, S. Cosnier, y M. Holzinger, «Impedimetric quantification of anti-dengue antibodies using functional carbon nanotube deposits validated with blood plasma assays», *Electrochim. Acta*, vol. 274, pp. 84-90, 2018, doi: 10.1016/j.electacta.2018.04.099.
- [18] D. P. Singh, M. Kumari, H. G. Prakash, G. P. Rao, y S. Solomon, «Phytochemical and Pharmacological Importance of Stevia: A Calorie-Free Natural Sweetener», *Sugar Tech*, vol. 21, n.º 2. Springer, pp. 227-234, abr. 09, 2019, doi: 10.1007/s12355-019-00704-1.
- [19] A. C. M. S. Dias, S. L. R. Gomes-Filho, M. M. S. Silva, y R. F. Dutra, «A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 44, n.º 1, pp. 216-221, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.12.033.
- [20] M. M. S. Silva *et al.*, «Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode», *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 90, n.º 1, pp. 194-200, 2015, doi: 10.1002/jctb.4305.
- [21] S. Viswanathan, C. Rani, A. Vijay Anand, y J. an A. Ho, «Disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen using ferrocene liposomes and MWCNT screen-printed electrode», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, n.º 7, pp. 1984-1989, 2009, doi:

- 10.1016/j.bios.2008.10.006.
- [22] A. P. Periasamy, Y. J. Chang, y S. M. Chen, «Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized on gelatin-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode», *Bioelectrochemistry*, vol. 80, n.º 2, pp. 114-120, 2011, doi: 10.1016/j.bioelechem.2010.06.009.
- [23] J. Wang, L. Wang, J. Di, y Y. Tu, «Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor», *Talanta*, vol. 77, n.º 4, pp. 1454-1459, feb. 2009, doi: 10.1016/j.talanta.2008.09.034.
- [24] M. Mathew y N. Sandhyarani, «Detection of glucose using immobilized bienzyme on cyclic bisureas-gold nanoparticle conjugate», *Anal. Biochem.*, vol. 459, pp. 31-38, ago. 2014, doi: 10.1016/j.ab.2014.05.003.
- [25] S. Kara, B. Keskinler, y E. Erhan, «A novel microbial BOD biosensor developed by the immobilization of *P. Syringae* in micro-cellular polymers», *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 84, n.º 4, pp. 511-518, 2009, doi: 10.1002/jctb.2071.
- [26] S. Hahn, S. Mergenthaler, B. Zimmermann, y W. Holzgreve, «Nucleic acid based biosensors: The desires of the user», en *Bioelectrochemistry*, 2005, vol. 67, n.º 2 SPEC. ISS., pp. 151-154, doi: 10.1016/j.bioelechem.2004.07.006.
- [27] «Antibody: Structure, classes and functions - Online Biology Notes». <https://www.onlinebiologynotes.com/antibody-structure-classes-functions/> (accedido ago. 21, 2022).
- [28] T. G. Drummond, M. G. Hill, y J. K. Barton, «Electrochemical DNA sensors», *Nature Biotechnology*, vol. 21, n.º 10. pp. 1192-1199, oct. 01, 2003, doi: 10.1038/nbt873.
- [29] «ExPASy». <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?P05112@25-153@> (accedido ago. 21, 2022).
- [30] «IL4R - Interleukin-4 receptor subunit alpha - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt». <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P24394/entry> (accedido sep. 01, 2022).
- [31] «Allergy Statistics | AAAAI». <https://www.aaaai.org/About/News/For-Media/Allergy-Statistics> (accedido ago. 19, 2022).
- [32] «AAAAI | American Academy of Allergy, Asthma & Immunology». <https://www.aaaai.org/> (accedido ago. 21, 2022).
- [33] H. Tanaka *et al.*, «Role of Interleukin-5 and Eosinophils in Allergen-Induced Airway Remodeling in Mice», vol. dil, pp. 0-6, 2004, doi: 10.1165/rcmb.2003-0305OC.
- [34] A. D. Klion, «How i treat hypereosinophilic syndromes», *Blood*, vol. 126, n.º 9, pp. 1069-1077, 2015, doi: 10.1182/blood-2014-11-551614.
- [35] D. Hebenstreit, G. Wirnsberger, J. Horejs-Hoeck, y A. Duschl, «Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6», *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 17, n.º 3. pp. 173-188, jun. 2006, doi: 10.1016/j.cytogfr.2006.01.004.
- [36] G. George, R. Wilson, y J. Joy, *Ultraviolet Spectroscopy: A Facile Approach for the Characterization of Nanomaterials*, vol. 2. Elsevier Inc., 2017.
- [37] J. Claßen, F. Aupert, K. F. Reardon, D. Solle, y T. Scheper, «Spectroscopic sensors for in-line bioprocess monitoring in research and pharmaceutical industrial application», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, n.º 3, pp. 651-666, 2017, doi: 10.1007/s00216-016-0068-x.
- [38] K. Fuwa y B. L. Vallee, «The Physical Basis of Analytical Atomic Absorption Spectrometry: The Pertinence of the Beer-Lambert Law», *Anal. Chem.*, vol. 35, n.º 8, pp. 942-946, 1963, doi: 10.1021/ac60201a006.
- [39] D. F. Swinehart, «The Beer-Lambert law», *J. Chem. Educ.*, vol. 39, n.º 7, pp. 333-335, 1962, doi: 10.1021/ed039p333.

- [40] Park. "Electrochemical Impedance Spectroscopy for Better Electrochemical Measurements". *Analytical Chemistry*, 2003. ACS, pp.461-465.
- [41] Macdonald, J.R & Johnson, W.B. "Fundamentals of Impedance Spectroscopy". En 1. *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*. Ed 2°, 2015, pp. 1-26. WileyOnline Library. DOI:10.1002/0471716243
- [42] «Proteins : structures and molecular properties : Creighton, Thomas E., 1940- : Free Download, Borrow, and Streaming : Internet Archive». <https://archive.org/details/proteinsstructur0000crei/page/n1/mode/2up> (accedido ago. 21, 2022).
- [43] A. Ghauri, I. Ghauri, A. M. A. Elhissi, y W. Ahmed, *Characterization of cochleate nanoparticles for delivery of the anti-asthma drug beclomethasone dipropionate*. Elsevier Inc., 2020.
- [44] D. D. L. Chung, *Cement-Matrix Composites*, Second Edi. Elsevier Inc., 2017.
- [45] P. B. Stathopoulos, G. A. Scholz, Y.-M. Hwang, J. A. O. Rumfeldt, J. R. Lepock, y E. M. Meiering, «Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid», *Protein Sci.*, vol. 13, n.º 11, pp. 3017-3027, 2008, doi: 10.1110/ps.04831804.
- [46] A. Grönberg, *Ion Exchange Chromatography*. Elsevier Ltd., 2018.
- [47] A. Methods y M. Biology, «Ion-exchange chromatography», pp. 151-154, 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-824449-4.00027-X.
- [48] Y. Motoo, «Trypsin», *Nippon rinsho. Japanese J. Clin. Med.*, vol. 62 Suppl 1, pp. 393-395, 2004, doi: 10.1016/b978-0-12-427150-0.50011-5.
- [49] O. A. Turapov, G. V. Mukamolova, A. R. Bottrill, y M. K. Pangburn, «Digestion of native proteins for proteomics using a thermocycler», *Anal. Chem.*, vol. 80, n.º 15, pp. 6093- 6099, 2008, doi: 10.1021/ac702527b.A. Barth, «Infrared spectroscopy of proteins», *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol.1767, n.º 9, pp. 1073-1101, 2007, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004.
- [50] L. El Harrad y A. Amine, «Amperometric biosensor based on prussian blue and nafion modified screen-printed electrode for screening of potential xanthine oxidase inhibitors from medicinal plants», *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 85, pp. 57-63, abr. 2016, doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.01.006.
- [51] R. W. Jones, «Infrared Technology», *Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol.*, n.º 1, pp. 1-20, 2000, doi: 10.1002/0471238961.0914061810151405.a01.
- [52] S. Krimm y J. Bandekar, «Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins», *Adv. Protein Chem.*, vol. 38, n.º C, pp. 181-364, 1986, doi: 10.1016/S0065-3233(08)60528-8.
- [53] K. A. Oberg, J. M. Ruyschaert, y E. Goormaghtigh, «The optimization of protein secondary structure determination with infrared and circular dichroism spectra», *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, n.º 14, pp. 2937-2948, 2004, doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04220.x.
- [54] A. Schwaighofer, M. Montemurro, S. Freitag, C. Kristament, M. J. Culzoni, y B. Lendl, «Beyond Fourier Transform Infrared Spectroscopy: External Cavity Quantum Cascade Laser-Based Mid-infrared Transmission Spectroscopy of Proteins in the Amide I and Amide II Region», *Anal. Chem.*, vol. 90, n.º 11, pp. 7072-7079, 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b01632.
- [55] G. Büyükköroğlu, D. D. Dora, F. Özdemir, y C. Hizel, *Techniques for protein analysis*, vol. 1. 2018.
- [56] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, y J. L.

- Dempsey, «A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry», *J. Chem. Educ.*, vol. 95, n.º 2, pp. 197-206, 2018, doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
- [57] Y. S. Choudhary, L. Jothi, y G. Nageswaran, *Electrochemical Characterization*, vol. 2. Elsevier Inc., 2017.
- [58] L. D. Ha, K. Park, B. Y. Chang, y S. Hwang, «Implementation of Second-Generation Fourier Transform Electrochemical Impedance Spectroscopy with Commercial Potentiostat and Application to Time-Resolved Electrochemical Impedance Spectroscopy», *Anal. Chem.*, 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b03226.
- [59] M. I. Prodromidis, «Impedimetric immunosensors-A review», *Electrochim. Acta*, vol. 55, n.º 14, pp. 4227-4233, 2010, doi: 10.1016/j.electacta.2009.01.081.
- [60] M. W. Losey y J. J. Kelly, *Electrodeposition*, vol. 1. 2007.
- [61] E. Fields y S. E. Fields, *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*. 2014.
- [62] S. Wang, J. Zhang, O. Gharbi, V. Vivier, M. Gao, y M. E. Orazem, «Electrochemical impedance spectroscopy», *Nat. Rev. Methods Prim.*, vol. 1, n.º 1, 2021, doi: 10.1038/s43586-021-00039-w.
- [63] B. Julius-maximilians-universit, «Human Interleukin-4 binding protein epitope involved in high-affinity binding of Interleukin-4 : Molecular analysis and characterisation Irina Wietek», 2001.
- [64] E. B. Bahadir y M. K. Sezgentürk, «A review on impedimetric biosensors», *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, n.º 1, pp. 248-262, 2016, doi: 10.3109/21691401.2014.942456.
- [65] N. A. Nevskaya y Y. N. Chirgadze, «Infrared spectra and resonance interactions of amide-I and II vibrations of  $\alpha$ -helix», *Biopolymers*, vol. 15, n.º 4, pp. 637-648, 1976, doi: 10.1002/bip.1976.360150404.
- [66] H. Torii y M. Tasumi, «Model calculations on the amide-I infrared bands of globular proteins», *J. Chem. Phys.*, vol. 96, n.º 5, pp. 3379-3387, 1992, doi: 10.1063/1.461939.
- [67] Y. N. Chirgadze y N. A. Nevskaya, «Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the antiparallel-chain pleated sheet», *Biopolymers*, vol. 15, n.º 4, pp. 607-625, 1976, doi: 10.1002/bip.1976.360150402.
- [68] J. Kubelka y T. A. Keiderling, «The anomalous infrared amide I intensity distribution in  $^{13}\text{C}$  isotopically labeled peptide  $\beta$ -sheets comes from extended, multiple-stranded structures. An ab initio study», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, n.º 25, pp. 6142-6150, 2001, doi: 10.1021/ja010270x.
- [69] M. Kraich *et al.*, «A modular interface of IL-4 allows for scalable affinity without affecting specificity for the IL-4 receptor», *BMC Biol.*, vol. 4, abr. 2006, doi: 10.1186/1741-7007-4-13.
- [70] M. R. Walter *et al.*, «Crystal structure of recombinant human interleukin-4», *J. Biol. Chem.*, vol. 267, n.º 28, pp. 20371-20376, 1992, doi: 10.1016/s0021-9258(19)88711-2.
- [71] V. Stanković *et al.*, «Anti-human albumin monoclonal antibody immobilized on EDC-NHS functionalized carboxylic graphene/AuNPs composite as promising electrochemical HSA immunosensor», *J. Electroanal. Chem.*, vol. 860, 2020, doi: 10.1016/j.jelechem.2020.113928.