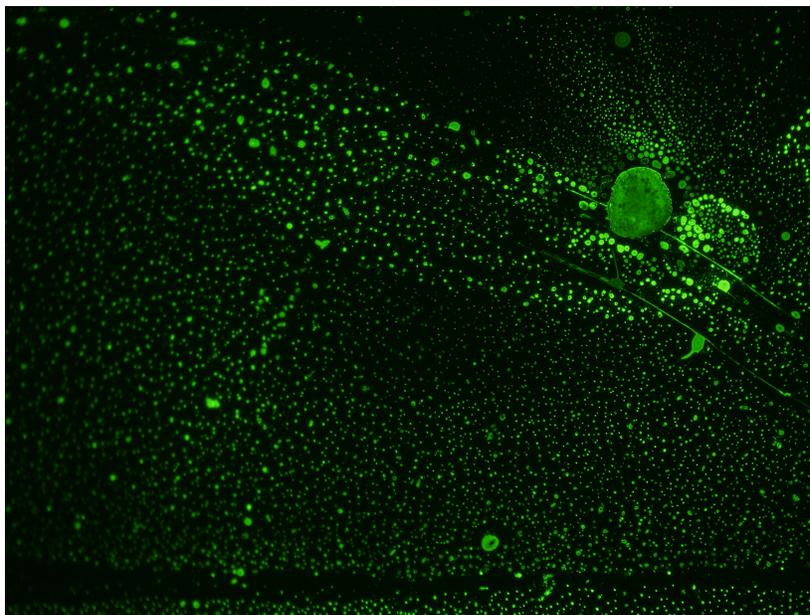




16.30 - PROYECTO FINAL DE CARRERA

“Diseño y desarrollo de un método de funcionalización de una superficie para su incorporación en un biosensor destinado a la detección de Escherichia Coli”



Tutores:

Cintia NOTCOVICH

Guido BERLÍN

Localización:

Departamento de Micro y Nanotecnología, Centro Atómico

Constituyentes, Comisión Nacional de Energía Atómica

Alumnas:

Lucía OSIMANI - LEGAJO: 56449

Sol GIRADO - LEGAJO: 56421

Índice

1. Índice de Abreviaturas	6
2. Resumen	7
3. Reconocimientos	9
4. Planificación	10
5. Marco teórico	11
5.1. Síndrome urémico hemolítico	13
5.2. Biosensores	15
5.3. Anticuerpos	18
5.4. Inmovilización de Anticuerpos en superficies	20
5.4.1. Tratamiento de superficies	22
5.4.2. Unión Amida	25
5.5. Técnicas de caracterización	28
5.5.1. FTIR	29
5.5.2. Resonancia de plasmón superficial	30
5.6. Fotolitografía	32
5.7. PDMS	34
5.8. Estreptavidina - Biotina	36
5.9. Procesamiento de Imágenes	39
6. Objetivos	40
7. Materiales y Métodos	41
7.1. Metalización de superficies	41
7.2. Inmovilización de Anticuerpos	43
7.2.1. Superficie de Au	44
7.2.2. Superficie de SiO ₂	50
7.2.3. Litografía	54
7.2.4. Superficie con micro-canales encapsulados con PDMS	54
7.3. Resonancia de plasmón superficial	62
7.4. Biotinilación	64
7.5. Revelado con estreptavidina	67
7.6. Procesamiento de Imágenes	70
8. Resultados	75
8.1. Au	76
8.2. SiO ₂	81

8.3. Dispositivo con micro-canales	88
8.4. Técnicas de caracterización	90
8.4.1. FTIR	90
8.4.2. Resonancia de plasmón superficial	91
9. Discusión	93
10. Conclusiones	97
11. Anexos	102
11.1. Código Python	102
11.1.1. Instalación de Librerías	102
11.1.2. Función Analisis	103
11.1.3. Función Cálculo de Umbral por imagen	104
11.1.4. Función Cálculo de Umbral General	105
11.1.5. Máscara	105
11.1.6. Análisis de Máscara	106
11.1.7. Aplicación	107

Índice de figuras

1.	Esquema típico de un biosensor [5]	15
2.	Estructura genérica del anticuerpo	19
3.	Esquema de la capa autoensamblada soportada en el sustrato [30].	22
4.	Reacción de acoplamiento covalente EDC/Sulfo-NHS [37].	23
5.	Silanización de la superficie con APTES [39]	24
6.	Unión con la superficie con APTES [40]	25
7.	Representación gráfica de la estructura del grupo carbonilo [41]	26
8.	Representación gráfica de la estructura del enlace amina [41]	26
9.	Proceso de formación grupo imina [41]	27
10.	Proceso superior: Reacción EDC/NHS con grupos carboxilo para luego generar la unión covalente con la proteína. Proceso inferior: bloqueo de los grupos N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) activos [42].	28
11.	Componentes del SPR [51]	30
12.	Diagrama de flujo de las etapas de microfabricación.	32
13.	Los residuos en la mitad superior de la proteína son apropiados para el marcaje y conforme se avanza en sentido horario se vuelven menos apropiados. En el centro se muestran aminoácidos no reactivos o que usualmente no se encuentran expuestos al solvente [59]	36
14.	Reacción de biotinylación con agentes derivados de ésteres de biotina NHS [59].	38
15.	Tabla de las combinaciones de pruebas que se realizaron en las superficies de oro y óxido de silicio. Referencias: Ac: anticuerpo, AcB: anticuerpo biotinylado, S: lavado con estreptavidina, BSA: Albúmina de Suero Bovino, Au: oro, SiO ₂ : óxido de silicio	43
16.	Recipientes en los que se realizaron los protocolos y se almacenaron las superficies con sus respectivos rótulos para poder identificarlas correctamente.	44
17.	Recipientes en los que se realizaron los protocolos y se almacenaron las superficies con sus respectivos rótulos para poder identificarlas correctamente.	45
18.	Recipiente en el que se almacenaron las superficies para llevar a cabo el protocolo de inmovilización de anticuerpos. En su interior se pueden observar 4 superficies de vidrio metalizadas con Au.	48
19.	Recipiente en el que se mantienen las superficies para llevar a cabo el protocolo de inmovilización de anticuerpos. En su interior se pueden observar 4 superficies de SiO ₂	50
20.	Media oblea de SiO ₂ con uno de los diseños de micro canales hecho por litografía. En este caso los rectángulos que se observan son reservorios que servirán para contener distintas soluciones.	55

21.	Molde de media oblea con paredes construidas con cinta de papel . . .	56
22.	Desecador para PDMS con manguera conectada a bomba de vacío . . .	56
23.	Interior del microondas con la cámara de vacío donde se genera el plasma.	58
24.	Diseño del molde para la creación del PDMS	59
25.	Dispositivos de PDMS en superficie de SiO ₂	60
26.	Equipo SPR NAVI 210A	62
27.	Reactivo Sigma NHS-Biotin.	65
28.	Reactivo Sigma estreptavidina S3762	67
29.	Ejemplo de un Well de 96 pocillos [72]	68
30.	Microscopio Olympus BX63/BX53. Imagen tomada del catálogo del producto BX63/BX53 de Olympus	69
31.	Diseño del Excel obtenido para la colección 18-10 v2. Ac-B+S.	74
32.	Gráfico de barras de la cantidad de píxeles con intensidad mayor al umbral general (UG) y del valor del umbral general. El gráfico muestra los valores de los 4 grupos de pruebas sobre superficies de Au: Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S.	77
33.	Gráfico de barras de las métricas %L y % Img de los 4 grupos de pruebas sobre superficies de Au: Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S.	78
34.	Muestra Ac+B+S	79
35.	Izquierda: Muestra Ac+S ; Derecha: Muestra BSA+S	79
36.	Muestra S	79
37.	Imágenes capturadas por el microscopio sobre superficies de Au	79
38.	Histogramas de los valores de luminiscencia para la prueba Ac+B+S (Izquierda) y Ac+S (Derecha) sobre superficies de Au	80
39.	Gráfico de barras de la cantidad de píxeles con intensidad mayor al umbral general (UG) y del valor del umbral general. El gráfico muestra los valores de los 4 grupos de pruebas sobre superficies de SiO ₂ : Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S.	81
40.	Gráfico de barras de las métricas %L y % Img de los 4 grupos de pruebas sobre superficies de SiO ₂ : Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S.	82
41.	Muestra Ac+B+S	83
42.	Muestra Ac+S	83
43.	Muestra S	83
44.	Imágenes capturadas por el microscopio sobre superficies de SiO ₂	83
45.	Histogramas de los valores de luminiscencia para la prueba Ac+B+S (Izquierda) y Ac+S (Derecha) sobre superficies de SiO ₂	84
46.	Ejemplos de imágenes donde se logra visualizar el error de la lente del microscopio como una sombra oscura circular en el centro.	85

47.	Izquierda: máscara, Centro: imagen con una sombra circular en el centro producto de la falla del lente del microscopio, Derecha: correcta superposición de la máscara con la sombra oscura del error producido por la lente del microscopio.	86
48.	Excel de la tabla resumen de las métricas de los 4 grupos de experimentos	86
49.	Superficies de Au y SiO ₂ luego de ser sometidas al plasma con una gota de agua en las mismas.	88
50.	Canal del dispositivo PDMS con la inmovilización de la solución Ac+B+S	89
51.	Fluorescencia de la intersección de los canales del dispositivo	89
52.	Gráfico de transmitancia obtenida a partir de la técnica FTIR en una de las superficies de Au	90
53.	Desplazamiento del ángulo vs tiempo, en la preparación de las superficies	91
54.	Variación de intensidad vs tiempo, en la funcionalización de las superficies	92
55.	Ejemplos de imágenes con irregularidades.	94
56.	Tabla resumen de los 4 grupos de pruebas sobre superficie de Au: Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S	99
57.	Tabla resumen de los 4 grupos de pruebas sobre superficies de SiO ₂ : Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S	100
58.	Instalación de librerías que se utilizarán para el procesamiento de imágenes	102
59.	Primera parte de la función análisis	103
60.	Segunda parte de la función análisis. Donde se arma y guarda el Excel con las métricas de cada grupo de imágenes	104
61.	Función Cálculo de Umbral por imagen	105
62.	Función Cálculo umbral general	105
63.	Generación y guardado de máscara para la corrección del error del lente	106
64.	Análisis de la relación entre la máscara y la imagen total	107
65.	Análisis de la relación entre la máscara y la imagen total	108

1. Índice de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
STEC	Escherichia coli productora de Toxina Shiga
SPNP	Nanopartículas superparamagnéticas
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
FTIR	Infrarrojos por transformada de Fourier
BSA	Albúmina sérica bovina
GLU	Glutaraldehído
SiO ₂	Óxido de silicio
Au	Oro
S	Estreptavidina
SAM	Monocapas auto-ensambladas / Self-assembled monolayers
MUA	Ácido mercapto undecanoico / 11-mercaptoundecanoico
SDS	Dodecilsulfato sódico
NHS	N-Hidroxisuccinimida
EDC	1-etil-3-(3-dimetil propil) carbodiimida
PM	Protein Plus <i>Protein</i> TM dual color standars.
APTES	(3-Aminopropil) trietoxisilano
PBS	Disolución reguladora de fosfato
PDMS	Polidimetilsiloxano
NSB	Uniones no específicas / Non Specific Binding
SPR	Resonancia de plasmón superficial / Surface plasmon resonance
IgG	Inmunoglobulina G
RGB	(Red, Green, Blue) capas rojo, verde y azul de las imágenes

Cuadro 1: Significados de abreviaturas que se usarán en el documento

2. Resumen

Un biosensor es una herramienta capaz de detectar procesos biológicos y expresarlos en señales eléctricas, ópticas y mecánicas de fácil detección y cuantificación, como puede ser una variación de tensión. Éste se puede descomponer en las siguientes tres partes funcionales:

1. Biorreceptor: superficie que se encuentra en contacto directo con la muestra. Puede ser un anticuerpo, enzimas, células, entre otros.
2. Transductor: el encargado de expresar la interacción biológica en una señal cuantificable
3. Adquisición y amplificación de la señal

El resultado de la interacción específica entre la muestra del analito y el bioreceptor produce un cambio en las propiedades fisicoquímicas en la interfaz generada por este último y el transductor, y donde esta señal se cuantifica mediante un sistema electrónico de adquisición, amplificación y procesamiento de datos. La íntima unión entre el elemento biológico y el transductor, es lo que le da al biosensor su sensibilidad y selectividad, lo que junto a la capacidad de automatización del sistema, permite obtener respuestas rápidas y bajos costos, dándole a esta tecnología ventajas frente a los sistemas analíticos convencionales.

El objetivo de esta tesis fue el de implementar y perfeccionar la funcionalización de superficies para la inmovilización de anticuerpos, para su uso como biorreceptor en procesos biológicos. Este trabajo se realizó en el Departamento de Micro y Nanotecnología, Centro Atómico Constituyentes, Comisión Nacional de Energía Atómica como parte de un proyecto mayor, μ MagLab, que consiste en el desarrollo de un biosensor magnético para la detección de *E. coli* productora de la toxina Shiga. Lo novedoso de este biosensor miniaturizado, también conocido como Lab-on-Chip, es su capacidad de transportar de una manera controlada nanopartículas superparamagnéticas (SPNP) mediante un campo magnético. La señal que luego detectaremos es la concentración o presencia de SPNP. Esto se logra debido a que dichas SPNP están unidas a un anticuerpo que se une de manera específica a nuestra proteína de interés.

Los biosensores pueden ser utilizados para la detección de muchas enfermedades, pero este proyecto en especial busca crear un nuevo método de diagnóstico para el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), una enfermedad muy presente en la Argentina. Para que una persona contraiga una enfermedad generalmente es necesario contar con miles de microorganismos. Para lograr esto con la toxina Shiga son necesarios solamente 10. Por esta razón esta toxina es la responsable de la mayoría de los casos

de SUH en el país , que es la principal razón de trasplantes renales en niños que se contagiaron a través del consumo de alimentos infectados [1].

La tecnología propuesta en este trabajo tiene la capacidad de generar sistemas automatizados que obtienen respuestas rápidas, lo que permite que centros médicos de baja complejidad e incluso personal sin un alto grado de capacitación sean capaces de realizar estas pruebas. En un país tan grande territorialmente y tan centralizado como es Argentina, es importante contar con herramientas fáciles y accesibles para todos. Muchas regiones del país cuentan con sistemas de salud precarios y el tiempo que se puede perder en enviar muestras hasta Buenos Aires puede ser muy riesgoso para el paciente. Aunque el SUH es una afección grave, con un tratamiento adecuado y precoz se puede conducir a una recuperación completa, por lo que el diagnóstico temprano es indispensable.

Dadas las necesidades mencionadas, el biosensor magnético viene a agilizar el proceso de diagnóstico dado la simplicidad de su uso. Por su diseño compacto y portable facilita su distribución por todo el territorio Argentino y también ahorra muestras y reactivos. Para lograr su correcto funcionamiento es de vital importancia la especificidad del biosensor para evitar los falsos positivos o falsos negativos y lograr que sea una herramienta confiable y de utilidad. Para poder brindarle una alta especificidad al biosensor se debe lograr la correcta funcionalización del mismo, objetivo central de este proyecto.

A lo largo de este trabajo se explicarán los fundamentos teóricos que respaldan los procedimientos realizados, los materiales y técnicas utilizados sobre cada superficie para el pegado de los anticuerpos y los métodos de cuantificación de resultados.

3. Reconocimientos

En esta sección queremos agradecer a todos los que hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

En primer lugar queremos agradecer a nuestros tutores Cintia Notcovich y Guido Berlín por introducirnos y guiarnos en un ambiente de trabajo tan interesante y con tanto prestigio como lo es la Comisión Nacional de Energía Atómica. Con sus conocimientos, consejos y su enorme paciencia hicieron posible que logramos llevar adelante el trabajo como también aprender muchas cosas de ellos.

También nos gustaría agradecer la ayuda del ingeniero Claudio Ferrari que nos guió en la creación y en el pegado de los dispositivos con PDMS y también nos consiguió los materiales necesarios para llevarlo a cabo.

Queremos agradecer al ingeniero Federico Pascheta que nos brindó las herramientas teóricas necesarias para poder llevar a cabo la estructura inicial de la tesis.

Por último queremos agradecer a todas las personas que nos cruzamos en nuestra estadía en la CNEA que nos trataron tan amablemente y nos cebaban mate mientras esperábamos que los tiempos de incubación de los protocolos pasen.

4. Planificación

Tareas/Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Lectura de material bibliográfico	X	X	X						X	X	X	X
Discusión y armado de protocolos		X	X									
Funcionalización y Caracterización				X	X	X	X	X	X	X		
Trabajo en sala limpia				X	X	X	X					
Escritura de Tesis								X	X	X	X	X

Cuadro 2: Planificación de tareas y estimaciones de duración

5. Marco teórico

La integración de uno o varios análisis, que generalmente se realizan en un laboratorio, en un dispositivo miniaturizado es conocida bajo el nombre de Lab-on-a-Chip. Las principales ventajas ofrecidas por este tipo de plataformas recaen sobre su simplicidad de uso, ahorro de muestra de partida y tiempo. Asimismo, se presentan en sistemas compactos y portables. La capacidad de este tipo de sensores de reconocer específicamente una molécula blanco, viene dada por anticuerpos unidos a su superficie que reconocen a la biomolécula de interés.

En este proyecto se propone construir una plataforma que brinde a un biosensor la especificidad necesaria para la detección de biomoléculas, para su uso en el diagnóstico temprano de enfermedades de interés para la región.

En la Argentina se registran aproximadamente 400 a 500 nuevos casos por año de síndrome urémico hemolítico (SUH) de los cuales el 5 % deriva en la muerte del paciente. En nuestro país concentramos el 51 % de afectados en todo el mundo [2].

Este síndrome es la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños menores de 5 años y la segunda de insuficiencia renal crónica; además es responsable del 20 % de los trasplantes renales en niños y adolescentes. Se contagia a través del consumo de alimentos contaminados con determinadas cepas de la bacteria *Escherichia coli* capaces de producir la toxina Shiga. La transmisión de este grupo de bacterias principalmente ocurre por ingerir alimentos que han estado en contacto con ganado y su estiércol. También se ha verificado la transmisión directa de persona a persona e indirecta, por ejemplo, por cambio de pañales en jardines de infantes y uso de aguas recreativas [1]. Para lograr una buena recuperación de los pacientes es fundamental la detección precoz, por lo que contar con un buen sistema de diagnóstico es indispensable.

En la actualidad, para asegurar el correcto diagnóstico son necesarias pruebas positivas del patógeno en materia fecal, la detección de la toxina Shiga libre en materia fecal y la detección de anticuerpos en suero. Esto convierte al diagnóstico en un proceso lento y costoso que no se encuentra al alcance de la población en ciertas regiones del país dado que requiere de equipamiento sofisticado, que se encuentra centralizado en los grandes laboratorios [3].

Considerando estas limitaciones, la CNEA (Comisión Nacional de Energía Atómica) busca desarrollar un sistema de detección más eficiente, un proyecto multidisciplinario llamado μ MagLab. Se trata de un Lab-on-a-chip que permita una detección de la bacteria y/o la toxina mediante su unión a anticuerpos específicos con resul-

tados de alta sensibilidad y veloces con solo una pequeña muestra. Este tipo de tecnología permite crear sensores portables y de fácil uso, por lo que no se requeriría personal altamente capacitado para su operación. El diseño se basa en el uso de nanopartículas magnéticas que se unirán a la proteína que uno quiere encontrar. Con esto, se procede a hacer un sensado para confirmar la presencia de la bacteria y poder emitir un diagnóstico. Además, su portabilidad permitirá que cualquier centro de salud del país tenga acceso, incluso aquellos de baja complejidad. Estas cualidades son indispensables para un país como el nuestro, con un territorio tan amplio, y una desigualdad en los servicios de salud a lo largo del país [4].

Como ingenieras, buscamos combinar la tecnología, la eficiencia y la innovación para lograr avances en la medicina que puedan mejorar la calidad de vida de las personas. Creemos también que es de suma importancia que la salud esté disponible en cualquier región de nuestro país y es indispensable que la misma sea de calidad. Este proyecto busca combinar la tecnología, el conocimiento y la innovación con el fin de crear un sistema que salve vidas con un diagnóstico ágil y eficaz. Con la cantidad de casos nuevos que surgen año a año y la importancia de una detección temprana, creemos que es importante mejorar la portabilidad y agilidad del método como también reducir los costos para lograr ayudar a la mayor cantidad de gente.

Personalmente, creemos que la aplicación de la tecnología Lab-on-chip en el diagnóstico es una necesaria innovación para el sistema de salud. Un temprano y correcto diagnóstico es casi tan importante como una cura. Encontramos este proyecto sumamente desafiante y nos motiva enormemente poder aportar nuestro conocimiento y energías para lograr cumplir con este proyecto.

5.1. Síndrome urémico hemolítico

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una afección que suele producirse cuando toxinas bacterianas que se encuentran de manera natural en el intestino del ganado bovino entran al torrente sanguíneo humano y dañan capilares sanguíneos. Esto puede dar lugar a que los glomérulos de los riñones se obstruyan con plaquetas y glóbulos rojos dañados. Es la primera causa de insuficiencia renal aguda en edad pediátrica y la segunda de insuficiencia renal crónica; además es responsable del 20 % de los trasplantes renales en niños y adolescentes [2]. Aunque principalmente son los niños los más afectados por este síndrome, cualquier persona puede contraer el SUH.

La infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) es la principal causa de SUH (40 % de los casos) siendo *Escherichia Coli* O157:H7 el serotipo predominante.

Esta enfermedad se contagia a través del consumo de alimentos infectados ó al ingerir alimentos que han estado en contacto con ganado y su estiércol. También se ha verificado la transmisión directa de persona a persona e indirecta, por ejemplo, por cambio de pañales en jardines de infantes y uso de aguas recreativas. Una vez que STEC ingresa al organismo las manifestaciones clínicas comienzan 3 a 4 días después, con dolores abdominales y diarrea acuosa que en los días siguientes puede progresar a diarrea diaria y a menudo sanguinolenta [50] [2].

Entre los alimentos asociados a brotes de SUH se encuentran además de las carnes, el agua (incluso agua de red deficientemente tratada), la leche cruda y sus derivados sin pasteurizar, las frutas y verduras (melones, lechuga, espinacas, coles, brotes de soja y alfalfa), jugos de fruta no pasteurizados, yogur, mayonesa, embutidos fermentados, entre otros.

El Síndrome Urémico Hemolítico es una afección grave, pero el tratamiento oportuno, apropiado y temprano puede conducir a una recuperación completa, especialmente en los niños. Actualmente en Argentina se registran aproximadamente de 400 a 500 casos anuales del SUH, lo que concentra el 51 % de los infectados a nivel mundial [2].

El único tratamiento aprobado en la actualidad para los pacientes es de sostén. Incluye el control de fluidos y electrolitos, mantener una baja presión arterial y el uso de diálisis y transfusiones acordes al estado de los riñones y anemia. Dado que el tratamiento con antibióticos, medicamentos que inhiben la motilidad intestinal y agentes antidiarréicos se encuentran contraindicados frente a esta enfermedad, por

presentar mayor número de complicaciones y prolongaciones de la sintomatología, es de primordial importancia un rápido diagnóstico de la enfermedad [50].

5.2. Biosensores

Un biosensor es un dispositivo analítico de pequeño tamaño capaz de transformar procesos biológicos en señales cuantificables del tipo eléctricas, ópticas y mecánicas entre otras. El biosensor está en contacto directo con la muestra a través de un sistema biológico de reconocimiento específico inmovilizado, conocido como biorreceptor, que puede ser un anticuerpo, enzimas, células, entre otros, que al mismo tiempo está en contacto con un sistema transductor, que es el encargado de convertir la interacción biológica en una señal cuantificable. La íntima unión entre el elemento biológico y el transductor, es lo que le da al biosensor su sensibilidad y selectividad, lo que junto a la capacidad de automatización del sistema, permite obtener respuestas rápidas y bajos costos, con altos niveles de sensibilidad y especificidad.

En la Figura 1 se puede observar el esquema general de un biosensor [5]. El resultado de la interacción específica entre la muestra del analito y el biorreceptor produce un cambio en las propiedades fisicoquímicas en la interfaz generada por el transductor y el biorreceptor, y esta señal se cuantifica mediante un sistema electrónico de adquisición, amplificación y procesado de datos [5] [6].

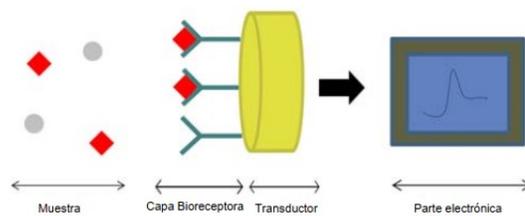


Figura 1: Esquema típico de un biosensor [5]

En base al fundamento del transductor, los biosensores se pueden clasificar en:

- *Electroquímicos*: en estos biosensores el mecanismo de transducción se basa en el proceso de catálisis, generalmente enzimático, en el que la presencia de electrones, iones o compuestos con estados de oxidación variables, son o consumidos o generados, provocando un cambio electroquímico proporcional a la concentración del analito.
- *Ópticos*: se utilizan transductores que pueden medir variaciones de fluorescencia, luminiscencia, absorción, reflexión, entre otras, ante la reacción de reconocimiento molecular sobre la superficie. La concentración del analito se relaciona luego con la señal medida por el transductor.
- *Térmicos*: detectan el calor en las reacciones enzimáticas exotérmicas, y así pueden determinar la cantidad de concentración del analito. Suelen utilizar

termistores, midiendo la temperatura del medio y la temperatura después de la reacción, la diferencia es la variación por la reacción enzimática.

- *Mecánicos*: el elemento de reconocimiento se inmoviliza en una palanca y al interactuar con el analito se produce un cambio de deflexión y un cambio en la frecuencia de resonancia, ambas variaciones pueden estimar la concentración del analito.
- *Acústicos*: las ondas acústicas actúan como el sistema de transducción. La membrana suele contener materiales químicamente interactivos en contacto con un material piezoeléctrico.
- *Piezoeléctricos*: Este tipo de sensor mide la diferencia de peso entre la unión anticuerpo-antígeno o entre las partículas de interés.
- *Magnéticos*: Son capaces de detectar un campo magnético y depende del dispositivo puede estar integrado a transductores de magneto resistivo, por circuito capacitor-inductor o por un interruptor sencillo.

En función de la naturaleza de los procesos biológicos, los biosensores pueden ser catalíticos, cuyos receptores son enzimas, tejidos o microorganismos, o de afinidad, basados en inmunosensores, quimiorreceptores y aptámeros [6] [7].

En la actualidad existe una gran demanda de dispositivos de sensado de agentes biológicos que permiten una buena detección “on site”, simples de usar, de bajo costo y gran estabilidad. Todos los esfuerzos en este campo van direccionados a desarrollar técnicas de detección que puedan combinar una excelente sensibilidad y especificidad en un corto tiempo de análisis y que, a su vez, sea posible miniaturizar. Un gran número de los biosensores desarrollados utilizan la unión antígeno-anticuerpo como herramienta de diagnóstico por su carácter específico.[8]

Los inmunosensores son utilizados en campos muy diversos, como control ambiental, diagnóstico clínico, industria alimentaria, seguridad y defensa.

En el último tiempo se han producido grandes avances en el campo de la nanotecnología que han permitido nuevos desarrollos en el área de los biosensores. En particular, el desarrollo de nanoestructuras magnéticas han tenido un gran impacto y aplicaciones en la biomedicina. Esta tecnología permite la detección de entidades biológicas marcadas por métodos más rápidos y sencillos que los métodos bioquímicos tradicionales. Los sensores de campo magnético actúan sensando el campo magnético generado por el movimiento de nanopartículas magnéticas, también conocidas como NPMS. Al funcionalizar estas partículas, estas se convierten en

transporte de las moléculas de interés, haciendo posible la detección de las mismas por medios no biológicos. Es posible adaptar esta técnica a cualquier entidad biológica de interés, siempre y cuando sea posible la unión a la nanopartícula magnética. [26]

El sistema de detección acoplado en cada biosensor determina el umbral de detección [9]. Sin embargo, el éxito de la capacidad diagnóstica de los inmunosensores depende en gran medida de la inmovilización de los anticuerpos [5]. En este proyecto diseñaremos protocolos para la óptima inmovilización de anticuerpos a distintas superficies para el armado de biosensores. A continuación entraremos en detalle en las propiedades de las uniones entre anticuerpos y antígenos que caracterizan a los inmunosensores.

5.3. Anticuerpos

Los anticuerpos son glicoproteínas que se caracterizan por formar parte del sistema inmunológico ya que reconocen a su par antígeno (Ag) de una manera altamente específica y con alta afinidad. Por esta característica que poseen son utilizados para el diseño de biosensores y sistemas de detección [10].

A nivel estructural, los IgG están formados por una o más copias de una unidad proteica la cual posee forma de “Y” como se puede observar en la Figura 2. Cada unidad está configurada por dos cadenas polipeptídicas pesadas y dos ligeras unidas entre sí por puentes di-sulfuro. Así se forman tres dominios proteicos: región Fc (fragmento cristalizante) que conforma la base de la “Y” y dos regiones Fab (fragmento de unión a antígeno / antigen binding fragment) que conforman los brazos de la “Y”. Estas últimas están implicadas en el reconocimiento antígeno-anticuerpo debido a la interacción específica que se genera entre este dominio y el epítopo del antígeno [10].

Los epítopos o determinantes antigénicos son cada uno de los sitios discretos de una macromolécula que son reconocidos individualmente por un anticuerpo específico. Son las regiones inmunológicamente activas de un inmunógeno (las que se unen de hecho a un receptor de un Ac libre). Los antígenos son macromoléculas que pueden ser del tipo proteico, glucosídico ó nucleótidos. La región Fc se ve implicada en mecanismos de regulación inmune y función efectora, distribuyendo inmunoglobulinas por el organismo y realizando acciones que deriven en la eliminación del antígeno.

Las cadenas ligeras de los anticuerpos se dividen en el fragmento N-terminal, conocido como la región variable, y el C-terminal, que es el segmento conservado de las cadenas ligeras. Las cadenas pesadas, a su vez, se dividen en 4, 3 regiones constantes y 1 variable en el extremo N-terminal. Las regiones variables de la cadena pesada y la ligera son las que forman la región Fab (N-terminal). Las secciones constantes de la cadena pesada forma la región Fc. (C-terminal).

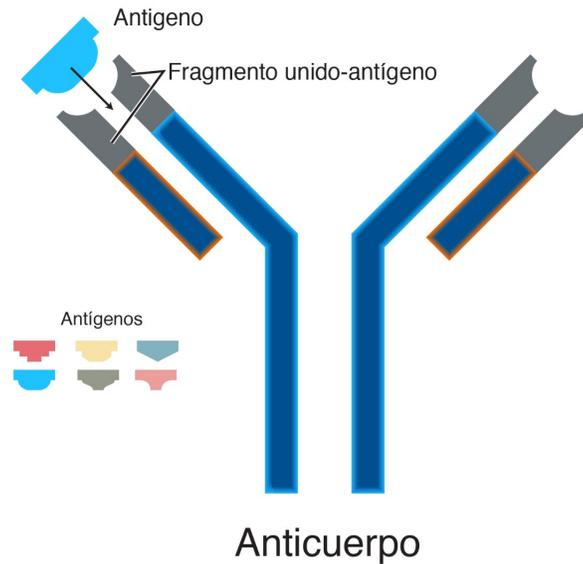


Figura 2: Estructura genérica del anticuerpo [10]

Las inmunoglobulinas se diferencian por sus características estructurales, fisicoquímicas y de reactividad. Dependiendo el tipo de cadenas pesadas que presenten, diferente será la respuesta inmune que cada una otorgue. Estructuralmente varía el número de unidades “Y” que forman las distintas inmunoglobulinas [10].

La gran afinidad antígeno-anticuerpo (esto es, la fuerza de unión entre ellos) es fruto de una acumulación de fuerzas no covalentes, lo que hace que la adsorción sea muy intensa. La interacción implica fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y fuerzas hidrofóbicas. La contribución de cada una de estas fuerzas a la interacción total depende del anticuerpo y el antígeno implicados [11].

La especificidad que presentan los anticuerpos les permiten distinguir pequeñas variaciones en la estructura de su antígeno. También pueden reconocer bacterias, toxinas, células, hormonas, moléculas antropogénicas, lo que los convierte en herramientas de análisis de gran sensibilidad y precisión en campos como : cromatografía de inmunoafinidad, inmunoensayos, análisis clínicos, diagnósticos, biosensores para monitorizar la contaminación ambiental, entre otros [10] [11].

5.4. Inmovilización de Anticuerpos en superficies

Los anticuerpos, como vimos en la sección 5.3, son una excelente elección a tener en cuenta al momento de querer diseñar un biosensor. Le brinda a nuestro dispositivo una alta sensibilidad y especificidad por su gran afinidad con su antígeno correspondiente, convirtiéndolo en un eficiente elemento de reconocimiento.

Nuestro desafío ahora es lograr la inmovilización del anticuerpo a una superficie para comenzar a construir lo que luego será el biosensor en sí.

Las proteínas/anticuerpos pueden ser inmovilizados por diversos métodos, ya sea pasivamente a través de interacciones hidrofóbicas o iónicas o por métodos de unión covalente a grupos activados en la superficie.

La técnica de preparación de sensores más simple se basa en la adsorción de moléculas de anticuerpos en la superficie del sensor. Aunque la adsorción no requiere el uso de múltiples materiales y reacciones complejas, también resulta en serias desventajas, como desnaturalización de proteínas, muy baja estabilidad y orientación aleatoria de proteínas [12] [13].

La técnica más utilizada es el acoplamiento de alguna amina libre del anticuerpo a la superficie del sensor previamente modificada con diferentes recubrimientos que permiten la inmovilización de biomoléculas, como monocapas autoensambladas, dextrano o varios polímeros [14]. Otra estrategia se basa en la conjugación de proteínas con oligonucleótidos, para una mayor hibridación e inmovilización en una superficie [15]. Este enfoque se ha utilizado con éxito para la escisión y regeneración de moléculas híbridas en un sensor [16].

Cuando se utilizan métodos pasivos, por lo general resulta en una unión típicamente baja entre 100-200 ng $\frac{IgG}{cm^2}$, mientras que para superficies modificadas, resulta en una alta capacidad de unión que ronda entre 400 – 500 ng $\frac{IgG}{cm^2}$ [17]. La unión covalente es capaz de producir una inmovilización casi irreversible de las proteínas en la superficie del sensor. Esta inmovilización puede resultar en una mejor actividad de la biomolécula, reducción de la adsorción inespecífica y una mayor estabilidad de las estructuras y a su vez en baja pérdida de material biológico.

Para lograr una inmovilización covalente de los anticuerpos en las superficies es necesario modificarlas para generar los grupos aldehídos necesarios para interactuar con la proteína. Para cada tipo de superficie vamos a detallar cuales son los reactivos y los procesos que se van a llevar adelante para lograr la correcta funcionalización.

Se suelen utilizar diferentes soportes para el diseño de inmunosensores como por ejemplo, metales nobles, especialmente el oro [18], vidrio [19], silicio [20] [21], nitruro de silicio [22] [24], óxido de indio-estaño [25]. Generalmente se determina mediante el método utilizado para el transductor de señal y se puede modificar para diferentes propósitos [27].

El objetivo de este trabajo es el de poner a punto un protocolo de inmovilización de anticuerpos en dos superficies distintas. Así se obtendrá una superficie funcionalizada que le brindará sensibilidad y especificidad al biosensor. Este protocolo busca generar uniones covalentes entre los anticuerpos y las dos superficies a ensayar: Au y SiO₂. Los protocolos para la inmovilización de anticuerpos de ambas superficies comienzan con una limpieza profunda que ayudará a remover impurezas, polvo y microorganismos lo que mejorará las condiciones para lograr la inmovilización de Ac de una manera exitosa.

A lo largo de esta sección se hará énfasis en la parte teórica de las reacciones y métodos que se van a llevar a cabo para la correcta funcionalización de las distintas superficies.

5.4.1. Tratamiento de superficies

Para la superficie de Au, luego de la limpieza orgánica e inorgánica que se describirá en el protocolo de Inmovilización de anticuerpos en superficies de Au en la sección 7.2.1 de materiales y métodos, se realiza el tratamiento de la superficie con el tiol MUA (ácido mercapto undecanoico) con el fin de generar una monocapa auto-ensamblada (SAM: self-assembled monolayers) de tioles.

La formación de SAM como bien dicen sus siglas, consiste en la formación de una capa de tioles de manera espontánea. Se genera la coordinación entre los tioles y el oro mediante uniones covalentes. Como se puede observar en la Figura 3, las cadenas quedan unidas al sustrato y alineadas gracias a las interacciones de Van der Waals entre las cadenas alquílicas [29] de n-átomos de carbono con ciertos grupos funcionales. También en la imagen se puede observar como en el otro extremo de las cadenas queda un grupo terminal funcional. En el caso de que este fuera un grupo carboxilo libre, el mismo puede usarse para la formación de un enlace peptídico con grupos amino dispersos aleatoriamente en la superficie de la molécula de anticuerpo.

Se produce una unión covalente con la superficie de Au a través del tiol y deja en el otro extremo un grupo carboxilo libre, disponible para la unión de anticuerpos. Las moléculas entonces se posicionan de una manera muy ordenada y con una orientación con respecto a la superficie de 30° generando la monocapa de una manera compacta e uniforme como se puede observar en la Figura 3 [31].

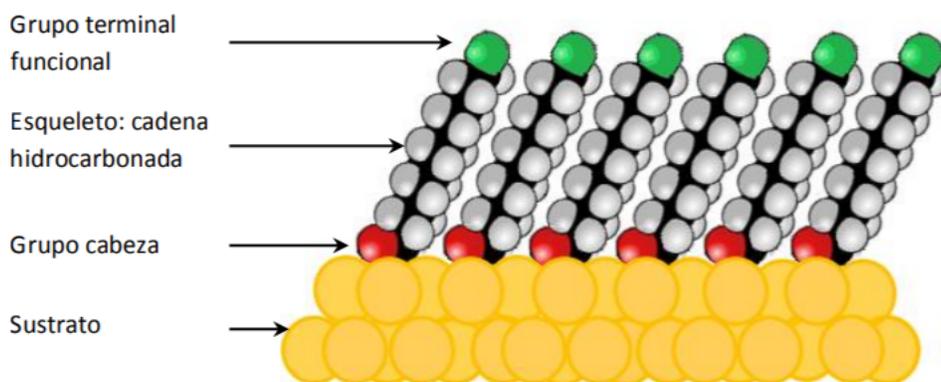


Figura 3: Esquema de la capa autoensamblada soportada en el sustrato [30].

La inmovilización directa de anticuerpos a través de SAM tiene múltiples ventajas, como una técnica de inmovilización bien conocida, probada y bastante simple, estabilidad y reutilización de inmunosensores debido a enlaces covalentes. Sin embargo, un inconveniente es la sensibilidad relativamente pequeña causada por la

orientación aleatoria de anticuerpos y la consiguiente disminución de la disponibilidad de los sitios activos del anticuerpo para el antígeno en comparación con los métodos de inmovilización de anticuerpos dirigidos al sitio [32], [33]. Aunque en algunos casos se han reportado inmunosensores basados en inmovilización aleatoria muy eficientes [34], [35].

Para inmovilizar la proteína a la superficie de Au, primero se realiza la activación de los grupos carboxilos de esta última con 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC). Esta reacción produce un intermedio activo muy inestable que rápidamente puede reaccionar con aminas primarias para formar un enlace amida estable. Este intermedio activo inestable es fácilmente hidrolizable por el agua y por lo tanto puede regenera el grupo carboxilo. Para prevenir la hidrólisis del intermedio activo, se agrega a la reacción N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) para formar un éster de sulfo-NHS estable que reacciona lentamente con aminas primarias para formar un enlace amida estable [36], [37]. Este proceso se puede observar en la Figura 4.

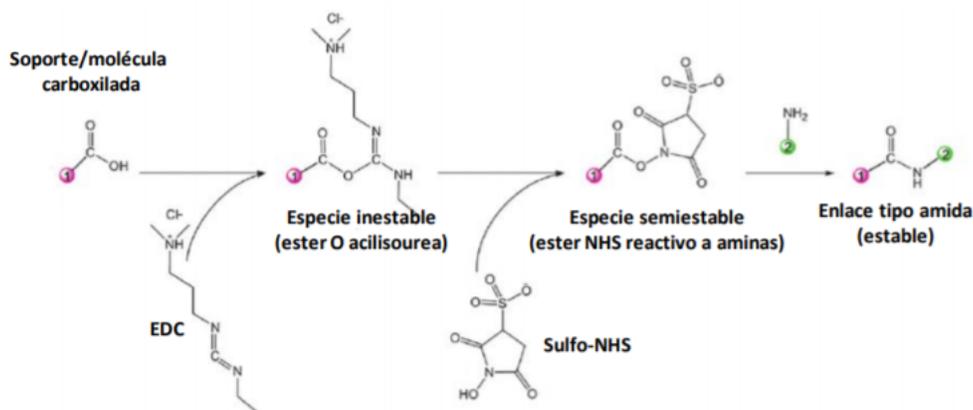


Figura 4: Reacción de acoplamiento covalente EDC/Sulfo-NHS [37].

Para la funcionalización de las superficies de óxido de silicio se utilizó un proceso de tratamiento con APTES y glutaraldehído. El APTES es un elemento muy utilizado y conocido en este tipo de tratamiento pero para poder lograr una buena inmovilización necesita de agentes de acoplamiento como es el glutaraldehído.

El (3-aminopropil)-trietoxisilano, o más conocido como APTES ($C_9H_{23}NO_3Si$, Figura 5 a), es un aminosilano usado en la silanización de superficies. Silanizar es el proceso mediante el cual se recubre una superficie con moléculas de alcoxisilanos para mejorar la adherencia, esto se debe a la interacción de los aminosilanos con los grupos hidroxilos presentes. Se genera un enlace covalente entre el silicio presente en

la molécula del APTES y el oxígeno de los hidroxilos aumentando la hidrofobicidad del material y deja expuesto una amina primaria [21]. Esta unión se puede observar en la Figura 5 b.

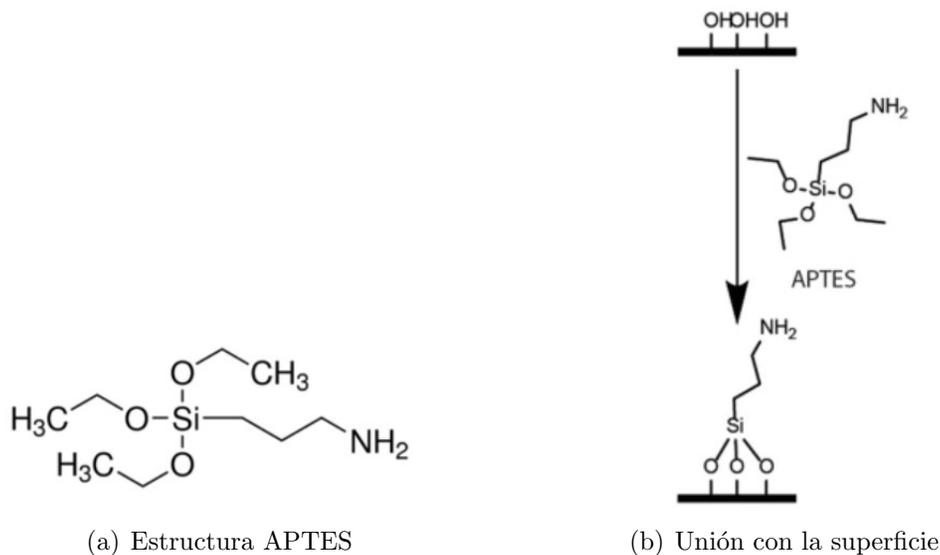


Figura 5: Silanización de la superficie con APTES [39]

Esta amina primaria interactuará con el glutaraldehído $C_5H_8O_2$, que es un compuesto orgánico perteneciente a la familia de los aldehídos. Gracias a su estructura (Figura 6 a), dejará expuesto un grupo aldehído en el otro extremo para la futura reacción con una amina de la superficie del anticuerpo [39]. Dicha unión puede observarse en la Figura 6 b.

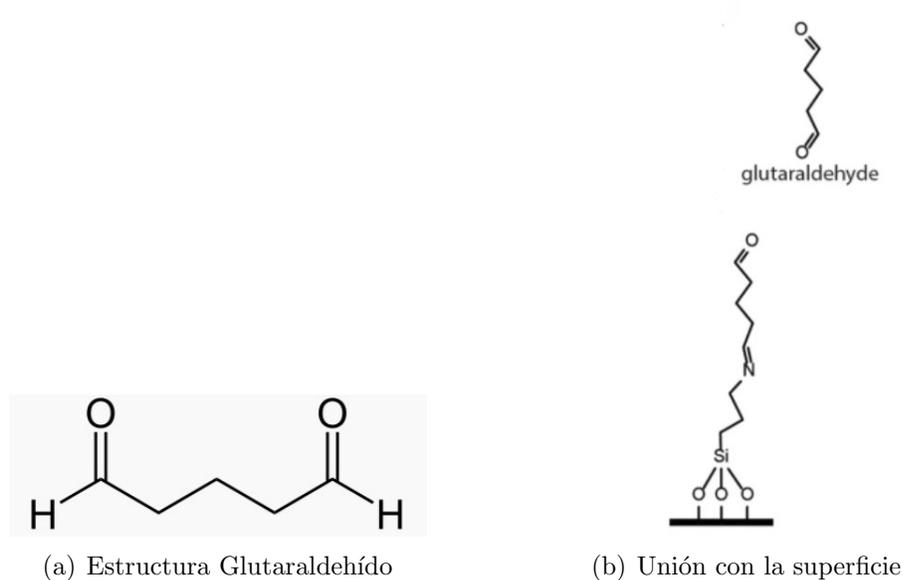


Figura 6: Unión con la superficie con APTES [40]

5.4.2. Unión Amida

El protocolo de funcionalización utilizado tiene como objetivo la inmovilización covalente de las IgG, mediante la unión amida de la superficie y los anticuerpos. [17].

Los aldehídos son compuestos orgánicos caracterizados por poseer el grupo funcional carbonilo. El átomo de carbono de este grupo tiene una hibridación sp^2 y está unido a otros tres átomos a través de sigmas coplanares con ángulos de 120° entre ellos como se puede observar en la Figura 7. Un orbital p sin hibridación, también denominado puro, al solaparse con otro orbital p de un oxígeno, forma un enlace π . El enlace doble entre el carbono y el oxígeno es corto, fuerte y se encuentra polarizado, dándole más estabilidad y rigidez y cuenta con un momento dipolar grande gracias a la presencia de oxígeno.

El oxígeno es un elemento más electronegativo que el carbono por lo que los electrones participantes del enlace no se encuentran compartidos de manera equitativa. En el caso de los aldehídos, todos aquellos electrones más débilmente enlazados en el enlace π son atraídos hacia el oxígeno, generando mayores momentos dipolares que otro tipo de enlace de oxígeno, como los éteres.

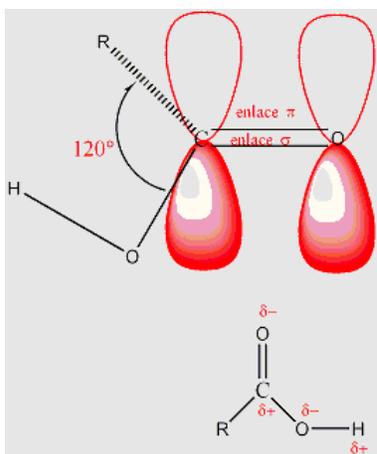


Figura 7: Representación gráfica de la estructura del grupo carbonilo [41]

Las aminas son derivados orgánicos con uno o más grupos alquilo o arilo enlazados al átomo de nitrógeno. Éstas se encuentran presentes en el cuerpo humano ya que ayudan en muchas funciones del organismo como la biorregulación, neurotransmisión y defensa contra agentes externos. Se pueden clasificar en primarias, secundarias y terciarias dependiendo de la cantidad de grupos alquilo o arilo enlazados al nitrógeno como se puede observar en la Figura 8. Las aminas tienen un gran momento dipolar debido al par de electrones no enlazados y los momentos dipolares propios de los enlaces carbono-nitrógeno e hidrógeno-nitrógeno.

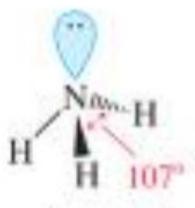


Figura 8: Representación gráfica de la estructura del enlace amina [41]

En condiciones apropiadas, ante la presencia de una amina es posible que un aldehído reaccione para formar una imina. Las iminas son enlaces análogos de los aldehídos pero con nitrógeno, donde el enlace doble entre carbono-oxígeno ahora es nitrógeno-carbono. La presencia de nitrógeno en el enlace logra que se mantengan las características propias de las aminas, ya que la imina al igual que estas últimas, son básicas.

El proceso de formación de una imina (Figura 9) comienza con una adición nucleofílica catalizada por ácido de la amina a el grupo carbonilo. El ataque a la amina, seguido por una desprotonación del nitrógeno genera un compuesto intermediario inestable denominado *carbinolamina*. Al perder una molécula de agua, la carbinolamina se convierte en una amina ya que se forma un enlace doble entre el carbono y el nitrógeno. Esta unión es fuerte y rígida, lo que asegura una correcta alineación de los residuos del nitrógeno.

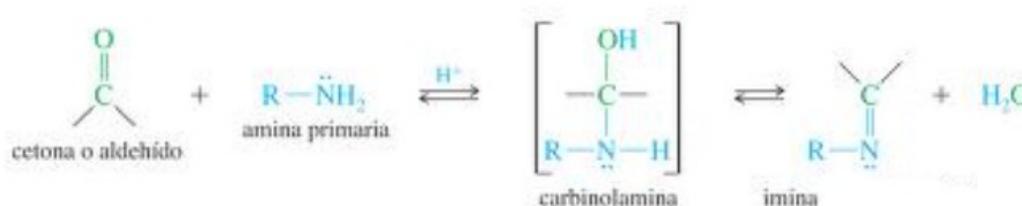


Figura 9: Proceso de formación grupo imina [41]

Los grupos amino se encuentran presentes en los residuos de la lisina, que a su vez es el aminoácido más abundante en el exterior de las proteínas. El fácil acceso a los aminos y la posible funcionalización de superficies para obtener aldehídos sobre ella, hace que el uso de uniones amidas sea un buen método para la inmovilización de los anticuerpos.

Esta técnica suele estar acompañada de un agente bloqueante, como puede ser la etanolamina, que bloquea los grupos carbonilos que quedaron libres luego de la unión amida. Como ejemplo se puede observar en la Figura 10 los efectos de la etanolamina en la inmovilización de proteínas en superficies de óxido de silicio.

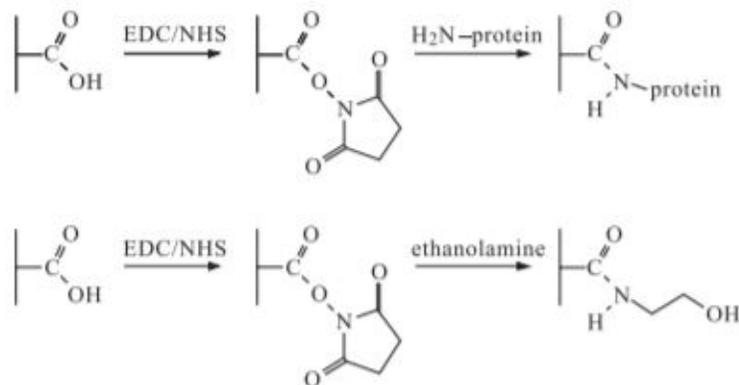


Figura 10: Proceso superior: Reacción EDC/NHS con grupos carboxilo para luego generar la unión covalente con la proteína. Proceso inferior: bloqueo de los grupos N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) activos [42].

5.5. Técnicas de caracterización

Las técnicas de caracterización nos permiten obtener información acerca de la composición, estructura y otras propiedades de algún material ante la interacción con alguna señal. En esta sección describiremos las dos técnicas que se utilizaron para caracterizar la formación del enlace amida de interés.

5.5.1. FTIR

La espectroscopía *infrarroja por transformada de Fourier* (FTIR) es una técnica analítica utilizada para identificar materiales orgánicos e inorgánicos. Cuando la radiación impacta en una muestra, una parte es absorbida y la otra transmitida. Luego el detector mide la intensidad de la luz reflejada por la muestra en función de la longitud de onda. La utilidad de la espectroscopía infrarroja surge de las diferentes bandas de absorción, que identifican componentes moleculares y estructuras.

La radiación infrarroja absorbida por la muestra generalmente excita a las moléculas a un mayor estado vibracional. La longitud de onda de la luz absorbida es una función de la diferencia de energía entre los estados vibratorios en reposo y excitados. La longitud de onda absorbida por la muestra es característica de la estructura de la misma, lo que permite identificar compuestos a partir de estos resultados.

La señal obtenida por el detector es un interferograma, que se analiza con una computadora usando la transformada de Fourier para obtener un espectro infrarrojo de un solo haz. Los espectros de FTIR se suelen representar como gráficos de intensidad en función a al número de onda (cm^{-1}). La intensidad puede ser graficada como el porcentaje de la luz transmitida o absorbida.

El espectro infrarrojo absorbido de una muestra desconocida se compara con espectros conocidos que se encuentran en la base de datos de la computadora o con espectros obtenidos de materiales conocidos para tener más información de la muestra de interés. Las coincidencias en el espectro identifican el polímero u otros constituyentes de las muestras. Por ejemplo la banda de absorción en el rango de 4000-1500 números de onda se dan por los grupos funcionales $-OH$, $C=O$, $N-H$, CH_3 y la región entre 1500-400 hace referencia a la región de identidad ya que en esta zona se dan generalmente fenómenos intramoleculares y son altamente específicos para cada material. La concentración cuantitativa de un compuesto se puede determinar a partir del área bajo la curva en regiones características del espectro IR [44].

5.5.2. Resonancia de plasmón superficial

La *resonancia de plasmón superficial* (SPR) es una técnica óptica capaz de evaluar la afinidad molecular, cinética, especificidad y concentración de biomoléculas con gran sensibilidad y sin el uso de moléculas con etiquetas. Esta técnica detecta la oscilación colectiva de los electrones libres, también denominados plasmones superficiales, a través de un haz de luz direccionado a una superficie metálica a través de un prisma y midiendo la reflexión correspondiente a esta interacción. [53]

Los elementos principales de esta técnica, como se puede observar en la Figura 11, son una fuente de luz, un sensor óptico, un prisma y una superficie metalizada, como puede ser el oro.

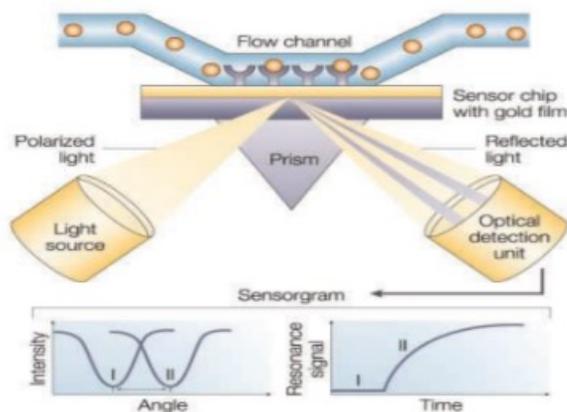


Figura 11: Componentes del SPR [51]

Se proyecta un rayo de luz sobre una placa con una delgada película de oro depositado que se encuentra apoyado sobre la superficie de un prisma. Para llevar a cabo la excitación de los electrones de la placa de oro es necesario que la velocidad del haz de luz se reduzca e iguale a la velocidad del plasmón de superficie o plasmon superficial.

Durante un ensayo para estudiar la interacción entre biomoléculas, se puede observar que al hacer pasar una sustancia con el antígeno, este forma un complejo con los anticuerpos de la placa, provocando que la intensidad del haz de luz y el ángulo de incidencia se vean reducidos y así el detector registra una notable disminución del haz de luz reflejado. Cuando la luz polarizada incide sobre la lámina de oro, en función de la masa que se haya fijado a su receptor, varía el índice de refracción del

medio líquido, provocando la variación en el ángulo de reflexión del haz de luz. Se puede relacionar la cantidad de masa en la superficie con la intensidad de la señal. La técnica SPR es entonces capaz de detectar cambios en la masa del líquido que se encuentra próxima a la placa mediante la medida de la variación del índice de refracción. [28]

Es una técnica analítica muy potente a la hora de monitorizar con gran sensibilidad y en tiempo real interacciones moleculares superficiales [52]. En este trabajo se utilizó para caracterizar la unión del anticuerpo a la superficie y del antígeno al anticuerpo.

5.6. Fotolitografía

Con los avances de la tecnología, hoy en día somos capaces de observar partículas a escalas muy pequeñas. Esta técnica permite construir estructuras con diseños personalizados con tamaños desde el orden de los 50 nanómetros, con el fin de crear un ambiente que nos permita generar interacciones a estas escalas. Es por ello que se utiliza la litografía, una técnica de manufactura que consiste en transferir un patrón y grabarlo sobre una superficie.

Originalmente, esta técnica se utilizaba para hacer carteles comerciales o como herramienta artística para hacer varias copias de un mismo trabajo.

El uso de esta técnica para la creación de circuitos integrados o dispositivos semiconductores se denomina, fotolitografía. Es un proceso análogo a la litografía en el que obleas de silicio se utilizan como sustrato litografico. Es la técnica más utilizada para procesos de microfabricación. Se han logrado estructuras de 32 nm a escala de producción y de 22 nm en laboratorio.

Las etapas de la fotolitografía son:

- Limpieza: la oblea de silicio suele traer una gran cantidad de contaminantes como polvo de mecanizado, polvo del ambiente, partículas abrasivas, bacterias, etc. Por lo que el proceso de limpieza es muy importante para un buen resultado.
- Deposición de la resina: puede ser a través de la deposición física por vapor (PVD, por sus siglas en ingles) que es un método de deposición de finas películas al vacío o por casetón. El casting puede ser por spraying de la resina o spin coating (Deposición de una pequeña cantidad de resina en el centro de la oblea y posteriormente hacer girarla a alta velocidad).
- Soft bake: Luego de la etapa de spin coating, la resina contiene un 15% de solvente y puede tener tensiones acumuladas. Se evaporan los solventes de la película exponiéndola a altas temperaturas y densi-

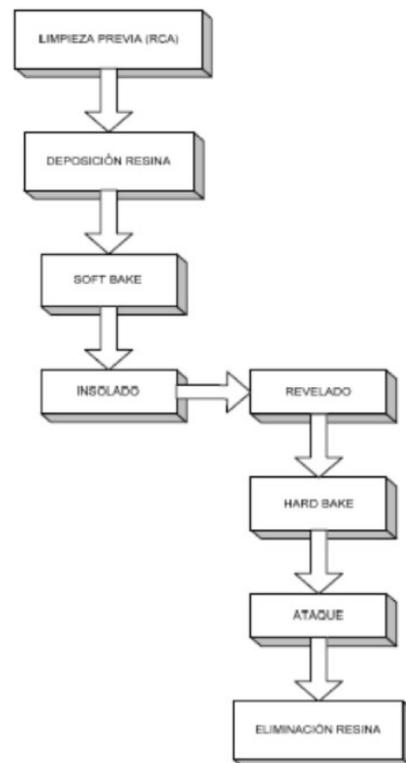


Figura 12: Diagrama de flujo de las etapas de microfabricación.

fica la resina tras su deposición homogeneizándola.

- Insolado: Se expone a la luz para disolver (positiva) o curar (negativa) la fotorresina.
- Revelado: La resina se disuelve en el revelador
- Hard bake : Calentamiento más fuerte, endureciendo la fotorresina y mejorando su adherencia a la superficie de la oblea. Esto ayuda a que la resina resista un ataque ácido.
- Grabado: Eliminar selectivamente silicio de la oblea. Este puede ser húmedo, donde los reactivos están en fase líquida o en seco, donde los reactivos están en fase de vapor y en plasma.

Finalmente elimino el resto de resina y queda formado el chip. [55]

5.7. PDMS

En esta sección realizaremos un análisis del material polidimetilsiloxano (PDMS) que luego utilizaremos para testear los protocolos de inmovilización de anticuerpos en superficies con micro-canales encapsulados con PDMS.

El PDMS, también conocido como dimetilpolisiloxano o dimeticona, pertenece a un grupo de compuestos organosilícicos poliméricos que comúnmente se denominan siliconas. Es el polímero orgánico a base de silicio conocido por sus propiedades reológicas (o de flujo) inusuales. Es ópticamente claro y, en general, inerte, no tóxico y no inflamable.

El PDMS es viscoelástico, lo que significa que a tiempos de flujo largos (o altas temperaturas), actúa como un líquido viscoso, similar a la miel. Sin embargo, a tiempos de flujo cortos (o bajas temperaturas), actúa como un sólido elástico, similar al caucho. La viscoelasticidad es una forma de elasticidad no lineal que es común entre los polímeros no cristalinos. La carga y descarga de una curva de tensión-deformación para PDMS no coinciden, la regla general es que aumentar la tensión dará como resultado una mayor rigidez. Cuando se elimina la carga, la tensión se recupera lentamente (en lugar de instantáneamente). Esta deformación elástica dependiente del tiempo resulta de las cadenas largas del polímero. Pero el proceso que se describe arriba solo es relevante cuando hay reticulación presente; cuando no es así, el PDMS de polímero no puede volver al estado original incluso cuando se elimina la carga, lo que resulta en una deformación permanente. Sin embargo, la deformación permanente rara vez se ve en PDMS, ya que casi siempre se cura con un agente de reticulación.

El PDMS le brinda también propiedades al biosensor que nos resultarán útiles para la obtención de los resultados. El PDMS unido a una superficie puede generar dispositivos de sensado de gas en soluciones acuosas [56], bacterias [57], entre otras. Como veremos en la próxima sección, que sea ópticamente transparente nos permitirá observar a través del microscopio la fluorescencia que emitirá el reactivo utilizado para la caracterización (estreptavidina fluorescente). También mediante el proceso de pegado del PDMS a superficies que describiremos más adelante en la sección 7.2.4 se logra genera una adherencia irreversible a la superficie de vidrio y óxido de silicio generando un ambiente más controlado y libre de impurezas en los canales que quedan entre el PDMS y la superficie. Por último, este material es utilizado para el diseño de Lab-on-a-Chip gracias a sus propiedades de biocompatibilidad [58].

En este trabajo el PDMS se utilizó para la creación de dispositivos formados por la unión de el mismo con superficies de óxido de silicio con canales. Con estos

dispositivos armados se realiza el protocolo de inmovilización de anticuerpo haciendo fluir los reactivos por los canales.

5.8. Estreptavidina - Biotina

El complejo biotina:(estrept-)avidina es uno de los sistemas de marcaje no radioactivos más sensibles utilizados en áreas de biotecnología y biología molecular. Esta tecnología es aplicada en el diseño de ensayos de detección de antígenos mediante la adherencia de biotina a anticuerpos, los cuales son capaces de reconocer y unirse al antígeno de interés. El marcaje no radioactivo resulta en técnicas más seguras y fáciles de realizar debido a que no requieren de ambientes específicos para el manejo de isótopos ni de personal entrenado para su eliminación.

De los veinte aminoácidos que conforman las proteínas, solo una porción de ellos posee cadenas laterales útiles para la conjugación con etiquetas. Este grupo está conformado por los aminoácidos lisina (Lys), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu). Estos cuatro aminoácidos poseen grupos funcionales reactivos bajo condiciones estándares acuosas, por lo que la mayoría de reactivos comerciales de conjugación se dirigen hacia ellos.

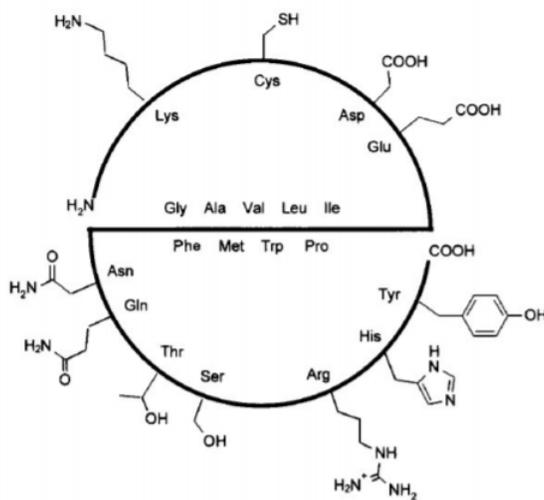


Figura 13: Los residuos en la mitad superior de la proteína son apropiados para el marcaje y conforme se avanza en sentido horario se vuelven menos apropiados. En el centro se muestran aminoácidos no reactivos o que usualmente no se encuentran expuestos al solvente [59]

El grupo funcional más conveniente y útil para el marcaje es el grupo amino primario que se encuentra en el grupo épsilon amino de la cadena lateral de la Lys y en el extremo N-terminal. Dentro de los agentes más recomendados se encuentran los ésteres N-hidroxisuccinimida (NHS) al igual que su forma sulfatada (NHSS). Estos agentes son estables y debido a su reactividad con los grupos amino de las

proteínas, los tiempos de reacción son de tan solo 0,5 - 2 horas, además de encontrarse disponibles en una variedad de marcas comerciales [60].

La biotina es una molécula pequeña de 244,31 daltons (Da). Por su parte, la avidina es una glicoproteína que contiene cuatro subunidades idénticas de 16,4 kilo daltons (kDa), dando un peso molecular de aproximadamente 66 kDa. Cada subunidad tiene un sitio de unión a una molécula de biotina y una modificación de oligosacárido que se encuentra vinculada a la asparagina (Asn). El alto componente de oligosacáridos consiste principalmente en manosa y N-acetilglicosamina, por lo que puede interactuar inespecíficamente con cargas negativas, especialmente con las de superficies celulares y ácidos nucleicos [61], [62], [63].

Por estas razones, actualmente se suele emplear como conjugado la estreptavidina, que proviene de la bacteria *Streptomyces avidinii*. La estreptavidina es una proteína de 60 kDa que, al igual que la avidina, tiene la capacidad de unirse a cuatro moléculas de biotina por molécula de proteína con una alta afinidad de 10-15 kDa. Se trata de una proteína no glicosilada de cuatro subunidades, cada una de 159 aminoácidos. Las dos proteínas tienen un 33 % de similitud en su secuencia y cuatro residuos de triptófano estarían involucrados en los sitios de unión a la biotina. En general, el uso de estreptavidina ocasiona una menor unión inespecífica que la avidina debido a que no presenta carbohidratos. Sin embargo, contiene una secuencia tripéptica de Arg-Tyr-Asp (RYD) que puede mimetizar la secuencia de unión de fibronectinas que es Arg-Gly-Asp (RGD), por lo que puede unirse inespecíficamente a integrinas y a receptores de fibronectinas bajo ciertas condiciones [64], [65], [66], [67].

Para la incorporación de biotina en proteínas, se utilizan derivados de biotina que contienen porciones reactivas capaces de unirse a determinados grupos funcionales de las proteínas. A través de esta modificación denominada biotinilación, se obtienen proteínas capaces de unirse a la avidina/estreptavidina. Los agentes biotinilantes empleados son relativamente pequeños, por lo que los reactivos no deberían afectar significativamente las propiedades químicas y físicas de la molécula [68].

Un agente de biotinilación básico consiste en un anillo bicíclico con una cadena lateral de ácido valérico de la D-biotina en un extremo y un grupo reactivo en el otro extremo. La adición de un “brazo espaciador” entre ambos consiste en uno o dos ácidos aminohexanoicos que otorgan cierta distancia entre la molécula modificada y el compuesto de biotina. Su función es mejorar la interacción con la avidina/estreptavidina, ya que los sitios de unión a biotina son bolsillos que se encuentran alrededor de 9 Å debajo de su superficie. Esta estructura permite que el grupo de biotina fusionado a la molécula de interés sea más accesible y se una mejor a los conjugados de avidina/estreptavidina [69].

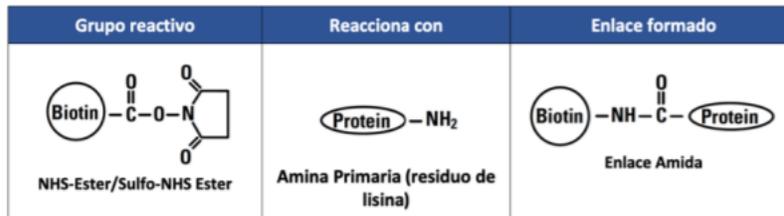


Figura 14: Reacción de biotilación con agentes derivados de ésteres de biotina NHS [59].

La interacción altamente específica entre la avidina/estreptavidina y la biotina ha permitido su aplicación en inmunoensayos, sobretodo en el campo de inmunodiagnóstico. Esta tecnología es empleada en el diseño de ensayos de detección de antígenos mediante la incorporación de biotina a anticuerpos, capaces de reconocer y unirse a un antígeno en particular. La aplicación del sistema biotina: (estrept-)avidina en inmunoensayos se debe principalmente a que ofrece un incremento en la señal del ensayo, dado que varias moléculas de biotina pueden ser introducidas químicamente a una molécula de anticuerpo. De esta manera, en el paso de detección del anticuerpo más de un conjugado de avidina/estreptavidina unida a un fluoróforo, es capaz de unirse al anticuerpo. Existen diferentes tipos de fluoroforos,

en una primera división puede ser orgánicos, proteicos o los llamados puntos cuánticos, que utilizan nanocristales. La elección del fluoróforo va a estar asociada al tipo de experimento que se está realizando. Para este caso en particular, se utilizó el fluoróforo FTIC o Isotiocianato de fluoresceína, que es un colorante de xanteno y es comúnmente utilizado en experimentos con anticuerpos.

Una inmunoglobulina IgG típica de humano contiene alrededor de 120 cadenas laterales de Lys. A menos que los residuos de Lys más reactivos se encuentren en el sitio de unión al antígeno, la capacidad de unión del anticuerpo no debería verse afectada.

5.9. Procesamiento de Imágenes

Una vez llevados a cabo los experimentos de inmovilización de anticuerpos en las superficies que detallaremos a lo largo del trabajo, se obtuvieron imágenes digitales las cuales presentan luces verdes. Estas luces representan la fluorescencia emitida por la estreptavidina conjugada a un fluoróforo, es decir, la cantidad de uniones que se lograron generar entre la estreptavidina y la biotina. Dado que se realizó el proceso de biotilación, detallado en el protocolo de la sección 7.4, la presencia de estreptavidina en las superficies refleja la presencia de biotina en las mismas que a su vez representa la exitosa inmovilización del anticuerpo en la superficie.

Dicho esto, se tomará como método de caracterización de la inmovilización la intensidad y presencia de fluorescencia que se visualice en las imágenes producto de la emisión de la estreptavidina conjugada a un fluoróforo.

Cada píxel de la imagen puede tener un valor de intensidad entre 0 y 255. Si tenemos en cuenta que nuestro *data set* es de alrededor de 230 imágenes RGB (capas de la imagen: Red, Green y Blue) de (1024, 1360, 3) píxeles, el volumen de información que se puede obtener analizando 960 millones de píxeles será de gran utilidad para obtener un análisis certero.

A la hora de realizar un procesamiento de imágenes es importante filtrar los ruidos o las fuentes de ruido en la medida que sea posible. Esto logra evitar interferencias en el análisis de los datos y en la verosimilitud de los resultados.

Nuestro objetivo con el procesamiento de imágenes fue lograr analizar el nivel de fluorescencia que emite la estreptavidina conjugada a un fluoróforo, para ello tomamos como parámetro de medida la luminiscencia la cual es utilizada para medir la fluorescencia verde. La luminiscencia en una imagen RGB se mide con la fórmula [70]:

$$L = 0,2126 * R + 0,7152 * G + 0,0722 * B \quad (1)$$

Se puede ver que la ecuación le atribuye mayor peso o importancia a la capa de color verde de la imagen con lo cual se puede decir que es un buen parámetro para analizar la intensidad y distribución de la fluorescencia verde de las imágenes. Así se lograrán comparar los resultados obtenidos entre las distintas muestras y poder concluir si la condición de estudio posee mayor concentración de estreptavidina por presencia de anticuerpo biotilado que aquellos que no tienen su presencia.

6. Objetivos

Objetivo General: En este proyecto se propone construir una superficie que brinde a un biosensor la especificidad necesaria para la detección de bacterias y/o toxinas causantes de infecciones alimentarias, como el síndrome urémico hemolítico. Como modelo de aproximación, y por razones de bioseguridad, se trabajará con anticuerpos no relacionados a la bacteria o toxina.

Objetivos Específicos:

- Delimitar sobre un sustrato una región a funcionalizar
- Poner a punto la inmovilización de anticuerpos sobre la superficie, explorando 2 materiales diferentes, el oro y el óxido de silicio, habitualmente utilizados en esta clase de sensores.
- Implementar el protocolo sobre superficies de óxido de silicio encapsuladas con PDMS.
- Caracterizar la inmovilización de los anticuerpos

7. Materiales y Métodos

7.1. Metalización de superficies

Una etapa importante de este proyecto, es el proceso de metalización de la superficie de trabajo. Se trabajó con superficies de vidrio de 2cm^2 donde el objetivo era metalizarlas con Au, pero para ello fue necesario realizar un pretratamiento sobre las mismas.

Como primer paso, se tomó una oblea de vidrio de 1 mm de grosor y se midió 7.5 cm por 1.5 cm para marcar los límites de las superficies que se quieren obtener a lo largo de la oblea. Con un lápiz de punta de diamante y una regla se remarcaron los límites generando surcos que luego con un poco de presión se quebraron obteniendo rectángulos de vidrio de tamaños similares.

Una vez cortadas las superficies fue necesario limpiarlas. Para esto se remojaron en agua destilada para remover restos de polvo y posibles astillas generada por los cortes, después se prosiguió a realizar un tratamiento con un ácido fuerte. Este tipo de soluciones, aplicado sobre el vidrio, sirven para eliminar residuos orgánicos que pueden residir sobre la superficie.

En nuestro caso, se trabajó con una solución de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno en una relación 3:1, conocido también como piranha ó piraña. Dado que el ácido sulfúrico es un ácido fuerte, fue necesario realizar este procedimiento bajo una campana extractora, con guantes, anteojos y bata de laboratorio como medidas de seguridad. Se vertió el ácido sulfúrico en un recipiente de vidrio, con las placas de vidrio en ella, y después se volcó lentamente y en forma de círculos el peróxido de hidrógeno, generando una reacción exotérmica. Se dejó reaccionar durante treinta minutos y luego se prosiguió a lavar las placas con agua destilada, isopropanol y acetona para limpiar los restos de suciedad y reactivos de la piraña.

Para metalizar las superficies se usó la metalizadora Quorum q300t de Quorum Technologies, donde se metalizaron las superficies de vidrio mediante alto vacío de plasma con 10 nm de cromo como mordiente y por arriba 50 nm y 100 nm de oro puro. La tasa de depósito para el cromo era de 41 nm/minuto, por lo que para obtener los 10 nm fueron necesarios 15 segundos de depósito. Para el oro, su tasa de depósito es de 67,2 nm/minuto, en este caso se querían conseguir 50 nm de grosor, por lo que el tiempo fu de 45 segundos.

En una segunda instancia, donde necesitamos generar nuevas superficies de oro, se depositó el doble de material, por lo que se generó una capa de 100 nm. Para ello

fue necesario duplicar el tiempo de depósito en la moralizadoras. Se optó por este cambio de grosor ya que cuando se realizó el lavado con piraña en las superficies con 50 nm de Au, la capa de oro era tan delgada que el mismo se despegó de las superficies.

Las superficies que fueron metalizadas con un grosor de 100 nm de oro generaron superficies muy opacas al paso de la luz, dado que el oro es un metal. Las superficies metalizadas con un grosor de 50 nm, al ser lavadas con piraña, la capa de oro era tan delgada que el mismo se despegó del vidrio. Se optó finalmente por utilizar las

superficies de 50 nm de depósito de oro y 10 nm de cromo como mordiente, realizar la limpieza con ácido antes a la metalización para evitar problemas con las superficies y realizar una limpieza menos violenta posterior a la metalización.

7.2. Inmovilización de Anticuerpos

Se ensayaron tres experimentos de inmovilización del anticuerpo biotinilado. Sobre superficies de Au, sobre superficies de SiO₂ y sobre un canal de 1 mm en la superficie de SiO₂ encapsulado en PDMS . A continuación se detallaran los distintos protocolos que se aplicaron para inmovilizar los anticuerpos en las distintas superficies y entornos.

Para cada tipo de material (Au y SiO₂), se realizaron 4 pruebas con distintos tipos de combinaciones de reactivos como se puede observar en la Figura 15. Por un lado se inmovilizaron anticuerpos biotinilados que posteriormente se revelaron con estreptavidina, que representaría la condición de estudio. Por otro lado, se inmovilizaron sobre las superficies anticuerpos sin biotinilar y Albumina de Suero Bovino (BSA) y luego fueron incubadas con estreptavidina conjugada con un fluoróforo. Estas últimas funcionan como control, para estimar las uniones inespecíficas que podrían aparecer.

Reactivos/Superficies	Oro	Óxido de Silicio
Anticuerpo biotinilado con estreptavidina	Au + AcB + S	SiO ₂ + AcB + S
Anticuerpo con estreptavidina	Au + Ac + S	SiO ₂ + Ac + S
Anticuerpo y Albúmina de Suero Bovino con estreptavidina	Au + BSA + S	SiO ₂ + BSA + S
Estreptavidina	Au + S	SiO ₂ + S

Figura 15: Tabla de las combinaciones de pruebas que se realizaron en las superficies de oro y óxido de silicio. Referencias: Ac: anticuerpo, AcB: anticuerpo biotinilado, S: lavado con estreptavidina, BSA: Albúmina de Suero Bovino, Au: oro, SiO₂: óxido de silicio

Para evitar confundir las muestras, en las Figuras 16 y 17 se pueden observar algunos ejemplos de recipientes rotulados que utilizamos para almacenar superficies ó que utilizamos como soporte para realizar los protocolos de inmovilización para identificar con facilidad a qué grupo de prueba pertenecía cada muestra.

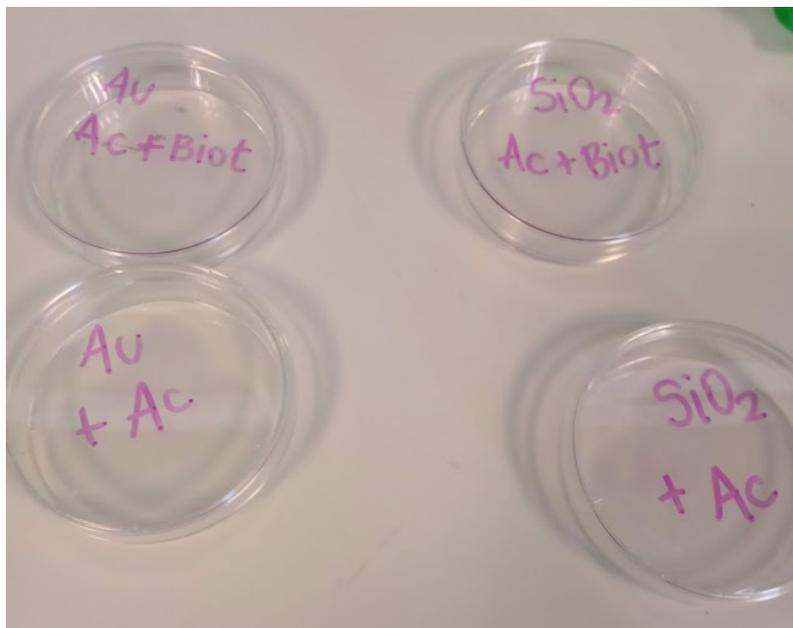


Figura 16: Recipientes en los que se realizaron los protocolos y se almacenaron las superficies con sus respectivos rótulos para poder identificarlas correctamente.

7.2.1. Superficie de Au

En esta sección se analizará en detalle el protocolo de inmovilización de anticuerpos sobre superficies de oro.

Para lograr una inmovilización de anticuerpos en superficies de oro de manera exitosa, en primer lugar tenemos que asegurarnos de que dicha superficie se encuentre en las mejores condiciones de higiene posibles. Para lograr esto se realizan dos limpiezas: una orgánica y otra inorgánica.

1. Limpieza Orgánica

Se mezcla ácido sulfúrico H_2SO_4 y peróxido de hidrógeno H_2O_2 en la proporción 3:1. Incubación por 15 minutos.

En primera instancia se realizó una limpieza orgánica con una mezcla de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno en una proporción 3:1, también conocido como Piranha ($3:1 H_2SO_4/H_2O_2$). Para realizar esta mezcla es importante contar con elementos de seguridad como anteojos, guantes y guardapolvos

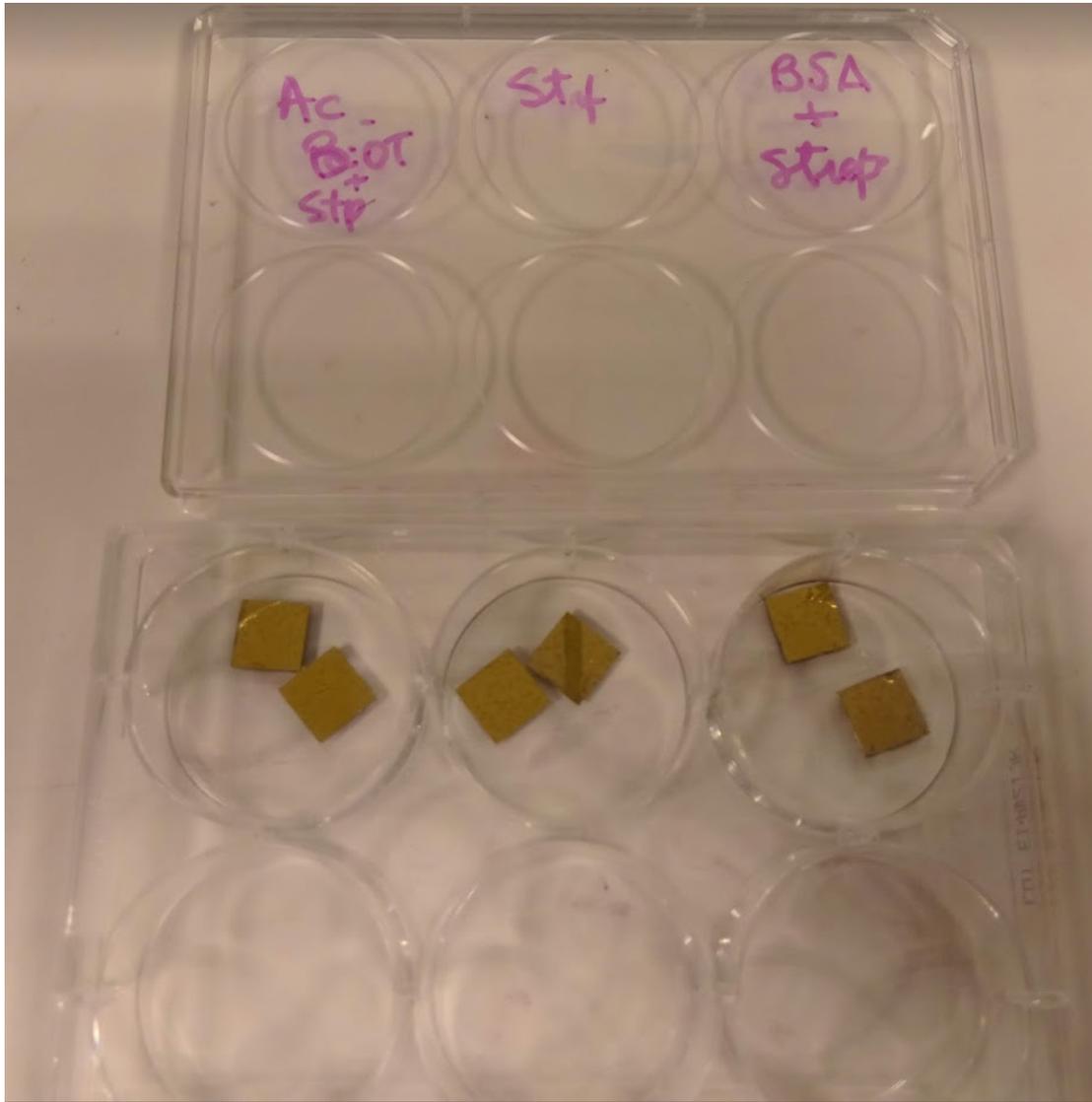


Figura 17: Recipientes en los que se realizaron los protocolos y se almacenaron las superficies con sus respectivos rótulos para poder identificarlas correctamente.

para cubrir los ojos y la piel dado que se está trabajando con un ácido fuerte como también realizarla dentro de una campana de gases con extractor.

Es importante aclarar que en este procedimiento, a diferencia de como se acostumbra a hacer, primero se coloca el ácido en el recipiente y luego se derrama lentamente el peróxido de hidrógeno en forma de círculos. Este fuerte oxidante eliminará la mayor parte de la materia orgánica y también hidroxilará

la mayoría de las superficies (agregará grupos OH), haciéndolas altamente hidrófilas (compatibles con el agua). Luego de haber realizado la solución se sumergen las superficies de vidrio en la misma y se deja actuar por 15 minutos. Las superficies se retiraron con una pinza, se enjuagaron en un recipiente con agua destilada y luego se almacenaron en etanol puro.

2. Limpieza Inorgánica

Limpieza inorgánica RCA 1: agua destilada H_2O , hidróxido de amonio NH_4OH y peróxido de hidrógeno H_2O_2 en proporciones 5:1:1. Dejar reaccionar durante 1 minuto a $70-80^\circ C$.

Luego se realizó la limpieza inorgánica RCA 1 sumergiendo las superficies de vidrio en una solución de 100 ml de agua destilada, hidróxido de amonio NH_4OH y peróxido de hidrógeno H_2O_2 en proporciones 5:1:1 durante 1 minuto a $70-80^\circ C$. Esta solución genera radicales hidroxilo que atacan a la membrana lipídica, DNA y otros compuestos esenciales para la supervivencia de los microorganismos. También tiene un efecto oxidante que elimina una delgada capa de la superficie y elimina de contaminación iónica.

3. Metalización de superficies

Descrito en la sección 7.1

4. Formación de monocapas auto-ensambladas : SAM (self-assembled monolayers)

Tratamiento de la superficie con el tiol MUA (ácido mercapto undecanoico) entre 50 y 100 μM en etanol. Preparar la solución en el momento. Incubación toda la noche a $4^\circ C$ en oscuridad.

Una vez lavadas las superficies, se sumergieron en una solución 100 μM de tioles de ácido mercapto undecanoico (MUA) en etanol durante toda una noche (aproximadamente 18 horas) a $4^\circ C$ en la oscuridad. Por lo tanto el recipiente que contenía las superficies se envolvió en aluminio y se dejó incubar en la heladera. El tiempo de incubación no solo es necesario para que se formen las uniones covalentes entre la superficie y los tioles sino también para que se

produzca el ordenamiento de las cadenas de hidrocarburos y la exposición de los grupos terminales. Vale aclarar que aunque con el uso de otros solventes no polares esta reacción es más rápida, la formación SAM que se genera usando etanol es mucho más organizada y densa.

5. Activación de tioles MUA

Para la activación del tiol se utiliza una solución 25M cuyos solutos son NHS y EDC con 76 % de EDC en proporción al NHS y agua destilada como solvente. Dejar incubando durante 15 minutos a 4° C. Luego de este intervalo de tiempo, no enjuagar la superficie.

Para cada superficie se prepararon 250 μL de solución preparada con 0,02 g EDC y 0,006 g NHS para 850 μL de agua destilada. Se colocaron todas las superficies en un recipiente plano, como se puede observar en la Figura 18, y luego se aplicaron 250 μL con una micro pipeta a cada superficie cubriendo la totalidad de su área. Luego cuidadosamente se colocó el recipiente en la heladera y se lo dejó incubar durante 15 minutos en la heladera.

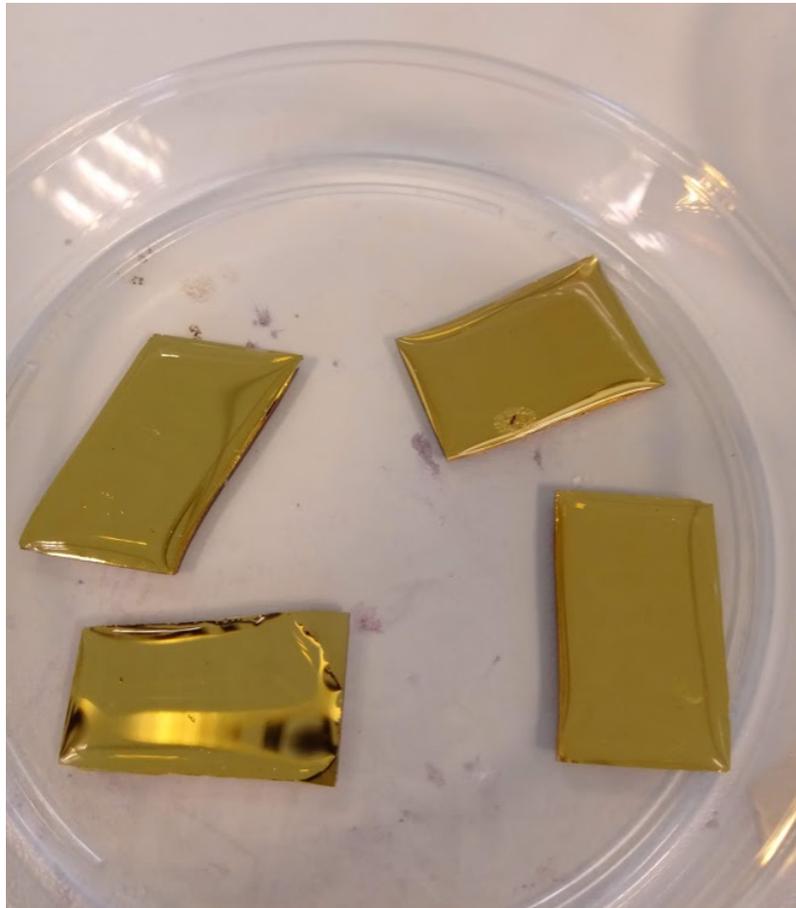


Figura 18: Recipiente en el que se almacenaron las superficies para llevar a cabo el protocolo de inmovilización de anticuerpos. En su interior se pueden observar 4 superficies de vidrio metalizadas con Au.

6. Biotinilación de los Anticuerpos

Solución 20:1 de NHS-Biotina anticuerpo durante 2hs a 4 °C.

Ver proceso en la sección 7.4.

7. Anticuerpo

Agregado del anticuerpo 0,1 $\frac{mg}{ml}$ en acetato de sodio pH6. Dejar 1 hora a 4 °C.

Se trabajó con una solución de anticuerpo anti-ferritina 4,7 $\frac{mg}{ml}$ en acetato de sodio.

Se tomaron 10,64 μl de la solución de anti-ferritina del laboratorio, los cuales son 50 μg de soluto y se completa con acetato de sodio para llegar a los 500 μl necesarios para alcanzar a la concentración de 0,1 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$. Se incubó durante 1 hora en la heladera.

8. Etanolamina

Lavado con etanolamina 1M. Dejar reaccionar durante 15 minutos. Enjuagar con PBS (Disolución reguladora de fosfato)

Una vez que se produce la unión del anticuerpo con la superficie, como se observa en la imagen superior de la Figura 10 de la sección 5.4.2, se busca que no se generen nuevas uniones en la superficie con otros reactivos que no sean el anticuerpo biotinilado. También se quiere que la estreptavidina, que luego se agregará, no se una a los grupos activos de la superficie dando señales de fluorescencia en lugares donde no corresponda.

Para evitar uniones inespecíficas y señales indeseadas se lavaron las superficies con etanolamina durante 15 minutos para bloquear los grupos N- hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) activos como se observa en la imagen inferior de la Figura 10 de la sección 5.4.2.

Para mejorar el lavado, se colocó el recipiente con las superficies y la etanolamina, en un agitador orbital para que en esos 15 minutos de incubación se bloqueen la mayor cantidad de grupos Sulfo-NHS activos como se explica en la sección 5.4.2.

9. Estreptavidina

Una vez inmovilizados los anticuerpos, se agregó una solución 50% v/v de estreptavidina en agua destilada. Se envolvió el recipiente que contiene las superficies en aluminio para protegerlas de la luz y se dejó reaccionando durante 1 hora a 4°C en la heladera del laboratorio. Esta parte del protocolo se detallará en mayor profundidad en la sección 7.5 *Revelado de estreptavidina*.

7.2.2. Superficie de SiO₂

En esta sección se analizará en detalle el protocolo de Inmovilización de anticuerpos sobre sustratos de silicio hidroxilados.

Se obtuvieron superficies de 1x1 cm o 1x2 cm, a partir de una oblea de SiO₂, marcando con una regla los límites de la oblea y luego generando surcos con una punta de diamante. Se generó presión en los límites surcados para obtener los cortes deseados. Luego del clivaje se limpiaron las superficies con agua destilada para remover las astillas o el polvo remanente de las superficies. Las superficies resultantes se pueden observar en la Figura 19.

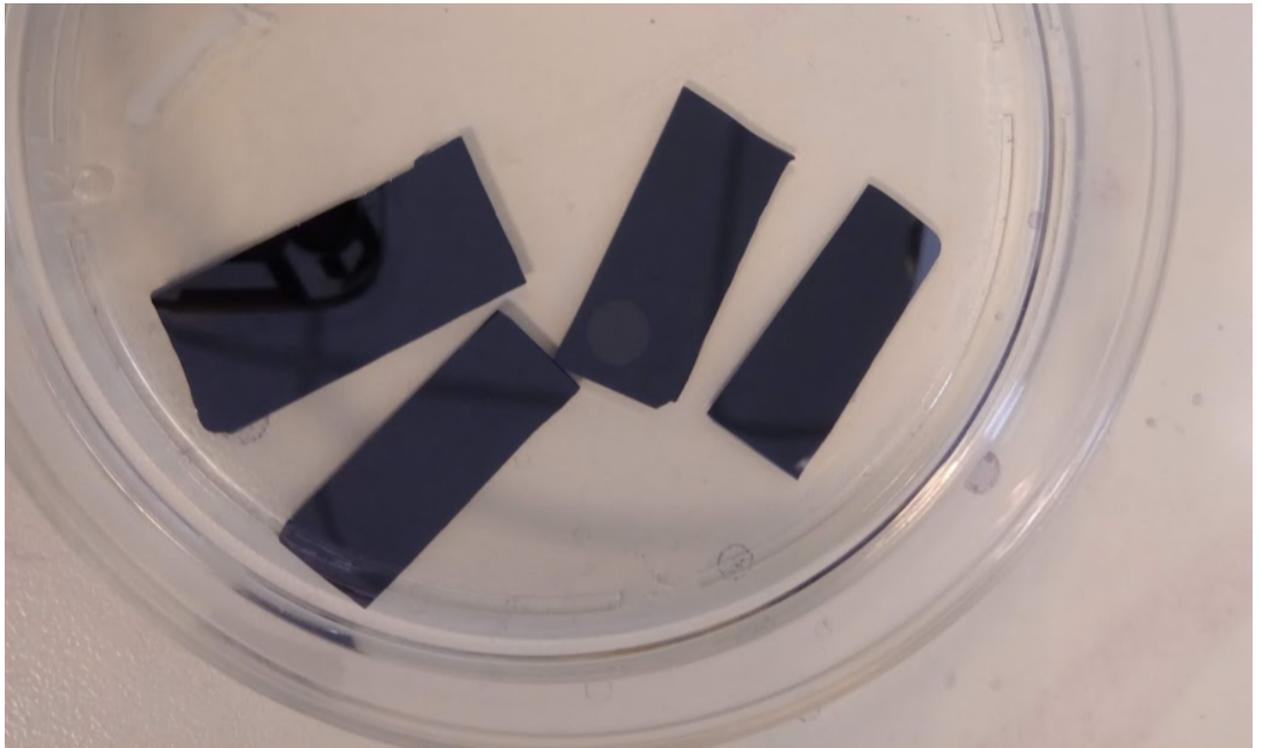


Figura 19: Recipiente en el que se mantienen las superficies para llevar a cabo el protocolo de inmovilización de anticuerpos. En su interior se pueden observar 4 superficies de SiO₂

1. Limpieza y activación de la superficie

Se mezcla ácido sulfúrico H_2SO_4 y peróxido de hidrógeno H_2O_2 en la proporción 3:1. Incubación por 30 minutos. Enjuagar con agua y etanol. Almacenaje en etanol puro.

Para asegurar la completa limpieza de las superficies, se realizó un lavado con Piranha (3:1 H_2SO_4/H_2O_2) durante 30 minutos. Para realizar este procedimiento es importante tener en cuenta las medidas de seguridad mencionadas en la sección 7.2.1 ya se que esta tratando con sustancias químicas muy fuertes. Debido a que la mezcla es un fuerte agente oxidante, se eliminará la mayor parte de la materia orgánica contaminante y hidroxilará (agregara grupos OH) a la superficie, haciéndola más hidrofílica.

2. Preparado de la solución de APTES

La solución para la silanización es de 5 % APTES, 5 % agua y 90 % etanol

3. Inmersión de las obleas

Sumergir en la solución previamente preparada por 2h a temperatura ambiente. Para limpiar, enjuagar 3 veces con agua y luego 3 veces con etanol. Las obleas pueden ser almacenadas sumergidas en etanol.

4. Generación de grupos aldehídos

Reacción 2.5 % (v/v) glutaraldehído en PBS. Incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Enjuague con PBS.

Utilizar esta solución para unir el IgG con la superficie permite la unión covalente. Este tipo de interacción entre ambas partes genera una capa más ordenada y orientada de los anticuerpos, asegurando uniones más estables de Ac-Ag y evitando posibles desnaturalizaciones.

Se partió de una solución de glutaraldehído de 25 % Glu/PBS. Dado que el protocolo requiere una concentración de 2,5 %, es necesario realizar una di-

lución. Para poder sumergir las superficies en la solución solo se necesitaban preparar 100 ml.

Agregando 10 ml de la solución de glutaraldehído de 25 % Glu/PBS y 90 ml de PBS, se obtuvieron 100 ml de una solución 2,5 % de Glu/PBS.

5. Biotinilación de los Anticuerpos

Solución 20:1 de NHS-Biotina anticuerpo durante 2hs a 4 C.

Ver proceso en la sección 7.4.

6. Inmovilización del anticuerpo

Reacción IgG humano $0,1 \frac{mg}{ml}$ de anticuerpos en PBS durante 60 minutos. Enjuagar con PBS.

La solución de anti-ferretina con la que se trabajó era de 4,7mg/ml, pero era necesario llevarlo a una concentración de 0,1mg/ml en PBS por lo tanto se tomaron 0,0213 ml de solución.

Se llevó el volumen a 1 ml con PBS y así se obtuvo la concentración deseada. Para no desperdiciar reactivos y asegurar una distribución uniforme sobre la superficie, se utilizaron papeles de parafina para contener la solución directamente sobre la superficie. Esto permite reducir el volumen de anticuerpos preparados en solución al orden de los micro litros.

7. Etanolamina

Lavado con etanolamina 1M. Dejar 15 minutos. Enjuagar con PBS

Una vez que se produce la unión del anticuerpo con la superficie, se busca evitar que se generen nuevas uniones de la superficie con otros reactivos que no sean el anticuerpo biotinilado, como puede ser la estreptavidina libre dando señales de fluorescencia en lugares donde no correspondería. Para evitar uniones inespecíficas y señales indeseadas lavamos las superficies con etanolamina durante 15 minutos para bloquear los grupos aldehídos restantes. Para

mejorar el lavado, se colocó el recipiente con las superficies y la etanolamina en agitación.

8. Estreptavidina

Una vez terminado el protocolo de inmovilización de anticuerpos, se lavaron las superficies con una solución de estreptavidina de igual manera que en la sección 7.2.1.

7.2.3. Litografía

En primer lugar, antes de comenzar con el proceso de fotolitografía es necesario crear la máscara fotográfica o fotomáscara. Para ello se utilizó el programa Illustrator, donde se creó una máscara de campo claro con el prototipo establecido.

Sobre la oblea se vierte la fotoresina, esta es un material sensible a la luz que es capaz de alterar sus propiedades físicas ante la exposición a ella. Para crear nuestros diseños, se utilizó una fotoresina negativa, es decir que esta se endurece ante la exposición de luz y calor. Para ello se la expone a la luz UV controlada, con una intensidad y tiempo determinados para alcanzar la altura de los canales deseados. En la sala limpia de la CNEA, se cuenta con un alineador de máscaras para litografía de una o dos caras, el equipo EVG-620. Se expuso a la fotoresina a una radiación UV de 300W de potencia con haz de plano de 6" durante 10 segundos para cambiar sus propiedades y poder obtener el modelo deseado.

Para el proceso de spin-coating, se utilizó un G3P SPINCOAT de Specialty Coating Systems Inc. Luego se utilizó la TLK 49 de Tecnologic para la cocción de las fotoresinas, donde se colocó la oblea sobre el hot plate durante 1 minuto a 110°. Para el sputtering se utilizó el equipo ATC ORION series de AJA Internacional. Finalmente, para el proceso de lift-off se utiliza acetona para remover todo aquella fotoresina que no era parte del diseño original.

7.2.4. Superficie con micro-canales encapsulados con PDMS

El PDMS es el resultado de la unión de un elastómero y un agente curante en una relación de 10:1 generalmente. El mismo se utilizará para crear micro-canales entre la superficie y el PDMS.

- Obtención del PDMS

1. Se pesaron 9,24 g de elastómero y 0,886 g del agente curante para obtener 10,126 g de solución en una relación 1:10 de agente curante y elastómero. Estos gramos se pensaron para obtener un espesor de 1 mm aproximadamente cuando se vertiera la solución en media oblea de 50 micrones de 125 fotoresina como se puede observar en la Figura 20.
2. Se mezcló con una cuchara de plástico durante 5 minutos para lograr una solución lo más homogénea posible.

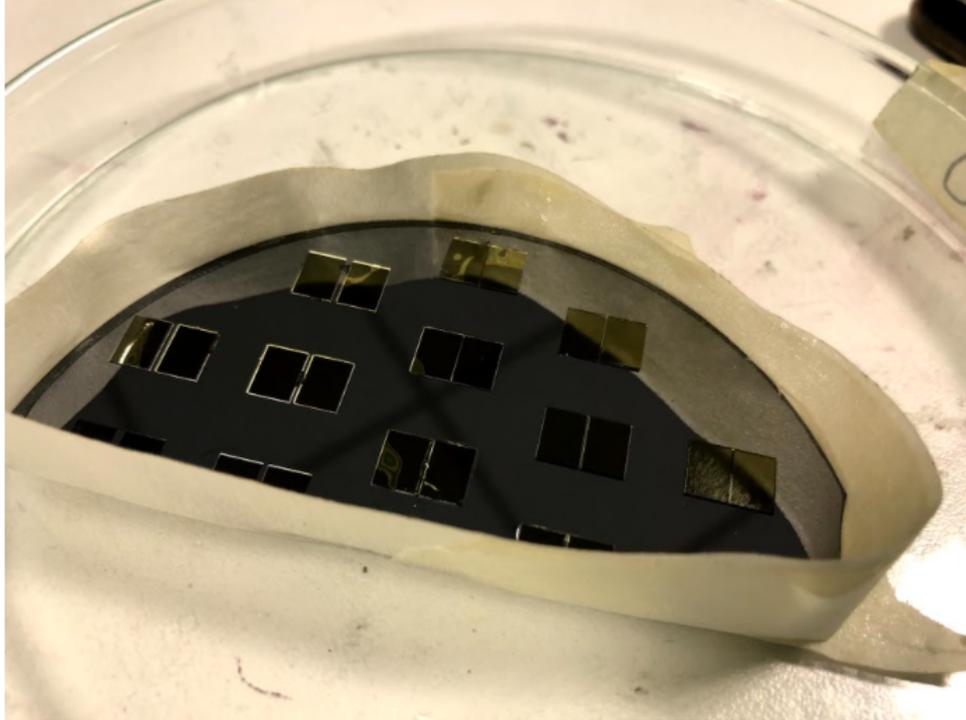


Figura 20: Media oblea de SiO_2 con uno de los diseños de micro canales hecho por litografía. En este caso los rectángulos que se observan son reservorios que servirán para contener distintas soluciones.

3. A la media oblea de 50 micrones de fotoresina, que se usará como molde, se le construyeron paredes con cinta de papel para evitar que la solución líquida se derrame. Dichas paredes se pueden ver en las Figuras 20 y 21.
4. Se vertió la solución de PDMS en el molde con una cuchara de plástico y se la desparramó para lograr una superficie de espesor homogéneo.
5. Al mezclar la solución se generaron muchas burbujas que hacían que la misma sea opaca y no se pudiera ver la oblea, por lo tanto se colocó la oblea en un recipiente de vidrio y luego en un desecador para sacarle a la solución de PDMS el aire atrapado. Este desecador consta de una cápsula de vidrio a la cual se le retira el aire con una bomba de vacío durante 15 minutos o hasta observar que las burbujas se habían ido. En la Figura 22 se puede ver el secador con la oblea.

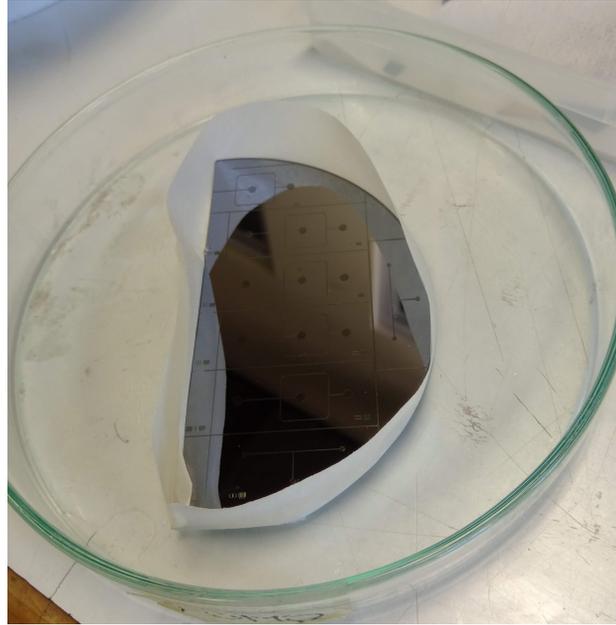


Figura 21: Molde de media oblea con paredes construidas con cinta de papel



Figura 22: Desecador para PDMS con manguera conectada a bomba de vacío

6. Cuando se observó que el PDMS no tenía más burbujas se retiró del desecador y con el fin de agilizar el proceso de solidificación del PDMS se lo colocó en el

horno durante 1 hora a 70°C.

7. Se retiraron las paredes de cinta de papel con mucho cuidado y se envolvió el PDMS con cinta adhesiva a ambos lados con el fin de evitar que se le adhiera suciedad durante su manipulación.
8. Se agujerearon los reservorios con una mecha de 1 mm.
9. Se retiraron las cintas adhesivas del PDMS.
10. Se realizó un lavado con etanol y con aire comprimido se secaron las superficies de SiO₂ y del PDMS.
 - Pegado del PDMS a la superficie
11. Se colocó, en una superficie de vidrio, el PDMS con los canales expuestos hacia arriba y la superficie de SiO₂ de la parte metalizada expuesta para arriba también.
12. Se colocó la superficie de vidrio con las superficies en una cápsula de vidrio conectada a una bomba de vacío instaladas dentro de un microondas como se puede observar en la Figura 23. Las superficies se colocaron de esta manera para generar una activación superficial y para luego generar la unión del PDMS y de la superficie de SiO₂.
13. Se generó vacío dentro de la cápsula encendiendo la bomba de vacío.
14. Durante 1 segundo se puso a funcionar el microondas, en ese intervalo de tiempo se observó una luz rosa que indica la generación de plasma, lo que activó las superficies y facilitó la unión de las superficies.



Figura 23: Interior del microondas con la cámara de vacío donde se genera el plasma.

15. Se mojaron las caras internas de PDMS con agua destilada y se unieron a las superficies de óxido de silicio con el fin de evitar que quede aire en el medio de ambas. La unión del PDMS con su diseño unido a las superficies generó los micro canales entre ambas partes.
16. Se colocaron pequeñas pesas encima de los prototipos durante 5 minutos con el fin de desplazar todo el aire que pudiera haber quedado entre la superficie y el PDMS.
17. Se colocaron en el horno los dispositivos unidas con los pesos a 100°C durante 10 minutos para evaporar el agua que pudo haber quedado atrapada.
18. Se colocaron nuevamente pesos encima de los dispositivos durante 15 minutos.
19. Con una micropipeta se inyectó agua destilada en el extremo A del dispositivo de la Figura 24 y se observó con el microscopio que el agua destilada salió por el otro extremo. Así verificamos la continuidad de los canales generados por una unión exitosa entre el PDMS y la superficie de SiO_2 .

La Figura 20 muestra uno de los diseños que se utilizaron para probar el protocolo de inmovilización de anticuerpos el cual simplemente consiste de dos reservorios contiguos, uno para realizar la prueba positiva y otro para la prueba control. Cuando se realizaron todos los pasos del protocolo de inmovilización de anticuerpos de la sección 7.2.2 fue posible darse cuenta que este diseño impedía enjuagar el reservorio una vez que se terminaba un paso y se quería continuar al siguiente. Por esta razón se optó por el diseño que se puede observar en la Figura 24 que posee canales, bifurcaciones y dos salidas que le permiten a la solución fluir de un extremo al otro permitiendo que cuando se enjuaga, el excedente salga por el extremo opuesto a la inyección de reactivos.

Se utilizaron superficies de SiO_2 y de Au para la formación de los dispositivos. Con las superficies de SiO_2 se logro una correcta unión con el polímero mientras que para el Au los resultados no fueron favorables. El proceso para lograr la unión entre metales como el oro y polímeros requiere de otros procesos, que involucran el manejo de gases peligrosos, por lo que se opto por solo trabajar con las primeras superficies.

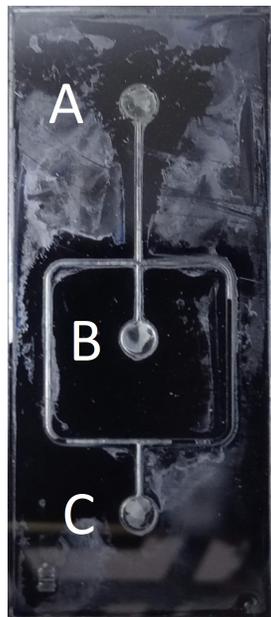


Figura 24: Diseño del molde para la creación del PDMS

Se realizaron 5 obleas de PDMS con el diseño de la Figura 24 para luego realizar el pegado en superficies de SiO_2 . Se obtuvieron resultados como los obtenidos en la Figura 25. De los 5 dispositivos se obtuvo uno defectuoso en el cual la superficie de PDMS no se pego completamente al SiO_2 .



Figura 25: Dispositivos de PDMS en superficie de SiO_2

Una vez que los dispositivos estaban armados se comenzó a aplicar el protocolo Inmovilización de anticuerpos en dispositivos PDMS.

Se tomó como base el protocolo de inmovilización de anticuerpos sobre sustratos de silicio hidroxilados ya que los dispositivos se armaron sobre superficies de SiO_2 . Se realizaron varias adaptaciones al protocolo original en cuanto a los tiempos de espera entre pasos y también la cantidad de muestras utilizadas.

Las inyecciones de las soluciones en el dispositivo de la Figura 24 se realizaron en el reservorio B mediante una micropipeta y se observó como se generaba una gota en el reservorio A lo que nos aseguraba que el canal se encontraba lleno. También en cada inyección se podía observar el frente de avance de la solución del reservorio B al A.

1. Preparado de la solución de APTES

- La solución para la silanización es 5 % APTES, 5 % agua destilada y 90 % etanol.

2. Inmersión de las obleas

- Sumergir los dispositivos en la solución por 2h a temperatura ambiente.
- Enjuagar con agua 3 veces y luego 3 veces con etanol.
- Almacenamiento en etanol.

3. Generación de grupos aldehídos

- Hacer reaccionar con 2,5 % (v/v) glutaraldehído en PBS por 2 horas a temperatura ambiente.
- Enjuagar con PBS

4. Inmovilización del anticuerpo

- Hacer reaccionar la superficie con la solución de anticuerpo $0,1 \frac{mg}{ml}$ en PBS durante 60 minutos.
- Enjuagar con PBS
- Sumergir por 15 minutos en etanolamina 1M para desactivar los grupos aldehídos restantes.

5. Solución de 100 μ l de estreptavidina y 100 μ l de agua destilada.

- Se coloca la solución en la superficie.
- Envolver el recipiente contenedor en aluminio para protegerlo de la luz.
- Hacer reaccionar durante 1 hora a 4°C.

En cada etapa del protocolo se observaban los canales a través del microscopio para asegurarnos de que la solución estuviera dentro de los canales reaccionando con la superficie.

Vale aclarar que como estábamos aplicando el protocolo a micro-canales, las cantidades que se utilizaban para el armado de las soluciones en cada paso eran mucho menores a aquellos que utilizados para las superficies en las secciones anteriores.

Para evitar la evaporación de los reactivos y soluciones en los canales, se optó por realizar la incubación en una cámara húmeda.

Una vez terminado el protocolo de inmovilización de anticuerpos, se lavaron las superficies con una solución de estreptavidina de igual manera que en la sección 7.2.1.

7.3. Resonancia de plasmón superficial

Una forma de caracterizar la unión de un anticuerpo a la superficie es la técnica de SPR, que mide fenómenos que tienen lugar sobre la superficie de oro en tiempo real. El propósito del uso de esta técnica fue el de observar las estructuras que se generaban a lo largo del protocolo.

Se utilizó el equipo SPR NAVI 210A que se puede observar en la Figura 26 con superficies de vidrio metalizadas con 50 nm de oro con un mordiente de titanio, incluidas en el material del equipo. En ambas celdas se realizó la inmovilización de anti ferritina en una concentración de $10 \frac{\mu g}{ml}$. En una de las celdas, se trabajó con Albúmina en una concentración de $300 \frac{\mu g}{\mu l}$ y en la otra con exceso de ferritina. El objetivo de esto era observar el cambio en la señal a medida que se generaban las reacciones, poder ver la unión específica Ac-Ag en la celda del Anticuerpo y con la BSA.



Figura 26: Equipo SPR NAVI 210A

Se definió una longitud de onda de 785 nm, que permitió mediciones más agudas y sensibles y una velocidad de barrido de medición de 3 segundos. La velocidad de flujo sobre las celdas fue de $10 \mu l/\text{minutos}$ para lavar las superficies en cada instancia utilizando agua destilada, ya que todos los reactivos estaban diluidos con agua. Lo primero que se hizo fue medir el ángulo de resonancia del oro con agua para utilizarlo como referencia obteniéndose un valor de 53° y con ello se procedió a realizar el preparado de las superficies.

Como indica el protocolo de Inmovilización de anticuerpos, se incubó con EDC-NHS para la activación las superficies. Se lo lavó durante tres minutos y se limpió con agua. Se colocó el anticuerpo para generar las uniones, si la activación es exitosa al colocar las proteínas se debería ver un primer desplazamiento del ángulo de resonancia, lo que se refleja como un aumento en en eje y. Con el fin de evitar uniones inespecíficas sobre las superficies, se colocó etanolamina antes de lavar con antígeno.

Para colocar el antígeno, ferritina, se hizo una primera incubación con una dilución de 1 en 100. Luego se hizo pasar por la celda nuevamente una concentración mayor de Ag. Finalmente, se hicieron dos lavados con NaOH 0.1 M para remover el Ag en cada celda.

7.4. Biotinilación

En este trabajo, resulta de suma importancia conocer el rol que ocupará la estreptavidina conjugada a un fluoróforo ya que mediante la fluorescencia que emite, podremos identificar si los anticuerpos biotinilados efectivamente se encuentran inmovilizados en la superficie o no. Acá toma importancia la biotinilación del anticuerpo. Para lograr que la estreptavidina identifique a los anticuerpos de una manera específica y sensible debemos contar con una unión específica. Como vimos en el apartado de Marco teórico en la sección 5.8 *Estreptavidina-Biotina*, esta interacción es altamente específica y genera un incremento en la señal dado que varias moléculas de biotina pueden ser unidas químicamente a una sola molécula de anticuerpo.

Por lo tanto si nuestro objetivo es que la fluorescencia emitida por la estreptavidina conjugada a un fluoróforo refleje la cantidad de uniones que se generaron entre la superficie y los anticuerpos debemos biotinar el anticuerpo para que luego la estreptavidina genera una unión específica con las biotinas unidas al anticuerpo.

A continuación detallaremos el protocolo que se siguió en este trabajo para biotinar los anticuerpos y los correspondientes reactivos utilizados.

Reactivos

- 20217 EZ-Link NHS-Biotin, 100mg, N-hydroxysuccinimidobiotin. Peso molecular: $341,38 \frac{g}{mol}$. Almacenamiento: recipiente desecado a temperatura ambiente.
- NHS-Biotina 10mM en DMSO (dimetil sulfóxido).

Procedimiento:

- Preparar la solución de NHS-Biotina en DMSO justo antes de usarse.
- Agregar el volumen calculado de proteína a la solución.
- Dejar reaccionar 2 hs a 4° C.
- Si es necesario, dializar para remover el exceso de NHS-biotina sin reaccionar.

Para realizar los pasos del protocolo fue necesario preparar algunas soluciones, para ello a continuación enumeramos los datos que tenemos para luego hacer los cálculos correspondientes para obtener las concentración que debemos utilizar para una correcta biotinilación del anticuerpo.

Datos:

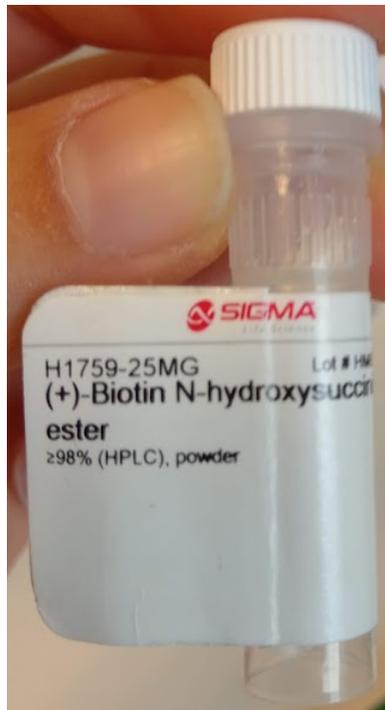


Figura 27: Reactivo Sigma NHS-Biotin.

- Solución NHS-Biotina 10 mM en DMSO
- Se debe agregar el reactivo de biotina con un exceso molar de 20 veces con respecto al Ac.
- La concentración del Ac que poseemos es de $4,7 \frac{g}{l}$.
- El peso molecular del Ac es de aproximadamente $150.000 \frac{g}{mol}$.
- La concentración de Ac final que deseamos es de $0,2 \frac{mg}{ml}$.

Cálculos:

Se utilizó una solución de anti ferritina con una concentración $4,7 \frac{g}{l}$. Para lograr agregar el reactivo de biotina con un exceso molar de 20 veces con respecto al Ac debemos calcular cuantos moles de anticuerpo hay en $4,7 g$ de solución. Sabiendo que un mol de anticuerpo pesa $150.000 g$, en $4,7g$ tenemos $3,13 \times 10^{-5}$ moles de Ac.

Luego sabiendo que necesitamos una relación molar 20:1 de NHS-biotina (B) y anti ferritina. Para $3,13 \times 10^{-5}$ moles de anticuerpo se necesitan $0,62 m$ moles de B.

Luego se pasó esta relación de moles a volumen sabiendo que la solución NHS-biotina tiene una concentración 10 mM y la del anticuerpo $4,7 \frac{g}{l}$. También se sabe que esos moles de Ac equivalen a 4,7 g que están en 1 litro de solución.

- 0,62 m moles B están en 62 ml de la solución NHS-biotina 10 mM.
- $3,13 \times 10^{-5}$ moles Ac están en 1000 ml de la solución de Ac $4,7 \frac{g}{l}$.

Se logró pesar 0,2 g de NHS-Biotina, conociendo su peso molecular se puede obtener la cantidad de moles.

$$\begin{array}{l} 314,38 \text{ g B} \text{ — } 1 \text{ mol B} \\ 0,2 \text{ g B} \text{ — } X = 0,63 \mu \text{ moles B} \end{array}$$

Luego sabiendo que la concentración de la solución de biotina es 10 mM, para obtener $0,63 \mu$ moles de B necesitamos $64 \mu l$ de solución.

Por último se obtuvieron los volúmenes para formar la solución del anticuerpo biotilado sabiendo que necesito $64 \mu l$ de NHS-biotina 10 mM y $100 \mu l$ de solución del anticuerpo y que se quiere obtener una concentración de 0,17 mg/ml de anticuerpo en PBS.

- $64 \mu l$ de NHS-Biotina
- $100 \mu l$ Ac
- $400 \mu l$ de PBS

Luego de obtener estos volúmenes preparamos la solución de NHS-Biotina en DMSO 10mM con $64 \mu l$ de NHS-Biotina y 59 ml de DMSO. Se dejó reaccionar 2 hs en la heladera con $100 \mu l$ de Ac en $400 \mu l$ de PBS para que se encuentre en la concentración deseada.

7.5. Revelado con estreptavidina

El reactivo de estreptavidina que se utilizó es el reactivo Streptavidin-FITC de *Streptomyces avidinii* S3762 de 1 mg en polvo de Sigma-Aldrich. Como se puede observar en el Figura 28 viene contenida en un envase oscuro para protegerlo de la luz, por esta razón es importante que luego de usar el reactivo, se recubran las superficies en papel aluminio para evitar el contacto con la luz.



Figura 28: Reactivo Sigma estreptavidina S3762

En el catalogo del producto aconsejan encontrar la dilución de trabajo óptima empíricamente utilizando un rango de diluciones a partir de una solución madre de $1 \frac{mg}{ml}$. Se realizó una dilución en serie obteniendo diluciones de $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ y $\frac{1}{16}$. Estas soluciones se colocaron en un Well de una placa de 96 pocillos como indica la Figura 29.

Luego se utilizó el espectrofotómetro Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector para cuantificar la fluorescencia a distintas concentraciones. Así se encontró

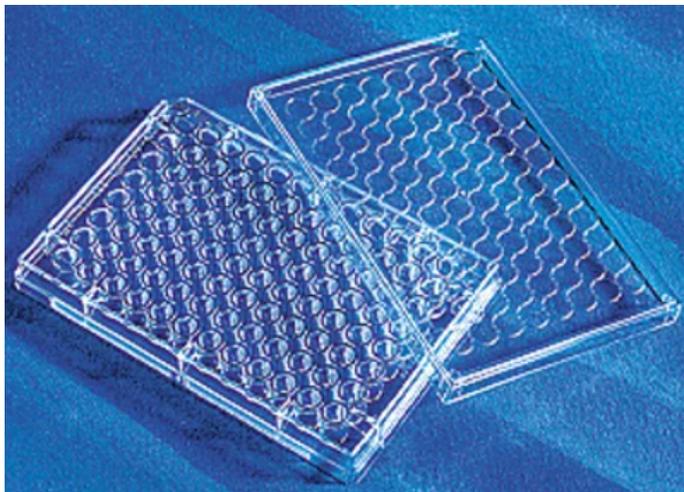


Figura 29: Ejemplo de un Well de 96 pocillos [72]

que la mínima concentración detectable era aquella dilución de $\frac{1}{4}$. Por lo tanto para asegurar la visualización de la fluorescencia se utilizó la muestra diluida por la mitad.

Estas soluciones se prepararon en recipientes envueltos en papel aluminio para proteger la solución de la luz.

Para utilizar la menor cantidad de muestra posible se utilizaron pocas gotas por superficie y luego se colocó por encima papel parafina para distribuir la solución a lo largo de toda la superficie. De esta manera se generó mayor superficie de contacto con un volumen de reactivo pequeño. Luego de colocar la estreptavidina en las superficies, rápidamente se envolvió el recipiente que contenía a todas las superficies en papel aluminio. Se dejó reaccionar durante una hora en la heladera y por último, se sumergieron las superficies en PBS y se colocó el recipiente que las contenía en un agitador eléctrico durante 15 minutos para retirar el excedente y enjuagar.

Se transportaron las superficies en el recipiente envuelto en papel aluminio a visualizarlas a través del microscopio. Contábamos con un microscopio Olympus BX63/BX53 como el de la Figura 30. El mismo tiene un software asociado llamado Programa OLYMPUS, DP Manager y DP Controller el cual permite observar las superficies en la pantalla de una computadora a nivel microscópico y facilita la captura de las mismas. Estas imágenes se guardaron en un pendrive para luego realizar el procesamiento de las mismas.

Por cada superficie se lograban obtener alrededor de 9 imágenes, dependiendo del

tamaño de la superficie. Se comenzó por el extremo superior izquierdo y se continuó hacia el extremo inferior derecho en forma de guardia griega, a lo largo de este recorrido se obtuvieron imágenes teniendo el cuidado de que no se repita la misma sección de la superficie.



Figura 30: Microscopio Olympus BX63/BX53. Imagen tomada del catálogo del producto BX63/BX53 de Olympus

7.6. Procesamiento de Imágenes

El fluoróforo FITC en su espectro de excitación tiene un pico máximo de 492 nm y un pico mínimo de 320 nm. La emisión máxima se realiza a los 518 nm, en la región verde-azulada del espectro, color que puede modificarse al introducir filtros amarillos. El isotiocianato de fluoresceína emite luz verde amarillenta intensa. Este color verde es el que observamos en las imágenes obtenidas.

Las imágenes de las superficies funcionalizadas se obtuvieron mediante el microscopio Olympus BX63/BX53 utilizando el filtro 2 que viene con el dispositivo.

Para procesar las imágenes se utilizó el ambiente de trabajo Google Collaboratory, el lenguaje Python 2.7 y las librerías: matplotlib, itk, numpy, skimage, scipy, PIL, statistics, openpyxl, openpyxl.styles, cv2 y google.colab.patches. Para más información acerca de la importación de librerías en Python ver la sección 11.1.1 del anexo.

Se obtuvieron imágenes de las distintas muestras analizadas en cada prueba, y de cada material utilizado (superficies de Au y de SiO₂).

Los nombres utilizados para las distintas muestras a analizar describen los reactivos que son usados en cada caso:

- Ac+B+S: El anticuerpo biotinilado (Ac+B) fue inmovilizado en la superficie siguiendo los protocolos de inmovilización de anticuerpos de la sección 7.2.1 y 7.2.2 y luego se le agregó la estreptavidina (S) la cual se une específicamente con la biotina. Este es nuestro experimento de prueba, el cual será contrastado con los distintos controles.
- Ac+S: Representa el anticuerpo inmovilizado no biotinilado en la superficie que se hace incubar estreptavidina.
- BSA+S: Se utilizó la proteína albúmina, la cual es muy adherente a las superficies. Luego se hace reaccionar estreptavidina.
- S: Superficies no funcionalizadas lavadas únicamente con estreptavidina.

Los grupos y sus subgrupos son los siguientes:

- Superficie de Au
 - Ac+B+S
 - Ac+S

- BSA+S
- S
- Superficie de SiO₂
 - Ac+B+S
 - Ac+S
 - BSA+S
 - S

Las imágenes fueron procesadas para filtrar los posibles errores y para obtener las métricas que luego se usarán para comparar las distintas muestras cuantitativamente.

Por una falla en el lente del microscopio utilizado obtuvimos en las imágenes una sombra oscura circular en el centro de las mismas, siempre en la misma posición. Para evitar que esta falla interfiera en los resultados, no se incluye para el procesamiento los píxeles de esta zona. Para ello se utilizó una máscara. En la Figura 47, la imagen de la izquierda muestra la máscara que consta de un círculo blanco central. Este círculo se posicionó con ayuda de la imagen central de la Figura 47 donde se observa claramente la sombra oscura central que genera el error de la lente. En la imagen derecha de la Figura 47 se verifica que el círculo de la máscara se encuentra posicionado correctamente en la zona sombreada de la imagen central.

La máscara obtenida es de igual tamaño que las imágenes a analizar: (1024, 1360, 3) píxeles. La cantidad de píxeles blancos pertenecientes a la máscara son 282697 y los pertenecientes al fondo son 1109943. Partiendo de un total de 1392640 píxeles por imagen, la relación máscara-fondo es del 20,3% por lo tanto la cantidad de píxeles a analizar es abundante. El código que se utilizó para la generación y el análisis de la máscara se puede observar en las secciones del anexo 11.1.5 y 11.1.6 respectivamente.

El objetivo del procesamiento de imágenes es evaluar la presencia de Ac biotinilados en las superficies. Dado que la estreptavidina tiene mucha afinidad con la biotina, y que la misma está marcada con un fluoróforo, la hipótesis es que a mayor fluorescencia en la imagen, más son las uniones específicas entre la estreptavidina y la biotina, lo que significa que habrá más anticuerpos biotinilados inmovilizados en la superficie.

Con el procesamiento obtenemos métricas que nos permiten obtener resultados cuantitativos del nivel de fluorescencia de cada imagen para luego poder compararlas

entre sí.

Las métricas que se calcularon para conocer el nivel de fluorescencia de cada imagen son los siguientes:

- **UG:** Por cada píxel de una imagen se calcula la luminiscencia (L), en particular el fenómeno de la fluorescencia, con la fórmula 1, indicada en el marco teórico del Procesamiento de imágenes en la sección 5.9, luego se toma la mediana de estas mediciones y se obtiene así un valor de fluorescencia por imagen. Luego se toma el grupo de imágenes que pertenecen a la misma muestra y se calcula el umbral general (UG) calculando el promedio de todos los umbrales por imagen. Este umbral general representa el comportamiento de fluorescencia de este grupo de imágenes ya que indica cual es el valor de fluorescencia promedio en imágenes cuyas superficies fueron expuestas a los mismos tratamientos, lo que equivale a decir que es el valor de la luminiscencia de esa superficie.
- **% L:** Refleja la cantidad de píxeles cuyos valores de fluorescencia son mayores al UG sobre la cantidad total de píxeles. Representa qué porcentaje de la imagen nos da información significativa acerca de qué efecto generan los reactivos de la superficie a la luminiscencia que luego se observa.
- **Máx L:** El máximo valor de fluorescencia obtenido por algún píxel perteneciente al grupo de imágenes correspondiente.
- **Mín L:** El mínimo valor de fluorescencia obtenido por algún píxel perteneciente al grupo de imágenes correspondiente.
- **Mediana L:** La mediana de los valores de fluorescencia obtenido de los píxeles de las imágenes correspondientes a los distintos grupos de imágenes.
- **% Img:** Cantidad de píxeles verdes de la imagen con respecto al total de píxeles activos. Llamamos píxeles activos a la cantidad de píxeles total menos la cantidad de píxeles que se encuentran en la zona del error del lente y los cuales no fueron tenidos en cuenta para el procesamiento de imágenes y la obtención de resultados.

Para el procesamiento de imágenes se cuenta con tres pasos para obtener las métricas que luego definirán a cada grupo de imágenes.

Detallamos los tres pasos del procesamiento:

- Cálculo umbral por imagen

Se recorren las píxeles de las capas R, G y B de una imagen, y por cada píxel activo, se mide la luminiscencia (L), en particular el fenómeno de fluorescencia, con la ecuación 2.

$$L = 0,2126 * R + 0,7152 * G + 0,0722 * B \quad (2)$$

Para obtener el umbral por imagen, primero se arma una lista con los valores de luminiscencias de cada píxel que sean distintos. Por ejemplo, si dos píxeles tienen la misma L, dicho valor se insertará solo una vez en la lista. Luego se calcula la mediana de la lista de luminiscencia y así se obtiene el umbral de la imagen. Se toma la mediana porque queremos tomar el valor que refleje el comportamiento de la mayoría de los píxeles sin que se vean afectados por los outliers. El código de esta función puede encontrarse en la sección 11.1.3 del anexo.

- Cálculo de umbral general de luminiscencia

Se toma un grupo de imágenes de la misma muestra, los píxeles de dichas imágenes se asume que tienen comportamientos similares y por cada imagen calculamos su umbral explicado en la función '*Cálculo de Umbral por Imagen*' y cuyo código se encuentra en la sección 11.1.3. Luego el umbral general de este grupo de imágenes se obtiene calculando el promedio de todos los umbrales por imagen. Este umbral entonces ahora representa el comportamiento de luminiscencia de este grupo de imágenes las cuales pertenecen a la misma muestra. El código de esta función puede encontrarse en la sección 11.1.4 del anexo.

- Análisis

La función análisis es aquella que engloba las funciones mencionadas anteriormente y la que genera las planillas de Excel con los resultados obtenidos, el código de la misma se puede encontrar en la sección 11.1.2 del anexo. En primer lugar la función calcula el umbral del grupo de imágenes explicado en la función '*Cálculo de Umbral General*' cuyo código se encuentra en la sección 11.1.4. Luego recorre de todas esas imágenes, todos sus píxeles activos y se calcula la luminiscencia con la ecuación 2 de la tarea '*Cálculo de Umbral por imagen*'. Con ese conjunto de luminiscencias se calcula el porcentaje de luminiscencia de la imagen, el máximo, el mínimo, la mediana, la cantidad de píxeles cuya luminiscencia supera el umbral general y el umbral general.

A modo de ejemplo, se puede observar en la Figura 31 el formato de la planilla que se genera para cada grupo de imágenes. Donde por cada imagen del grupo se calculan las métricas mencionadas.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Colección	Imágenes	% Luminancia	Max L	Min L	Mediana L	Bins L > Umbral	Umbral L
2		Image 12	0,3869628906	236,589	22,3064	56,766	5389	22,23087647
3		Image 13	0,2559168199	236,589	22,2318	83,2116	3564	22,23087647
4		Image 14	0,1581887638	236,589	22,3064	236,589	2203	22,23087647
5		Image 15	0,3119255515	236,589	22,3064	101,6905	4344	22,23087647
6		Image 16	0,1635024127	236,589	22,2988	236,589	2277	22,23087647
7		Image 17	0,2048627068	236,589	22,3	236,589	2853	22,23087647
8		Image 18	0,3127154182	236,589	22,233	90,366	4355	22,23087647
9		Image 19	0,1901424632	236,589	22,3064	236,589	2648	22,23087647
10	18-10 v.2 Ac-B+S	Image 20	0,2199419807	236,589	22,2382	236,589	3063	22,23087647
11		Image 21	0,1805204504	236,589	22,2382	236,589	2514	22,23087647
12		Image 22	0,2802590763	236,589	22,233	117,948	3903	22,23087647
13		Image 23	0,251752068	236,589	22,2318	236,589	3506	22,23087647
14		Image 24	0,1490693934	236,589	22,233	236,589	2076	22,23087647
15		Image 25	0,1492130055	236,589	22,2382	236,589	2078	22,23087647
16		Image 26	0,1607019761	236,589	22,233	236,589	2238	22,23087647
17		Image 27	0,1624253217	236,589	22,2382	236,589	2262	22,23087647
18		Image 28	0,2245375689	236,589	22,2318	236,589	3127	22,23087647
19								
20								

Figura 31: Diseño del Excel obtenido para la colección 18-10 v2. Ac-B+S.

Luego se dividió toda esta información en 4 grandes grupos dependiendo del tipo de prueba al que pertenecen: Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S. Con esa información agrupada se generó un cuadro resumen que refleja el comportamiento general de cada grupo de prueba.

8. Resultados

A fin de evaluar la funcionalización de las superficies ensayadas, se obtuvieron y procesaron 462 imágenes de acuerdo a los métodos descritos en la sección 7. Se tomaron imágenes de muestras realizadas tanto en superficies de Au como de SiO₂. Cada imagen pertenece a un grupo dependiendo del tipo de prueba que se haya hecho en cada superficie. Los distintos tipos de pruebas son Ac+B+S, Ac+S, BSA+S ó S. Estas cuatro muestras se diferencian por los reactivos y los protocolos que se aplicaron en cada superficie. En primero lugar se procedió a filtrar las imágenes que presentaban notorias irregularidades quedando un total de 372 imágenes a analizar. De esta manera, este filtro de imágenes asegura que los resultados sean representativos de los experimentos que se realizan en las superficies.

Con el fin de poder comparar cuantitativamente el comportamiento de la fluorescencia en cada grupo de imágenes agrupamos la información por superficie y por reactivos utilizados. Esta información se visualizará en formato de gráfico de barras con sus respectivos errores.

8.1. Au

En esta sección mostraremos los resultados que se obtuvieron del procesamiento de imágenes de pruebas realizadas sobre superficies de Au.

Recordamos que el umbral de cada imagen se obtiene a partir de la mediana de los valores de luminiscencia de cada píxel de la misma. Luego el umbral general (UG) es un valor común a un grupo de imágenes y corresponde al promedio de los umbrales de cada imagen. Este umbral general representa el comportamiento de fluorescencia de este grupo de imágenes ya que indica cual es el valor de fluorescencia promedio en imágenes cuyas superficies fueron expuestas a los mismos tratamientos.

En la Figura 32 se puede observar que el mayor umbral general (UG) se obtuvo en la prueba de interés (Ac+B+S) con un valor de 41,98 y que todo el resto de las pruebas dió un valor de UG más bajo de un promedio de 19,17. Esto muestra que en la prueba de interés, todas las imágenes que se obtuvieron en conjunto dieron el mayor valor de luminiscencia que representa mayor cantidad de verde. También es el experimento cuyas imágenes mostraron tener mayor cantidad de píxeles con un valor de luminiscencia mayor al promedio.

En la Figura 32 también podemos ver que la prueba de interés (Ac+B+S) no solo dió el mayor valor de UG sino que también posee una mayor cantidad de píxeles con valores mayores al UG. Es decir, en las imágenes de esta prueba hay más cantidad de píxeles verdes.

En la Figura 33 podemos observar que nuevamente el grupo de imágenes que posee los valores más altos de ambas métricas es el de Ac+B+S. Estas métricas representan la cantidad de píxeles activos que presentan fluorescencia con respecto del total de píxeles de la imagen.

Los valores de las métricas de las Figuras surgieron del procesamiento de imágenes mediante el código en Python que se puede analizar en la sección 11.1 del anexo.

En la Figura 37 se muestran ejemplos de las imágenes de las distintas pruebas realizadas sobre superficies de Au. En la Figura 34 se pueden observar dos casos representativos de la muestra de Ac+B+S donde observamos una imagen con la mayor cantidad de píxeles negros y unos pocos en un verde tenue. En la Figura 35 se pueden observar dos imágenes de las muestras Ac+S y BSA+S las cuales son mayormente negras y en algunas imágenes de la muestra de BSA+S se logran ver píxeles con una leve intensidad de verde como se ve en la Figura 35. En la Figura 36 se ven imágenes de la muestra S.

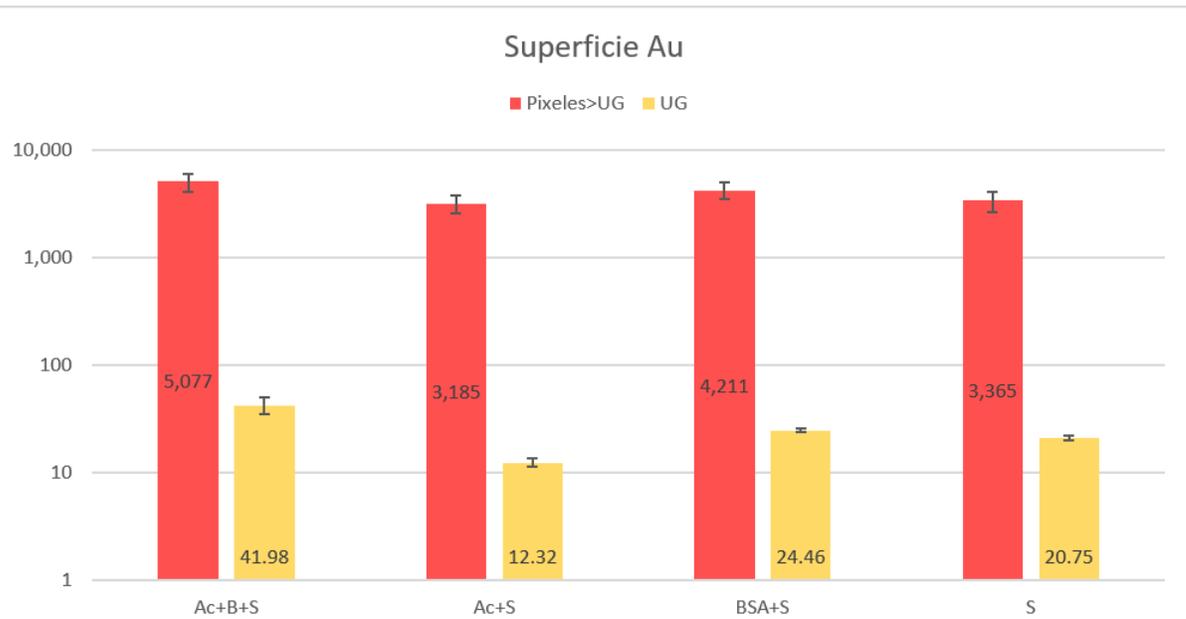


Figura 32: Gráfico de barras de la cantidad de píxeles con intensidad mayor al umbral general (UG) y del valor del umbral general. El gráfico muestra los valores de los 4 grupos de pruebas sobre superficies de Au: Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S.

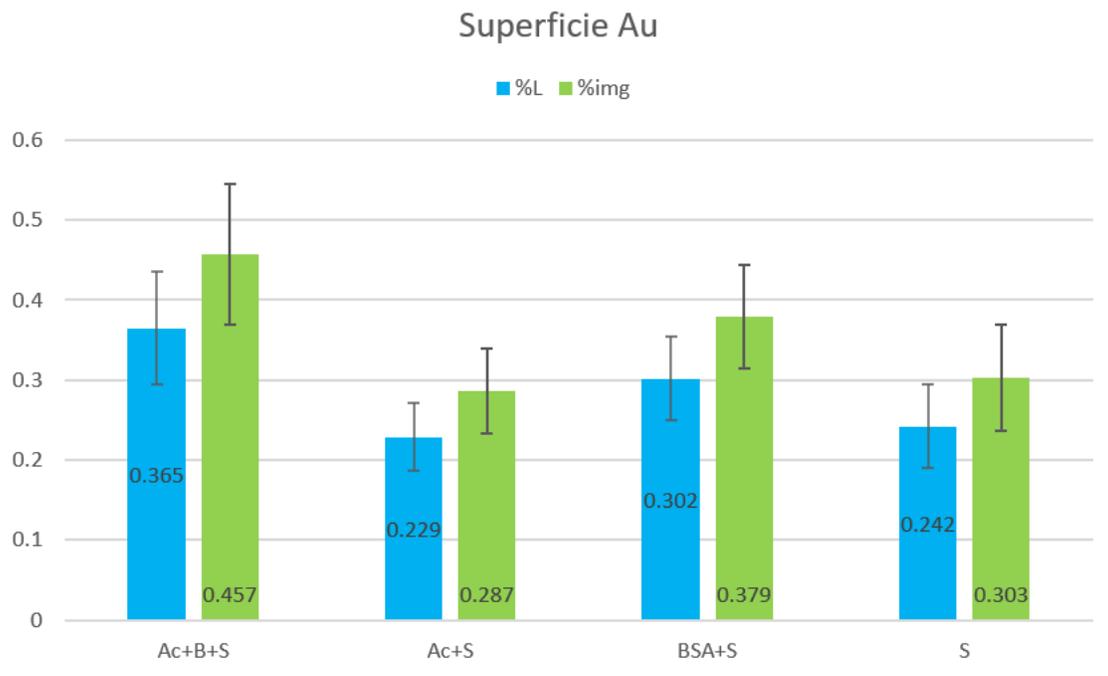


Figura 33: Gráfico de barras de las métricas %L y % Img de los 4 grupos de pruebas sobre superficies de Au: Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S.

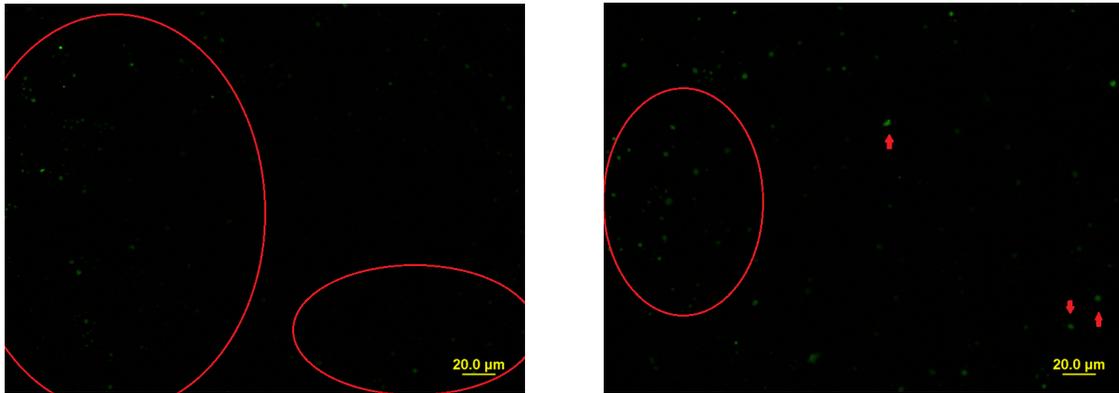


Figura 34: Muestra Ac+B+S

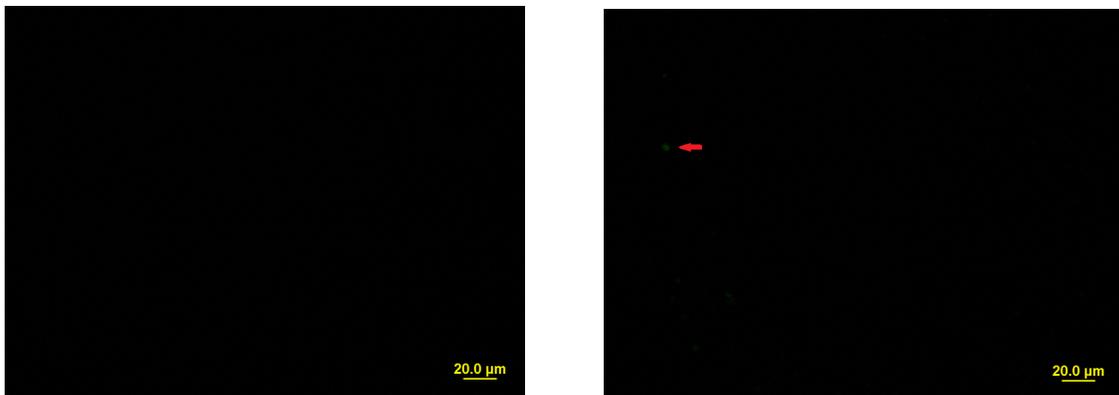


Figura 35: Izquierda: Muestra Ac+S ; Derecha: Muestra BSA+S

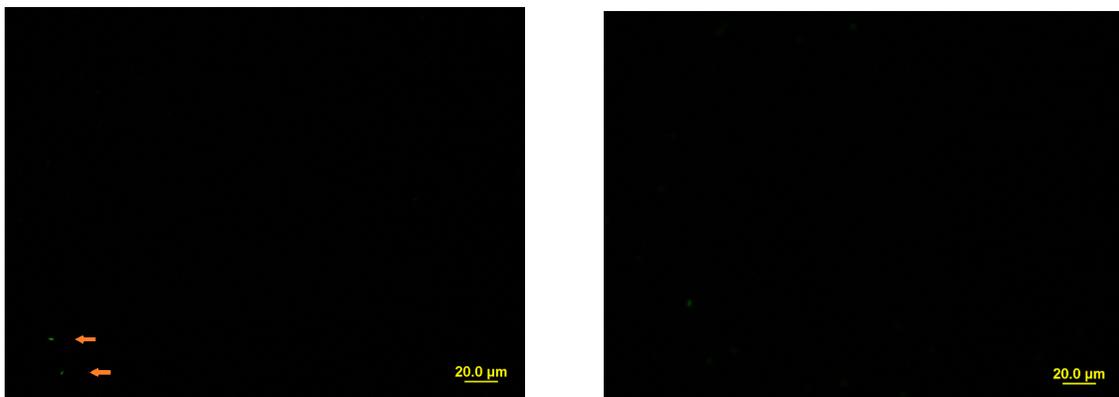


Figura 36: Muestra S

Figura 37: Imágenes capturadas por el microscopio sobre superficies de Au

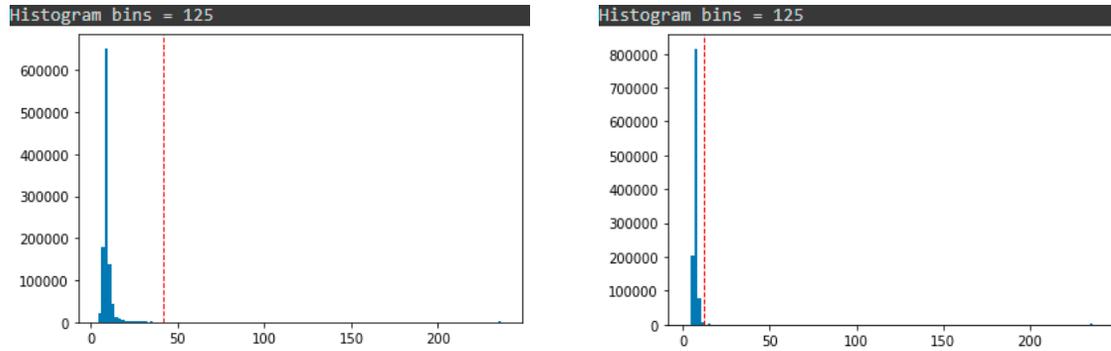


Figura 38: Histogramas de los valores de luminiscencia para la prueba Ac+B+S (Izquierda) y Ac+S (Derecha) sobre superficies de Au

Se realizó un histograma para observar la frecuencia de valores de luminiscencia de los píxeles. Realizamos un histograma con 125 bins para una imagen de la prueba Ac+B+S y otro para la prueba Ac+S. Como sabíamos que las imágenes eran oscuras e íbamos a ver una acumulación de bins en una zona particular elegimos graficar con 125 bins para observar con mayor detalle la distribución. En la Figura 38 podemos observar la frecuencia de luminiscencia que poseen los distintos píxeles de una imagen con una línea punteada roja que representa el valor del umbral general.

8.2. SiO₂

En esta sección se mostraran los resultados que se obtuvieron de las distintas pruebas en las superficies de SiO₂. Al igual que en la sección de Au, observamos como los mayores valores de métricas los encontramos en la muestra Ac+B+S. La diferencia que se ve a simple vista es que estos valores son muy mayores con respecto a pruebas de control. Este comportamiento se puede ver en los gráficos de barras de las Figuras 39 y 40.

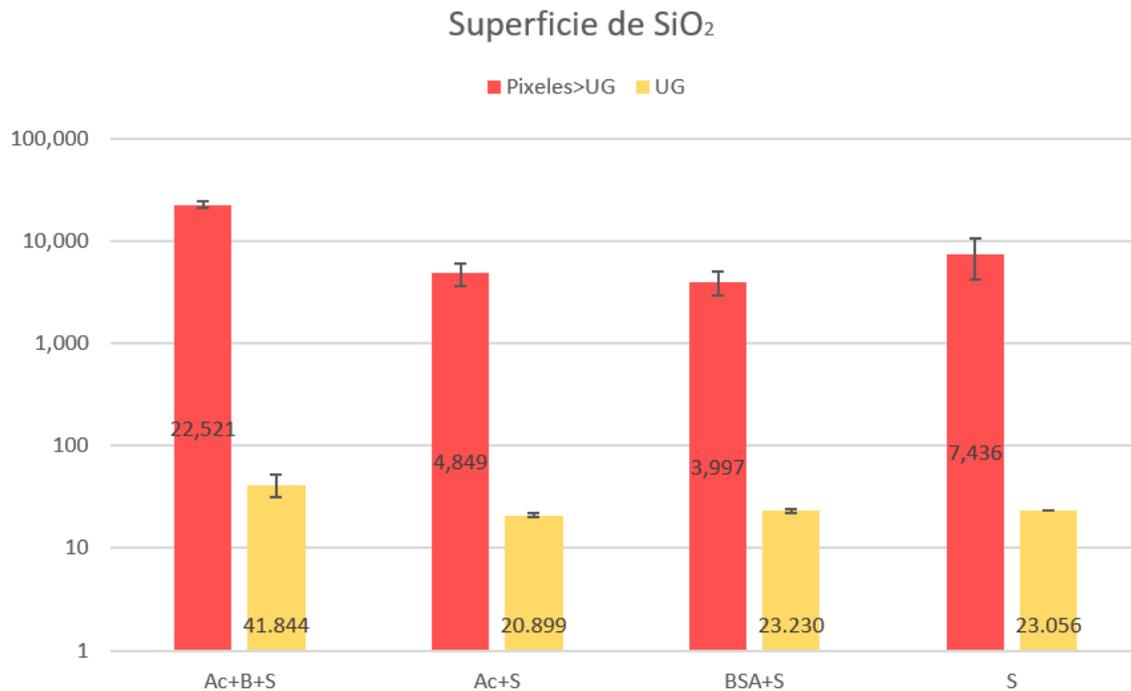


Figura 39: Gráfico de barras de la cantidad de píxeles con intensidad mayor al umbral general (UG) y del valor del umbral general. El gráfico muestra los valores de los 4 grupos de pruebas sobre superficies de SiO₂: Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S.

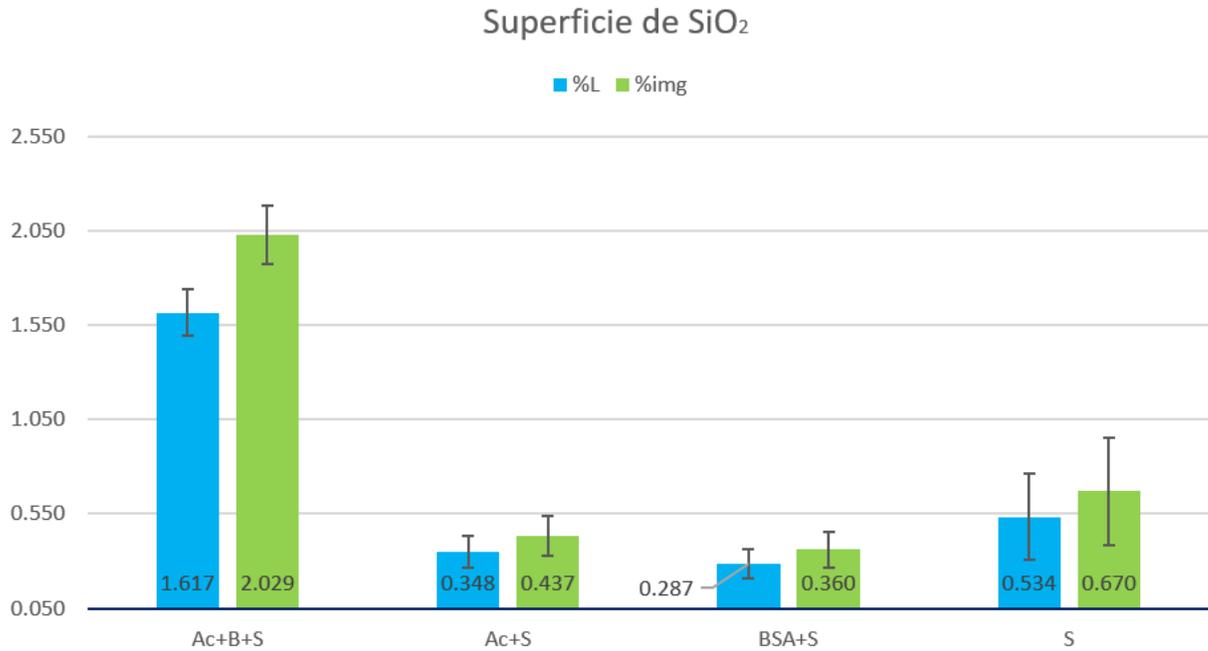


Figura 40: Gráfico de barras de las métricas %L y % Img de los 4 grupos de pruebas sobre superficies de SiO₂: Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S.

Los valores de las métricas de las Figuras surgieron del procesamiento de imágenes mediante el código en Python que se puede analizar en la sección 11.1 del anexo. En la Figura 44 se muestran ejemplos de las imágenes de las distintas pruebas realizadas sobre superficies de SiO₂.

En la Figura 41 se pueden observar dos casos representativos de la muestra de Ac+B+S donde observamos una imagen con un fondo uniforme en verde y luego puntos donde el verde se hace más claro e intenso. En la Figura 42 se pueden observar dos imágenes de la muestra Ac+S las cuales son mayormente negras. En la Figura 43 se ven imágenes de la muestra S.

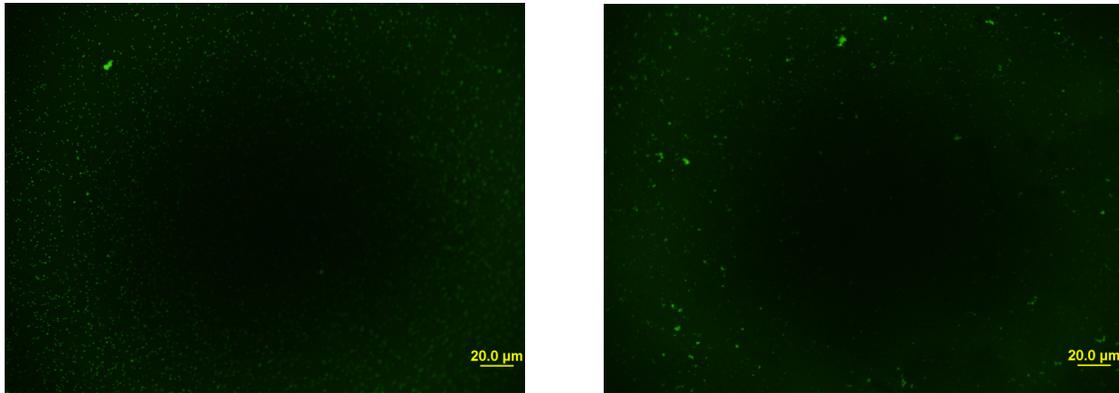


Figura 41: Muestra Ac+B+S



Figura 42: Muestra Ac+S

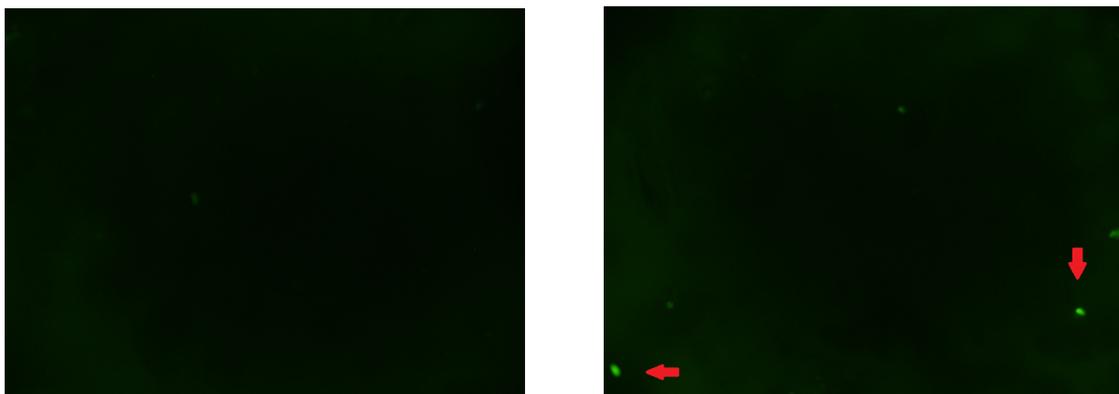


Figura 43: Muestra S

Figura 44: Imágenes capturadas por el microscopio sobre superficies de SiO₂

Se realizó un histograma para observar la frecuencia de valores de luminiscencia de los píxeles. Realizamos un histograma con 125 bins para la prueba Ac+B+S y otro para la prueba Ac+S. Como sabíamos que las imágenes eran oscuras e íbamos a ver una acumulación de bins en una zona particular elegimos graficar con 125 bins para observar con mayor detalle la distribución. En la Figura 45 podemos observar la frecuencia de luminiscencia que poseen los distintos píxeles de una imagen con una línea punteada roja que representa el valor del umbral general. Podemos observar que en la prueba Ac+B+S hay más cantidad de píxeles con valores de luminiscencias mayores al umbral general. En cambio en el caso de la prueba de Ac+S vemos que la frecuencia esta concentrada en los valores más chicos.

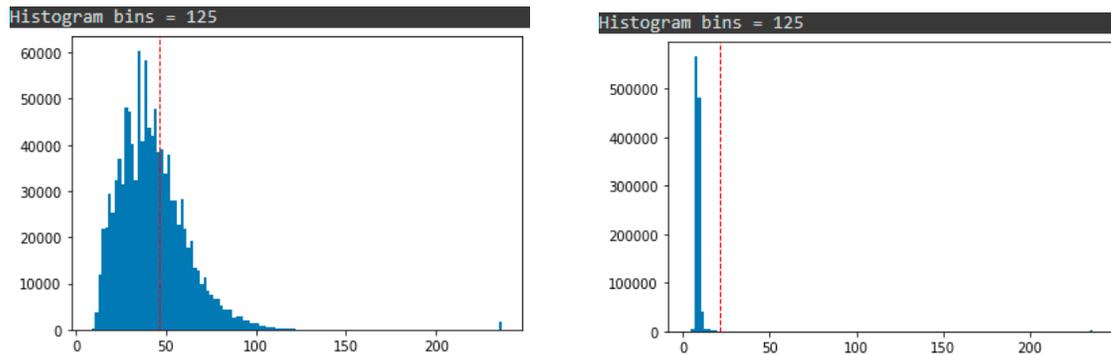


Figura 45: Histogramas de los valores de luminiscencia para la prueba Ac+B+S (Izquierda) y Ac+S (Derecha) sobre superficies de SiO_2

La lente del microscopio con la cual se capturaban las imágenes se encontraba dañada, y esto generaba un error circular en el centro de las imágenes. Ese error se visualiza en las imágenes como una sombra oscura circular en el centro de las mismas, como muestra la Figura 46. Se puede distinguir la sombra con mayor facilidad en aquellas imágenes que poseen mayor intensidad de fluorescencia y que tiene mayor nitidez.

Aunque esta sombra, producida por el error de la lente del microscopio, no se visualice en igual intensidad en todas las imágenes, se optó por aplicar una máscara que filtre los píxeles que se encuentran en la zona circular central de las mismas. De esta manera se logra un protocolo uniforme para el procesamiento que le dé igual tratamiento a todas las imágenes. La máscara que se aplicó para filtrar los píxeles de dicha zona de error se puede visualizar en la Figura 47.

Por lo tanto, para el análisis de los resultados, tenemos que tener en cuenta que la información de los píxeles centrales de las imágenes no son tomadas en cuenta.

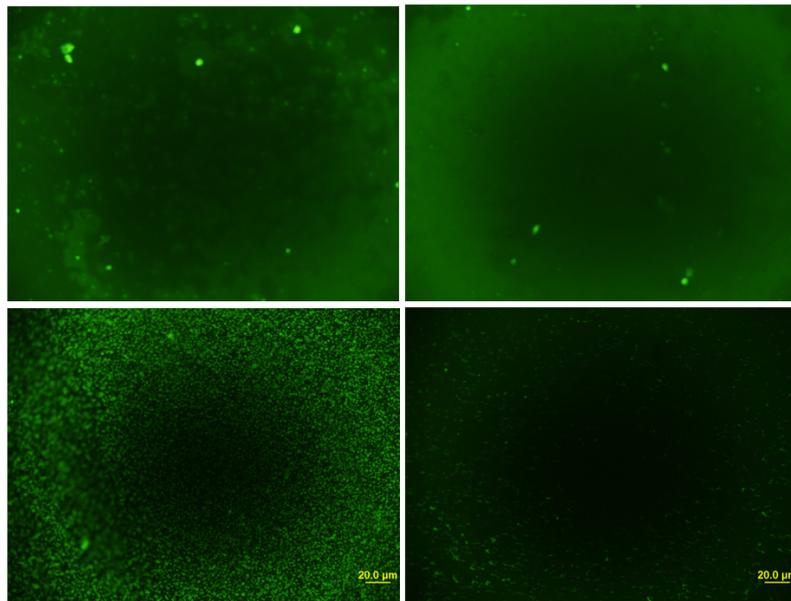


Figura 46: Ejemplos de imágenes donde se logra visualizar el error de la lente del microscopio como una sombra oscura circular en el centro.

El objetivo del procesamiento de imágenes es evaluar la presencia de Ac biotinilado en las superficies. Dado que la estreptavidina tiene mucha afinidad por la biotina, y que la misma se encuentra unida a un fluoróforo, la hipótesis es que a mayor fluorescencia en la imagen, más son las uniones específicas entre la estreptavidina y la

biotina, lo que significa que el anticuerpo biotinilado se encuentra inmovilizado a la superficie. Vale aclarar que esperamos que todas las imágenes tengan un nivel mínimo de fluorescencia dado que siempre existen mínimas uniones inespecíficas. Por esta razón esperamos que los resultados del procesamiento muestren una diferencia entre la prueba que posee anticuerpo biotinilado del resto (Ac+B, BSA+S, S).

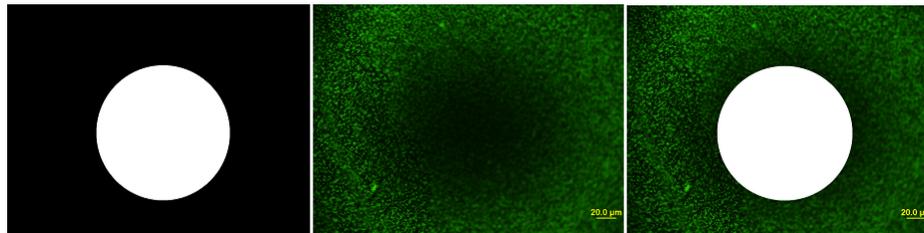


Figura 47: Izquierda: máscara, Centro: imagen con una sombra circular en el centro producto de la falla del lente del microscopio, Derecha: correcta superposición de la máscara con la sombra oscura del error producido por la lente del microscopio.

Se tomó como experimento positivo o de prueba al experimento en el cual se inmovilizan anticuerpos biotinilados y luego se hace reaccionar con estreptavidina (Ac+B+S), lo que produce una unión específica dando un color verde en la imagen y el cual esperábamos que obtuviese grandes zonas verdes en las imágenes a comparación del resto. Los experimentos de control son los que no poseen presencia de biotina (Ac+S, BSA+S, S).

Colección	Parámetros	Promedios	Máximos	Mínimos	Medianas
Ac+B+S	% L	1,152250825	30,10986328	0,0244140625	0,2653234145
	Max L	228,8416388	246,5082	94,2216	236,589
	Min L	39,87381765	52,6646	22,2318	38,8334
	Mediana L	135,0568824	236,589	47,2558	101,38965
	Bins L > UG	16046,70588	419322	340	3695
	UG	39,75409117	50,26296	22,23087647	38,7732
	%img	1,445723418	37,77869674	0,03063220364	0,3328999777
Ac+S	% L	0,3314961416	2,610294118	0,001364315257	0,1857622932
	Max L	208,2853118	236,589	51,519	236,589
	Min L	20,65666667	34,8026	6,9342	21,3786
	Mediana L	132,2743763	236,589	9,0076	70,0963
	Bins L > UG	4616,408602	36352	19	2587
	UG	19,69989602	24,5037	6,903111111	21,37534828
	%img	0,4159740246	3,275123137	0,001711799615	0,2330750318
BSA+S	% L	0,2966761524	0,7823968971	0,1275993796	0,2727912454
	Max L	234,6279262	239,3802	106,328	236,589
	Min L	24,61876615	50,9711	12,9406	21,0886
	Mediana L	139,7721385	236,589	18,8026	106,0888
	Bins L > UG	4131,630769	10896	1777	3799
	UG	24,00485846	50,86314545	12,92652963	21,02386667
	%img	0,3722381031	0,9816720318	0,1600983114	0,3422698283
S	% L	0,4455967184	2,715418199	0,002656824449	0,3171673943
	Max L	202,7231349	242,4648	63,5988	236,589
	Min L	22,42763256	46,7584	16,0822	20,8078
	Mediana L	81,72896744	236,589	24,6646	32,314
	Bins L > UG	6205,55814	37816	37	4417
	UG	22,35906279	46,7179	16,02938182	20,75867059
	%img	0,5590880018	3,407021802	0,003333504513	0,3979483631

Figura 48: Excel de la tabla resumen de las métricas de los 4 grupos de experimentos

En la Figura 48 se puede observar la tabla resumen de los 4 grupos de experimentos en las superficies de Au y SiO₂ en donde se obtuvieron métricas que calculamos luego de hacer el procesamiento de imágenes. El nombre de cada grupo identifica el tipo de experimento realizado en las superficies de Au y SiO₂.

8.3. Dispositivo con micro-canales

En este trabajo se diseñaron dispositivos con micro-canales con superficies de Au y de SiO₂ unidos a PDMS. Recordando el proceso para el pegado del PDMS a las superficies de la sección 7.2.4, se puede observar en la Figura 49 que el plasma no causó el mismo efecto de activación en las superficies con respecto a su mojabilidad. Recordamos que el tratamiento que se realiza con el plasma activa las superficies con el fin de que las mismas resulten hidrofílicas y así lograr el pegado entre las mismas. Por lo tanto era de esperarse que el PDMS no se uniera correctamente en las superficies de Au. En cambio con las superficies de SiO₂ obtuvimos resultados de pegados favorables.

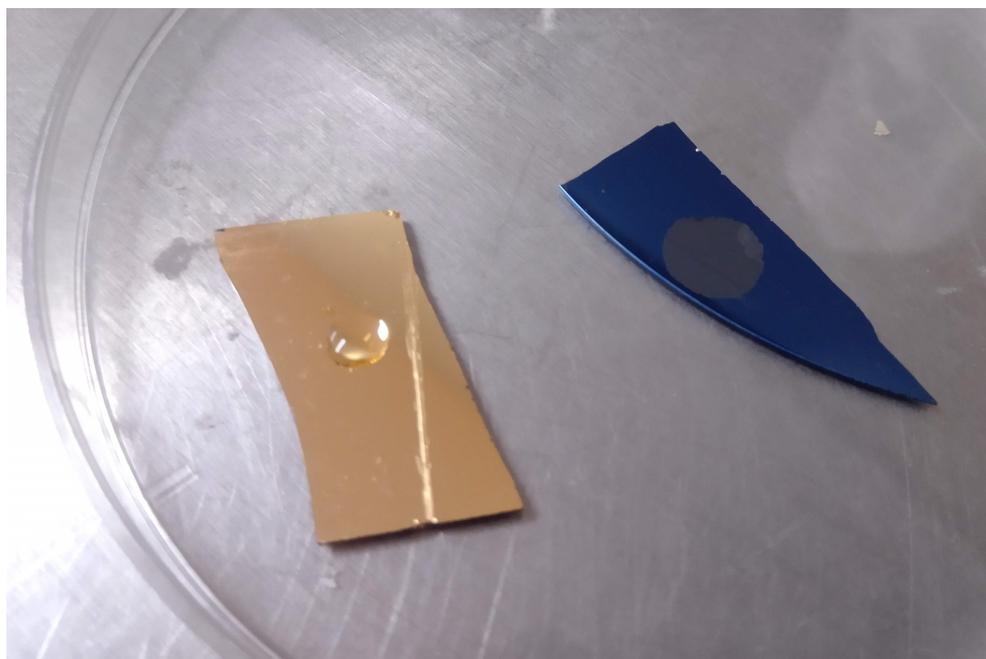


Figura 49: Superficies de Au y SiO₂ luego de ser sometidas al plasma con una gota de agua en las mismas.

En esta sección mostraremos algunas de las imágenes que capturamos a través del microscopio Olympus de los micro canales del dispositivo con PDMS. En estas imágenes no vimos sentido realizarles el procesamiento de la sección 7.6 ya que la fluorescencia no solo se encontraba encapsulada en los canales sino también en sus alrededores como se puede observar en la Figura 50. Por lo tanto creemos que el PDMS no se pegó totalmente a la superficie o que mediante la presión que se generaba para hacer fluir los distintos reactivos por los canales se despegó el PDMS dejando fluir los reactivos por las cercanías del canal.

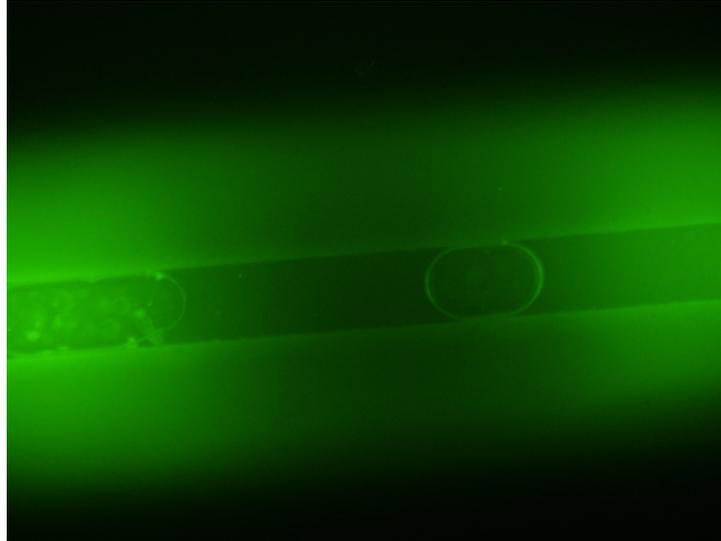


Figura 50: Canal del dispositivo PDMS con la inmovilización de la solución Ac+B+S

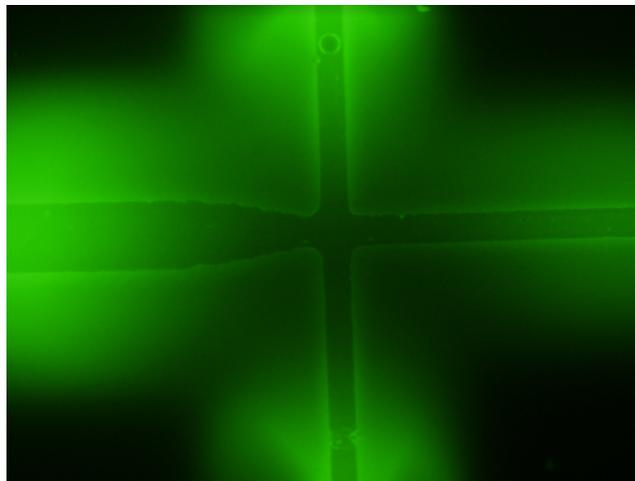


Figura 51: Fluorescencia de la intersección de los canales del dispositivo

Recordando el diseño de los micro canales de la Figura 24, en la Figura 51 se puede observar la gran concentración de fluorescencia que se genera en la intersección del canal que viene del extremo B con el micro canal que lo cruza.

8.4. Técnicas de caracterización

8.4.1. FTIR

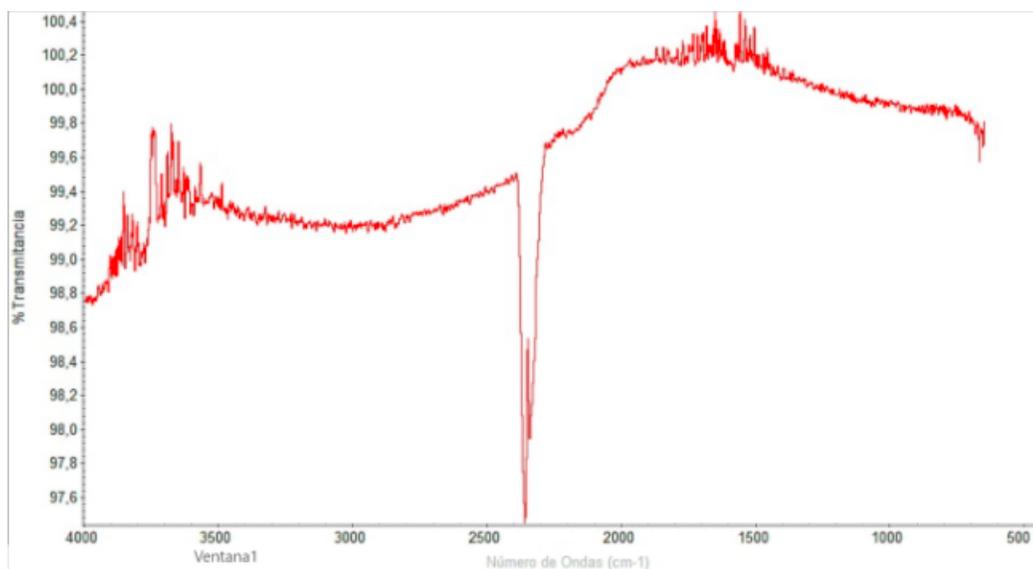


Figura 52: Gráfico de transmitancia obtenida a partir de la técnica FTIR en una de las superficies de Au

La técnica FTIR se aplicó en dos muestras: Mua en una superficie de oro, y mua + anticuerpos en una superficie de oro. Se esperaba encontrar una diferencia en los gráficos ya que en esta última se esperaba detectar la unión del anticuerpo con el Mua. Los enlaces C=O absorben el infrarrojo en un número de onda cercano a los 1650 cm^{-1} . Como estamos buscando los enlaces amidas, las proteínas que generan este pico de absorción alrededor de este número de onda representan enlaces C=O presentes en los grupos amida. En los gráficos obtenidos a raíz de los datos de transmitancia no reflejaron el pico de absorbancia que esperábamos.

En la Figura 52 se puede observar el gráfico de transmitancia que obtuvimos. La señal que se observa es en su mayoría es ruido a excepción del pico en el rango entre 2000 y 2500 cm^{-1} . Esta región suele no suelen aparecer bandas y si las hay son muy débiles. Señales en este rango de números de ondas suele deberse a presencia de enlaces triples, por ejemplo, CC, CO o CN. [45].

8.4.2. Resonancia de plasmón superficial

En esta sección mostraremos los resultados que se obtuvieron aplicando el protocolo de inmovilización de anticuerpos en dos superficies de vidrio metalizadas con 50 nm de oro.

En la Figura 53 se aprecian las primeras variaciones sobre el ángulo de referencia a medida que se comienza con el protocolo de inmovilización. En esta primera instancia se buscó generar el pegado de anti-ferretina sobre la superficie. Esto se realizó sobre ambas celdas por igual, por lo que se esperaba encontrar curvas similares.

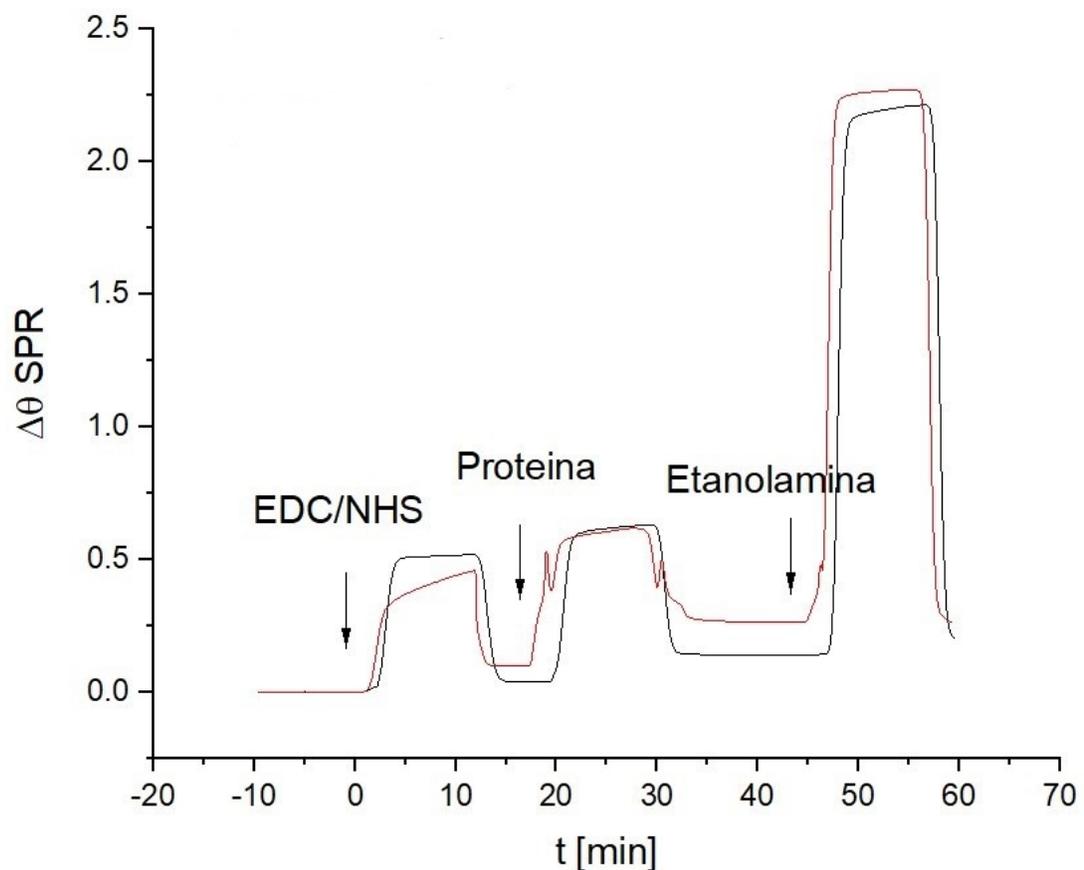


Figura 53: Desplazamiento del ángulo vs tiempo, en la preparación de las superficies

Como podemos apreciar en el Figura 54, sobre la celda 1, se vio un aumento en la intensidad al incubarlo con Ferritina con respecto a la celda 2. Al remover el

excedente, vemos que la capacidad de refracción del oro cambió ya que el ángulo de resonancia se desplaza, o lo que equivale a una diferencia de intensidad percibida, lo que confirma la unión sobre la superficie. Sobre la curva roja lo que vemos es el pegado de la BSA con el anticuerpo porque la albúmina es una proteína muy pegajosa pero al lavarla, mucho se pierde se puede observar en el gráfico. Al ser una unión débil, es posible remover la BSA con solo unos pocos lavados a diferencia de la unión específica entre la anti-ferritina y su antígeno que requieren de lavados con sustancias mas fuertes capaces de romper esa unión. Igualmente, al ver que algo se une, podemos confirmar que los reactivos se encuentran en buenas condiciones.

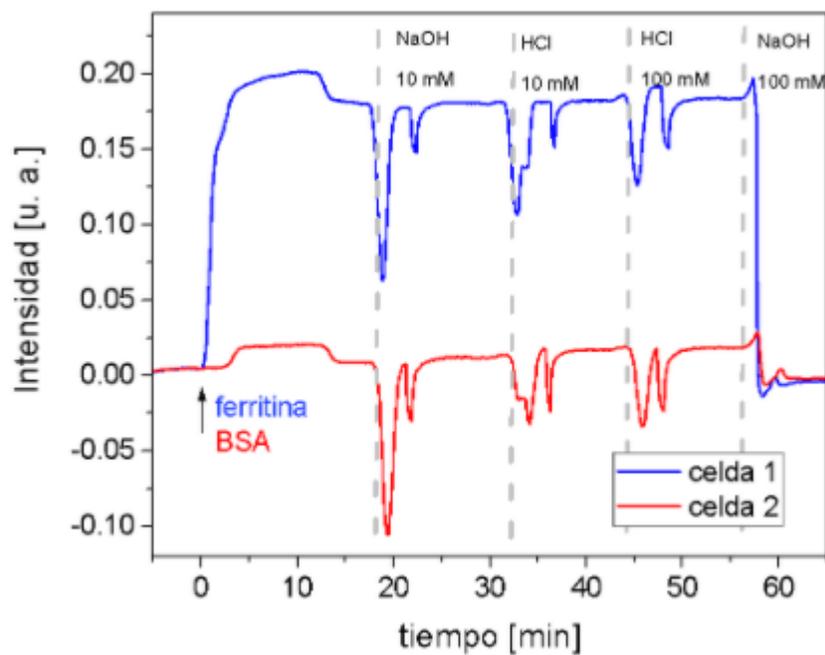


Figura 54: Variación de intensidad vs tiempo, en la funcionalización de las superficies

9. Discusión

El objetivo de este trabajo fue poner a punto un método de funcionalización de superficies para aplicarlo en el diseño de un biosensor. Esta funcionalización es la que brinda la especificidad y sensibilidad de detección del sistema, logrando así mejores resultados y la capacidad de un diagnóstico específico para cualquier enfermedad. Para esto se capturaron imágenes de las superficies funcionalizadas con un microscopio para cuantificar la fluorescencia y así evaluar si el método de funcionalización fue realizado correctamente.

Se procesaron imágenes digitales con distintas intensidades de fluorescencia, esta proviene de la cantidad de uniones que se lograron generar entre la estreptavidina fluorescente y la biotina. Dado que se realizó el proceso de biotinilación de los anticuerpos, la presencia de estreptavidina en las superficies refleja la presencia de biotina en las mismas que a su vez representa la inmovilización del anticuerpo en la superficie. El grupo de investigación de Keine Nishiyama presentó en 2019 un sistema de inmunoensayo ultrasensible para detectar biomarcadores de distintas enfermedades. El mismo se basa en la inmovilización de estreptavidina a un sustrato y la biotinilación de anticuerpos. La introducción del biomarcador diana y los anticuerpos secundarios marcados produjo un complejo tipo sándwich anclado para luego detectar el anticuerpo marcado con colorante fluorescente (DyLight 650) [46]. En otro tipo de experimentos, suele ser el antígeno el que se biotinila para luego ser detectado [47] por la estreptavidina logrando así que la fluorescencia refleje no solo la presencia del anticuerpo inmovilizado a la superficie sino también su funcionalidad [48] [49], que le permite generar una unión específica con el antígeno biotinilado. En investigaciones futuras sería interesante realizar este experimento, capturar las imágenes, procesarlas y analizar si las métricas que se obtienen son similares a las de este trabajo.

Del total de imágenes que se capturaron se procedió a filtrar las que presentaban notorias irregularidades, como se puede observar en la Figura 55, quedando un total de 372 imágenes a analizar. De esta manera, este filtro de imágenes asegura que los resultados sean representativos de los experimentos que se realizan en las superficies.

La lente del microscopio con la cual se capturaban las imágenes se encontraba dañada, y esto generaba un error circular en el centro de las imágenes. Ese error se corrigió filtrando las imágenes con la máscara de la manera que se puede observar en la Figura 47. Debemos tener en cuenta que aunque los píxeles de la zona de la máscara no serán tenidos en cuenta para el procesamiento y por lo tanto será información que perderemos, como beneficio obtenemos únicamente información que refleja fielmente el tipo de experimento que se realiza.

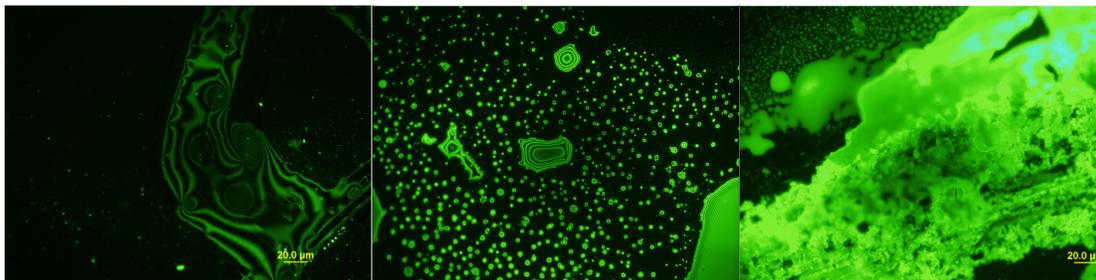


Figura 55: Ejemplos de imágenes con irregularidades.

Por otro lado, aunque las imágenes representan una sección de la superficie y la misma es recorrida en su totalidad, igualmente el uso de la máscara puede generar problemas en el resultado final. Esto se debe a que de cada imagen perdemos el 20 % de la información por el error de la lente del microscopio.

Con el propósito de cuantificar las uniones del anticuerpo a la superficie mediante la fluorescencia, no solo es necesario un correcto procesamiento de imágenes, si no que también el uso de controles experimentales negativos para tener evidencia suficiente para sustentar los resultados [71]. En otro trabajo de investigación donde también se utilizó un fluoróforo como método de cuantificación usaron como prueba de interés el anticuerpo etiquetado con un fluoróforo y como control negativo solo el anticuerpo [46].

Para ello se realizaron cuatro tipos de muestras sobre las superficies, por un lado la muestra de interés, anticuerpos biotinilados incubados con estreptavidina para su revelado. Para el control negativo, cuyos resultados ayudan a estimar la cantidad de uniones inespecíficas que pudieran aparecer, se utilizó una superficie funcionalizada con anticuerpo sin biotinar pero incubada con estreptavidina. Si al exponerse al microscopio se puede apreciar un tono verde, lo que estaríamos viendo es estreptavidina que quedó unida a anticuerpos de forma inespecífica [46]. Con esta información, podríamos asegurarnos que si las superficies de Ac+B+S contienen mayor cantidad de píxeles fluorescentes se debe a la presencia de anticuerpos biotinilados ubicados sobre la superficie.

Por otro lado, también se incubaron superficies con estreptavidina que no habían sido funcionalizadas previamente para poder determinar cuánta de esta podía quedar sobre la superficie después de lavar el excedente. Luego de procesar las imágenes, efectivamente dieron resultados inferiores de fluorescencia que aquellas superficies que fueron funcionalizadas con anticuerpos biotinilados.

Para este trabajo, es importante no solo la calidad de las uniones si no también

la cantidad de superficie que fue correctamente funcionalizada. Como hemos mencionado anteriormente, la sensibilidad y eficacia de un biosensor esta estrechamente relacionada con la correcta caracterización de la superficie utilizada. Dado que las interacciones biomoleculares son altamente especificas, el receptor biológico utilizado es el responsable de la sensibilidad del sistema. Por lo que lograr una correcta unión a la superficie sin comprometer la estructura ni funcionamiento del inmunorreceptor, le otorgara grandes beneficios al sistema [23] [71]. En la universidad de Alberta, Canada, Naga Gunda y un grupo de investigadores optimizaron y caracterizaron la inmovilización de anticuerpos en superficies de oxido de silicio utilizando APTES y glutaraldehído. Ellos pudieron comprobar que era posible obtener una capa uniforme y homogénea con este tratamiento y que la unión de los anticuerpos se lograba de forma correcta. Gracias a su trabajo fue posible establecer que concentración y duración de exposición al APTES es suficiente para obtener una correcta señalización de la superficie [21].

Es importante mencionar que el uso de la técnica FTIR no otorgó los resultados esperados, aunque originalmente la idea fue cuantificar los resultados mediante esta herramienta lo que obtuvimos no fueron resultados claros. En el departamento de química de la Universidad de Nueva York, el Dr Jamie Kim trabajo con SAMs en superficies de oro utilizando el 3 protocolos diferentes, entre ellos el uso de MUA y cuantificando mediante FTIR, SPR y micro-balanças de cristales de cuarzo entre otras. Gracias a sus resultados, pudimos observar el espectro de FTIR esperable para un superficie de oro con Sulfo-NHS [44]. Al obtener espectro con mucho ruido y picos fuera del área de interés como se observa en la Figura 52, debimos descartar nuestros resultados. Estimamos que esto puede haber sido causa del entorno que rodea la máquina utilizada, la presencia de vibraciones puede alterar el resultado ya que al hacer mediciones tan sensibles es importante contar con las instalaciones adecuadas para obtener buenos resultados. Otra posible razón para esto, es que el enlace de interés no se haya podido observar por la presencia de enlaces con mediciones cercanas, causando que en el gráfico no sea posible distinguirlos. La falta de tiempo no nos permitió seguir experimentando con esta técnica para poder obtener una respuesta más clara de lo que ocurrió [73] [74] .

Por otro lado, gracias a la técnica de SPR fue posible ajustar las condiciones de PH mas favorables para los anticuerpos tal que mantuvieran su estructura, también fue posible comprobar que los reactivos se encontraba en las condiciones apropiadas para el correcto resultado del protocolo.

Como mencionamos anteriormente, el objetivo de este trabajo fue poner a punto un método de funcionalización de superficies para aplicarlo en el diseño de un biosensor. Nosotras usamos los método de funcionalización y logramos analizar los

resultados de la inmovilización de los anticuerpos en dos superficies distintas pero no se lograron múltiples repeticiones probando distintas variables para ver por ejemplo que concentración de reactivos era la óptima ó que pH era mejor para algunas reacciones, etc. Por lo tanto para futuros trabajos, cuando se pueda volver al laboratorio, para realmente poner a punto el protocolo se deberían realizar más repeticiones con pequeños cambios para ver si se logra una mejora en los resultados. Por ejemplo para el protocolo de inmovilización de anticuerpos en la superficie de Au no obtuvimos los resultados que esperados, por lo tanto se deberían probar otras concentraciones de anticuerpo biotinilado o poder encontrar que pasos de todo el protocolo es el que generó que no se obtenga tanta fluorescencia como en el caso de las superficies de SiO₂.

Por otro lado para futuros trabajos sería interesante analizar la orientación en el que quedan inmovilizados los anticuerpos. En Australia el departamento ciencias químicas y biomoleculares y de química de la universidad de Macquarie, Sydney, NSW 2109, Australia publicaron en 2007 que una buena orientación mejora la capacidad del anticuerpo inmovilizado en un sustrato de Au a unirse a su antígeno [43].

10. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos concluir que el experimento positivo o de prueba (Ac+B+S), fue el que mayor valor de % de píxeles verdes obtuvo en ambas superficies (Au y SiO₂), es decir, que tal y como lo esperábamos fue el grupo de imágenes que más cantidad de píxeles verdes tenía con respecto al total activo que se puede traducir como una mayor superficie de Ac pegados. El total activo de píxeles lo llamamos a la cantidad de píxeles total menos la cantidad de píxeles que se encuentran en la zona del error del lente y los cuales no fueron tenidos en cuenta para dicho análisis.

En el cuadro 3 se pueden observar que aunque en ambas superficies la mayor cantidad de píxeles verdes la obtuvieron las muestras de Ac+B+S, en la superficie de SiO₂ se nota mayor diferencia entra la prueba de interés y las de control.

% píxeles verdes:

Muestra/Superficie	Au	SiO ₂
Ac+B+S	0,3645	1,6171
Ac+S	0,2286	0,3482
BSA+S	0,3023	0,2869
S	0,2416	0,5339

Cuadro 3: Promedio del porcentaje de píxeles verdes para las distintas muestras y para las distintas superficies

Otro forma de verlo, es analizando la cantidad de píxeles que supera el valor del UG. En esta métrica también obtuvimos mayores valores en la muestra de prueba Ac+B+S que en los otros grupos de control. Como muestra el cuadro 4, este comportamiento se mantuvo en ambas superficies. En la muestra de prueba entonces hay más píxeles verdes por encima del umbral general establecido, es decir, que dichas imágenes tienen más píxeles con intensidad de fluorescencia mayor al umbral que en las de control.

También esperábamos obtener en este grupo de imágenes el mayor valor de UG ya que dicho valor refleja el comportamiento de luminiscencia de las imágenes. Al ser un valor mayor indica que los valores de luminiscencia son mayores, es decir, que las imágenes de alguna manera son más verdes que las demás y esto podría verse como una concentración mayor de Ac. En el cuadro 5 se puede observar que en ambas superficies la intensidad del umbral general de la muestra de prueba fue similar.

Píxeles $L > UG$:

Muestra/Superficie	Au	SiO ₂
Ac+B+S	5076,87	22520,79
Ac+S	3184,92	4849,02
BSA+S	4210,68	3996,58
S	3365,23	7436,36

Cuadro 4: Promedio de la cantidad de píxeles con valor mayor al umbral general para las distintas muestras y para las distintas superficies

También vemos que dicho valor está alejado de los obtenidos en el resto de las pruebas de control. Esto puede indicar que obtenemos mayor intensidad de fluorescencia en aquellas imágenes que tienen mayor estreptavidina unida al anticuerpo biotinilado que se encuentra inmovilizado en la superficie.

UG:

Muestra/Superficie	Au	SiO ₂
Ac+B+S	41,979	41,844
Ac+S	12,318	20,899
BSA+S	24,458	23,229
S	20,751	23,056

Cuadro 5: Promedio de los umbrales generales para las distintas muestras y para las distintas superficies

Vale aclarar que los resultados de las muestras de BSA+S y S no cuentan con la presencia de Ac por lo que no se debería encontrar una relación con el caso de prueba, pero teóricamente deberían presentar valores menores de fluorescencia y de hecho lo hacen. Por eso, utilizamos estos valores a forma de respaldo para confirmar nuestra hipótesis.

Las tablas de las Figuras 56 y 57 muestran las métricas resumidas de todas las muestras en las superficies de Au y SiO₂. En ambos casos se puede notar que los valores de las muestras Ac+B+S son mayores a los obtenidos por la prueba control, es decir, para las muestras Ac+S, BSA+S, S. Reforzando nuestra teoría de que aquellas superficies donde se inmovilizaron anticuerpos biotinilados formaran uniones específicas con la estreptavidina y así observaremos mayor intensidad y cantidad de fluorescencia.

Colección	Parámetros	Promedios	Máximos	Mínimos	Medianas	Error
Ac+B+S	% L	0,3645504222	1,138269761	0,1490693934	0,2902401195	0,1613661822
	Max L	236,9707575	246,5082	236,589	236,589	0
	Min L	42,0371025	80,3624	22,2318	37,0356	10,9626
	Mediana L	156,9815762	236,589	56,766	141,33795	130,899125
	Píxeles L > UG	5076,875	15852	2076	4042	2247,25
	UG	41,9791825	80,34898	22,23087647	36,90668235	11,00602479
	%img	0,4573996142	1,428181447	0,1870366316	0,3641628444	0,2024653518
Ac+S	% L	0,2286967972	0,3624770221	0,1278147978	0,2127613741	0,1461971507
	Max L	236,589	236,589	236,589	236,589	0
	Min L	12,37912308	24,5912	6,9342	6,9342	17,59
	Mediana L	171,8438308	236,589	9,0076	236,589	173,961
	Píxeles L > UG	3184,923077	5048	1780	2963	2036
	UG	12,31867692	24,5037	6,903111111	6,903111111	17,60058889
	%img	0,2869447419	0,4547981293	0,1603685955	0,2669506452	0,1834328429
BSA+S	% L	0,3023525769	0,7823988971	0,1275993796	0,2324362362	0,1886345358
	Max L	236,589	236,589	236,589	236,589	0
	Min L	25,40032195	50,971	12,9406	13,1532	37,943
	Mediana L	158,8782049	236,589	18,8026	236,589	155,6331
	Píxeles L > UG	4210,682927	10896	1777	3237	2627
	UG	24,45856341	50,86314545	12,92652963	12,92652963	37,93661582
	%img	0,3793602849	0,9816720318	0,1600983114	0,2916365976	0,2366788204
S	% L	0,2416439833	0,3945743336	0,139950023	0,2456485524	0,1186954274
	Max L	237,0409846	242,4648	236,589	236,589	0
	Min L	20,88130769	46,7584	16,0822	16,2318	0,0786
	Mediana L	162,2528308	236,589	29,7432	236,589	157,2318
	Bins L > UG	3365,230769	5495	1949	3421	1653
	UG	20,75069231	46,7179	16,02938182	16,02938182	0
	%img	0,3031895124	0,4950704676	0,1755946026	0,3082140254	0,1489265665

Figura 56: Tabla resumen de los 4 grupos de pruebas sobre superficie de Au: Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S

Analizando la rendimiento de cada superficie observamos que el umbral general de intensidad de luminiscencia en la muestra Ac+B+S en ambas superficies es de aproximadamente 41. (41,9791825 en Au y 41,84443956 en SiO₂). Hay una diferencia en la cantidad de píxeles con intensidades de luminiscencia mayores a ese umbral general aunque el mismo se mantenía constante. En el caso de las superficie de Au el porcentaje de píxeles con intensidades mayores al umbral general (Píxeles L > UG) es del 0.45 % mientras que en la superficie de SiO₂ es del 2.03 %. Otra diferencia interesante que se puede observar es que el porcentaje de píxeles fluorescentes de las superficies de Au es de 0.36 % y en el caso de las superficies de SiO₂ es de 1.6 %. Podemos concluir que los protocolos y los reactivos que fueron utilizados en la superficie de SiO₂ logran mayor cantidad de uniones del Ac biotinilado con la superficie que en la superficie de Au y por consiguiente se logran más uniones de

Colección	Parámetros	Promedios	Máximos	Mínimos	Medianas	Error
Ac+B+S	% L	1,617129424	30,10986328	0,0244140625	0,2668313419	0,5873377183
	Max L	224,7256659	236,589	94,2216	236,589	0
	Min L	41,97770549	52,6646	25,9482	46,0356	7,2254
	Mediana L	115,0663824	236,589	30,671	71,7774	157,0886
	Píxeles L > UG	22520,79121	419322	340	3716	8179,5
	UG	41,84443956	46,02550172	25,94131818	46,02550172	7,252301724
	%img	2,029004301	37,77869674	0,03063220364	0,3347919668	0,7369297342
Ac+S	% L	0,34818941	2,610294118	0,001364315257	0,1693546071	0,2159028895
	Max L	203,6859625	236,589	51,519	236,589	24,37325
	Min L	22,0017675	34,8026	19,657	21,3786	1,6112
	Mediana L	125,84434	236,589	23,2342	64,57645	205,18735
	Píxeles L > UG	4849,025	36352	19	2358,5	3006,75
	UG	20,8993325	21,37534828	19,64438182	21,37534828	1,730966458
	%img	0,436871533	3,275123137	0,001711799615	0,212488389	0,2708922891
BSA+S	% L	0,2869789273	0,5149213006	0,1281738281	0,2834903493	0,09302475873
	Max L	231,2777583	239,3802	106,328	236,589	0
	Min L	23,28360833	25,5178	21,0874	23,3032	4,3628
	Mediana L	107,1326083	236,589	30,8102	61,6625	189,5117
	Píxeles L > UG	3996,583333	7171	1785	3948	1295,5
	UG	23,22977917	25,43569167	21,02386667	23,22977917	4,411825
	%img	0,3600710427	0,6460692126	0,1608190691	0,355693941	0,1167177053
S	% L	0,533976237	2,715418199	0,002656824449	0,4608513327	0,4592895508
	Max L	187,8520667	236,589	63,5988	236,589	93,2066
	Min L	23,09770667	26,095	20,8026	20,8078	5,2872
	Mediana L	46,83529333	236,589	24,6646	28,7406	9,52825
	Píxeles L > UG	7436,366667	37816	37	6418	6396,25
	UG	23,05602333	26,06025385	20,75867059	20,75867059	5,301583258
	%img	0,6699773472	3,407021802	0,003333504513	0,578227891	0,5762683309

Figura 57: Tabla resumen de los 4 grupos de pruebas sobre superficies de SiO₂: Ac+B+S, Ac+B, S, BSA+S

estreptavidina a la biotina.

Como ya hemos dicho, el objetivo de este trabajo fue el de lograr poner a punto un método de funcionalización de superficies. Este conocimiento ayuda a mejorar la especificidad y sensibilidad de detección del biosensor, logrando así mejores resultados y la capacidad de un diagnóstico específico para cualquier enfermedad.

11. Anexos

11.1. Código Python

El procesamiento de imágenes se realizó en una notebook en Google Collaboratory con el lenguaje Python 2.7 y las librerías: matplotlib, itk, numpy, skimage, scipy, PIL, statistics, openpyxl, openpyxl.styles, cv2 y google.colab.patches.

Este código también se puede encontrar en GitHub en el repositorio FluorescenceAnalysis [75].

11.1.1. Instalación de Librerías

```
1 !pip install vtk
2 !pip install itk
3
4 from matplotlib import pyplot as plt
5 import itk
6 import vtk
7 import numpy as np
8 import skimage
9 import scipy
10 from skimage import morphology
11 from PIL import Image
12 import statistics
13 from matplotlib.patches import Circle
14 from openpyxl import Workbook
15 from openpyxl.styles import Alignment
16 import cv2
17 from google.colab.patches import cv2_imshow
18
19 # Load the Drive helper and mount
20 from google.colab import drive
21
22 # This will prompt for authorization.
23 drive.mount('/content/drive')
```

Figura 58: Instalación de librerías que se utilizarán para el procesamiento de imágenes

11.1.2. Función Analisis

```
1 def analisis(adress,coleccion,start,end):
2     pathMask = '/content/drive/My Drive/CNEA/STREPTAVIDINA/imageMask/blackmask.tif'
3     maskImage=cv2.imread(pathMask)
4     imagenes=[]
5     arrays=[]
6     luminancias=[]
7     #Se calcula el Umbral general de la coleccion de imagenes
8     Umbral=UmbralGeneral(adress,start,end)
9     #Se arma el excel
10    workbook = Workbook()
11    worksheet = workbook.active
12
13    for i in range(start,end+1):
14        #Se arma el directorio de cada imagen
15        path=adress+'Image'+ str(i) +'.tif'
16
17        #Se obtiene la imagen y se la transforma a un array
18        #imagenes: se guardan todas las imagenes de esta coleccion (start,end)
19        #arrays: se guardan todas las imagenes transformadas a array
20        imagenes.append(itk.imread(path))
21        arrays.append(itk.GetArrayFromImage(imagenes[i-start]))
22
23        #filas, columnas de la imagen y sus capas RGB
24        filas=arrays[i-start].shape[0]
25        columnas=arrays[i-start].shape[1]
26        R=arrays[i-start][:,:,0]
27        G=arrays[i-start][:,:,1]
28        B=arrays[i-start][:,:,2]
29
30        #Array que va a guardar todas las luminancias de una imagen que superen el Umbral definido
31        ImagenL=[]
32
33        #Recorre por cada fila todas las columnas (recorre todos los pixeles)
34        for f in range(filas):
35            for c in range(columnas):
36                #Si los pixeles no estan situados en la zona central del error de la lente realiza la acción
37                if(maskImage[f][c][0] == 0.):
38                    #Calcula la luminancia de cada pixel
39                    lum=0.2126*R[f][c]+0.7152*G[f][c]+0.0722*B[f][c]
40
41                    #Si supera el Umbral el valor de luminancia (lum)
42                    if (lum >= Umbral):
43                        ImagenL.append(lum)
```

Figura 59: Primera parte de la función analisis

```

44
45 worksheet['B'+str(i-start+2)]= 'Image ' + str(i)
46 # % de Luminicencia
47 print('% de Luminicencia: ' + str(100*len(ImagenL)/(filas*columnas)))
48
49 worksheet['C'+str(i-start+2)]=str(100*len(ImagenL)/(filas*columnas))
50 # Max de Luminicencia
51 print('Max ' + str(max(ImagenL)))
52
53 worksheet['D'+str(i-start+2)]=str(max(ImagenL))
54 # Min de Luminicencia
55 print('Min ' + str(min(ImagenL)))
56
57 worksheet['E'+str(i-start+2)]=str(min(ImagenL))
58 # Median de Luminicencia
59 print('Median ' + str((statistics.median(ImagenL))))
60
61 worksheet['F'+str(i-start+2)]=str((statistics.median(ImagenL)))
62 # Bins Luminancia >= Umbral
63 print('Bins Luminancia: '+str(len(ImagenL)))
64
65 worksheet['G'+str(i-start+2)]=str(len(ImagenL))
66 # Umbral
67 print('Lum >' + str(Umbral) )
68
69 worksheet['H'+str(i-start+2)]=str(Umbral)
70 #Tamaño imagen
71 print('filas: ' + str(filas), 'columnas: ' + str(columnas))
72
73 # luminancias: por imagen guarda el conjunto de luminancias que superaron el umbral
74 luminancias.append(ImagenL)
75 #Muestra Imagen
76 print('Image ' + str(i))
77 plt.imshow(arrays[i-start])
78 plt.show()
79
80 worksheet['A1']='Colección'
81 worksheet['B1']='Imágenes'
82 worksheet['C1']='% Luminicencia'
83 worksheet['D1']='Max L'
84 worksheet['E1']='Min L'
85 worksheet['F1']='Mediana L'
86 worksheet['G1']='Bins L > Umbral'
87 worksheet['H1']='Umbral L'
88 worksheet.merge_cells('A2:A'+str(i-start+2))
89 worksheet['A2']=coleccion
90 workbook.save(coleccion+'.xlsx')
91

```

Figura 60: Segunda parte de la función analisis. Donde se arma y guarda el Excel con las métricas de cada grupo de imágenes

11.1.3. Función Cálculo de Umbral por imagen

```
1 def CalculoUmbralPorImagen(path):
2     pathMask = '/content/drive/My Drive/CNEA/STREPTAVIDINA/imageMask/blackmask.tif'
3     maskImage=cv2.imread(pathMask)
4     imagen=itk.imread(path)
5     array=itk.GetArrayFromImage(imagen)
6     filas=array.shape[0]
7     columnas=array.shape[1]
8     L=[]
9     R=array[:, :, 0]
10    G=array[:, :, 1]
11    B=array[:, :, 2]
12    for f in range(filas):
13        for c in range(columnas):
14            if(maskImage[f][c][0] == 0.):
15                lum=0.2126*R[f][c]+0.7152*G[f][c]+0.0722*B[f][c]
16                if (lum not in L):
17                    L.append(lum)
18    Umbral=statistics.median(L)
19    return Umbral
```

Figura 61: Función Cálculo de Umbral por imagen

11.1.4. Función Cálculo de Umbral General

```
1 def UmbralGeneral(adress,start,end):
2     umbrales=[]
3     for i in range(start,end+1):
4         iteration=str(i)
5         path=adress+'Image'+ iteration +'.tif'
6         u=CalculoUmbralPorImagen(path)
7         umbrales.append(u)
8     Umbral=statistics.mean(umbrales)
9     return Umbral
```

Figura 62: Función Cálculo umbral general

11.1.5. Máscara

```
1 pathTest = '/content/drive/My Drive/CNEA/STREPTAVIDINA/7-2 SiO2/Image53.tif'
2 image = cv2.imread(pathTest)
3 # generates a black image with the shape of the original image
4 black = np.zeros_like(image)
5 window_name = 'Image'
6 #circle
7 center_coordinates = (700, 570)
8 radius = 300
9 color = (255, 255,255)
10 thickness = -1
11 #add circle to black mask
12 blackMask = cv2.circle(black, center_coordinates, radius, color, thickness)
13 # save the mask
14 cv2.imwrite('blackMask.png',black)
```

Figura 63: Generación y guardado de máscara para la corrección del error del lente

11.1.6. Análisis de Máscara

```
1 pathMask = '/content/drive/My Drive/CNEA/STREPTAVIDINA/imageMask/blackmask.tif'
2 imagen=itk.imread(pathMask)
3 array=itk.GetArrayFromImage(imagen)
4 filas=array.shape[0]
5 columnas=array.shape[1]
6 pixelesMascara = 0
7 pixelesFondo=0
8
9 for f in range(filas):
10  for c in range(columnas):
11    if(array[f][c][0] == 0.):
12      pixelesFondo += 1
13    else:
14      pixelesMascara +=1
15
16 print( 'shape mask' + str(array.shape))
17 print('pixeles mascara:' + str(pixelesMascara))
18 print('pixeles fondo:' + str(pixelesFondo))
19 print('pixeles total:' + str(pixelesMascara + pixelesFondo))
20 print('pixeles total:' + str(filas*columnas))
21
22 #Resultados
23 # shape mask(1024, 1360, 3)
24 # pixeles mascara:282697
25 # pixeles fondo:1109943
26 # pixeles total:1392640
27 # pixeles total:1392640
```

Figura 64: Análisis de la relación entre la máscara y la imagen total

11.1.7. Aplicación

Las imágenes son guardadas en una carpeta en Drive en la dirección que se puede ver en la variable `pathACBS` en la Figura 65. Luego se aplica la función *analisis* de la sección 11.1.2, al cual recibe tres parámetros: la dirección de la carpeta donde se encuentra el grupo de imágenes, el nombre base de la colección de imágenes y el rango de número de imágenes que se encuentran en la carpeta. En el caso de la Figura 65, hay 9 imágenes en la carpeta cuya numeración va de 85 a 94.

```
[ ] 1 pathACBS = '/content/drive/My Drive/CNEA/STREPTAVIDINA/4-11/Au/v.1 Ac-B+S/'  
    2 analisis(pathACBS,'4-11 v.1 Ac-B+S',85,94)
```

Figura 65: Análisis de la relación entre la máscara y la imagen total

Referencias

- [1] Alimentos - ANMAT. Recuperado de http://www.anmat.gov.ar/alimentos/e_oli;ntro.asp
- [2] Extracto del Boletín Integrado de Vigilancia No 222 - SE 30 - Agosto 2014. Ministerio de Salud.
- [3] Manejo del Síndrome Urémico Hemolítico. Dra Marta Monteverde (Servicio de Nefrología Hospital Garrahan) Agosto 2014
- [4] CNEA trabaja en el desarrollo de nanotecnología con aplicación en industria espacial. Blog Argentina en el Espacio - 2019
- [5] Silanización de la superficie con APTES - Elena de Juan Franco. Junio 2013
- [6] News Medical - Life Sciences - Principios del biosensor. Dr. Ananya Mandal, MD.
- [7] Fabricación de biosensores piezoeléctricos para la lectura de interacciones antígeno-anticuerpo. J.M. Hernández-Lara 8 de mayo de 2012
- [8] Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. Yalile Alfonso Valdés. Agosto 2001
- [9] Optimización del proceso de inmovilización de anticuerpos en inmunobiosensores - 2018. Recuperado de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1887-85712018000300158
- [10] <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Anticuerpo>
- [11] INMUNOLOGÍA GENERAL - Capítulo 4: Antígenos. Enrique Iáñez Pareja - Departamento de Microbiología. Recuperado de https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_04.htm
- [12] Protein adsorption on solid surfaces. Hlady, V et al - 1996. Doi: 10.1016/S0958-1669(96)80098-X

- [13] Antibody Adsorption and Orientation on Hydrophobic Surfaces. Wiseman, M et al - 2011. Doi: 10.1021/la203095p
- [14] Development of optical immunosensors for detection of proteins in serum. Kyprianou, D et al - 2013. Doi: 10.1016/j.talanta.2012.10.042
- [15] Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA-streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates. Niemeyer, C et al - 1994. Doi: 10.1093/nar/22.25.5530
- [16] DNA-directed capture of primary cells from a complex mixture and controlled orthogonal release monitored by SPR imaging. Bombera, R et al - 2012. Doi: 10.1016/j.bios.2011.11.034
- [17] Immobilization Principles - Selecting the Surface for ELISA Assays = <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-DD-AN-454.pdf>
- [18] Supported Protein G on Gold Electrode: Characterization and Immunosensor Application. Hafaiedh, I et al - 2013. Doi: 10.1016/j.talanta.2013.04.059
- [19] Antibody immobilisation on fibre optic TIRF sensors. Tedeschi, L et al - 2003. Doi: 10.1016/S0956-5663(03)00173-8
- [20] Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry. Wang, Z et al - 2004. Doi:10.1016/j.jim.2003.12.002
- [21] Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker Gunda, N et al - 2014. Doi: 10.1016/j.apsusc.2014.03.130
- [22] Impedimetric immunosensor for human serum albumin detection on a direct aldehyde-functionalized silicon nitride surface. Caballero, D et al - 2012. Doi: 10.1016/j.aca.2012.01.031
- [23] A novel biosensor based on serum antibody immobilization for rapid detection of viral antigens. Tran Quang Huya et al. 2011. Doi:10.1016/j.talanta.2011.09.012
- [24] Microfluidic reflectometric interference spectroscopy-based sensing for exploration of protein-protein interaction conditions. Kurihara, Y et al - 2013. Doi: 10.1016/j.bios.2012.07.032
- [25] Nanostructured conducting polymer based reagentless capacitive immunosensor. Bandodkar, A et al - 2009. Doi: 10.1007/s10544-009-9360-2

- [26] Biosensor Magnético - David Lago Cachón. Recuperado de <https://es.slideshare.net/Lago1001/lago-cachon-david>
- [27] Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors, Makaraviciute, A., & Ramanaviciene, A. - 2013. Doi: 10.1016/j.bios.2013.06.060
- [28] Small Molecule Immunosensing Using Surface Plasmon Resonance. John Mitchell. 2010. Doi: 10.3390/s100807323
- [29] Self-assembled monolayers of thiolates on metals: a review article on sulfur-metal chemistry and surface structures - DOI:10.1039/C4RA04659E
- [30] Autoensamblado de alcanotioles sobre oro. Recuperado de <http://sedici.unlp.edu.ar>
- [31] Chemical Functionalization of Plasmonic Surface Biosensors: A Tutorial Review on Issues, Strategies, and Costs - DOI:10.1021/acsami.7b01583
- [32] Surface plasmon resonance-based immunosensor with oriented immobilized antibody fragments on a mixed self-assembled monolayer for the determination of staphylococcal enterotoxin B. Tsai, W et al - 2009. Doi: 10.1007/s00604-009-0171-1
- [33] Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization Techniques on the Binding Capacity of Immunosensor. Kausaite-Minkstimiene, A et al - 2010. Doi: 10.1021/ac100468k
- [34] Development of a myoglobin impedimetric immunosensor based on mixed self-assembled monolayer onto gold. Billah, M et al - 2008. Doi: 10.1007/s00604-007-0793-0
- [35] A dual quartz crystal microbalance for human cardiac troponin T in real time detection. Mattos, A et al - 2012. Doi: 10.1016/j.snb.2011.10.058
- [36] Microsphere Coupling – Two-step EDC/Sulfo NHS Covalent Coupling Procedure for Estapor® Carboxyl-modified Dyed Microspheres - Merck Millipore 2015. Recuperado de https://www.merckmillipore.com/Web-HK-Site/en_US/-/USD/ShowDocument-Pronet?id=201507,097
- [37] Bioplataformas electroanalíticas versátiles para diagnóstico temprano y fiable de cáncer a diferentes niveles moleculares - Rebeca Magnolia Torrente Rodríguez 2019 .Recuperado de <https://eprints.ucm.es/56788/1/T41355.pdf>
- [38] La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (ftirm) en el estudio de sistemas biológicos. Guillermo Barraza-Garzaa, Laura de la Rosa. Septiembre 2013

- [39] Method for immobilization of living and synthetic cells for high-resolution imaging and single-particle tracking. Lukasz Syga, Dian Spakman, Christiaan M. Punter & Bert Poolman. 13 de Septiembre 2018
- [40] <https://es.wikipedia.org/wiki/Glutaraldehido>
- [41] Quimica Organica - Volumen 2. Septima Edicion. L. G Wade, Jr. Pearson
- [42] Reduced nonspecific adsorption on covalently immobilized protein surfaces using poly(ethylene oxide) containing blocking agents - DOI: 10.1016/S0165-022X(03)00150-7
- [43] Self-Assembled Layer of Thiolated Protein G as an Immunosensor Scaffold. Jeremy M. Fowler et al - 2007
- [44] Investigations of Thiolated Self-Assembled Monolayers on Gold Substrates by FTIR with Specular Reflectance. Jamie Kim, PhD.
- [45] Las técnicas de análisis y la actualidad ambiental verde - Capítulo 6 : Análisis de los espectros de infrarrojo. Pedro Martín Mondragón Cortez (2020)
- [46] Ultrasensitive detection of disease biomarkers using an immuno-wall device with enzymatic amplification. Keine Nishiyama et al - 2019. DOI: 10.1039/c9an00480g
- [47] An improved gold nanoparticle probe-based assay for HCV core antigen ultrasensitive detection. Hui-Qiong Yin et al - 2017. DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.02.007
- [48] How the Immune System Works (4th Edition) - Lauren M. Sompayrac, 2012
- [49] Densities and orientations of antibodies on nano-textured silicon surfaces. Satyendra Kumar et al - 2010.
- [50] Enfermedades transmitidas por alimentos - ANMAT. Recuperado de [http : //www.anmat.gov.ar/alimentos/ficha_enfermedades_alimentos_SUH.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/ficha_enfermedades_alimentos_SUH.pdf)
- [51] Copper. MA. Optical biosensor <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.26.1.541s> in drug discovery. Nat Rev Drug Discovery. 2002
- [52] Biosensores y su aplicacion en el descubrimiento de farmacos. Esther Alemán Sierra. 2018
- [53] Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. Schuck P. 1997. Doi: 10.1146/annurev.biophys.26.1.541

- [54] Catálogo SPR NAVI™ 210A - Scientific Solutions. Recuperado de <http://scisol.com.au/product/spr-navi-210a/>
- [55] Semiconductor Lithography (Photolithography) - The Basic Process. Recuperado de <http://www.lithoguru.com/scientist/lithobasics.html>
- [56] PDMS membranes as sensing element in optical sensors for gas detection in water. S Torino L conte - Noviembre 2017 - Doi: 10.1016/j.sbsr.2017.11.008
- [57] Diseño, fabricación y evaluación de circuitos microfluídicos para el movimiento de bacterias magnetotácticas. Igor Isasi Sánchez. Julio 2018
- [58] El PDMS y la bioimpresión: claves para el futuro de los dispositivos médicos. Abril 2019. Recuperado de <https://www.interempresas.net/Fabricacion-aditiva/Articulos/244060-El-PDMS-y-la-bioimpresion-claves-para-el-futuro-de-los-dispositivos-medicos.html>
- [59] Marcaje con biotina de anticuerpos de dominio único que detectan histonas nativas de *Leishmania (V.) braziliensis* - 2019. Recuperado de http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/6629/Marcaje_OscanoaAida-Rosa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [60] Garman A. Labelling proteins and peptides: chemical background. In: Elsevier, editor. *Non-Radioactive Labelling: A Practical Introduction*. 1st ed. London; 1997. p. 20–32.
- [61] Green NM. Avidin. *Adv Protein Chem*. 1975;29:85–133.
- [62] Bruch RC, White HB. Compositional and structural heterogeneity of avidin glycopeptides. *Biochemistry*. 1982 Oct 12;21(21):5334–41.
- [63] Duhamel RC, Whitehead JS. Prevention of nonspecific binding of avidin. *Methods Enzymol*. 1990;184(C):201–7.
- [64] Chaiet L, Wolf FJ. The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by *Streptomyces*. *Arch Biochem Biophys*. 1964 Jul 20;106:1–5.
- [65] Alon R, Bayer EA, Wilchek M. Streptavidin contains an RYD sequence which mimics the RGD receptor domain of fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Aug 16;170(3):1236–41. *Green NM. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol*. 1990;184(C):51–67.
- [66] Green NM. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol*. 1990;184(C):51–67.
- [67] Catálogo Streptavidin. BioCare - Starr Trek Universal HRP Detection System

- [68] Della-Penna D, Christoffersen RE, Bennett AB. Biotinylated proteins as molecular weight standards on Western blots. *Anal Biochem.* 1986 Feb 1;152(2):329–32.
- [69] Green NM, Konieczny L, Toms EJ, Valentine RC. The use of bifunctional biotinyl compounds to determine the arrangement of subunits in avidin. *Biochem J.* 1971 Dec;125(3):781–91.
- [70] Color-to-Grayscale: Does the Method Matter in Image Recognition?. Christopher Kanan, Garrison W. Cottrell. 2012 DOI:10.1371/ journal.pone.0029740
- [71] The effect of uniform capture molecule orientation on biosensor sensitivity: Dependence on analyte properties. Anke K. Trilling et al.2012. Doi: 10.1016/j.bios.2012.07.027
- [72] Placa de 96 wells para cultivo de Biodynamics. Recuperado de: <https://www.biodynamics.com.ar/product-page/placa-de-96-wells-para-cultivo>
- [73] Structural Information on the AuS Interface of Thiolate-Protected Gold Clusters: A Raman Spectroscopy Study. Birte Varnholt et al. 2014. Doi: 10.1021/jp502453q
- [74] Evaluación del potencial adyuvante de nanopartículas biodegradables en vacunación contra virus Dengue. Q.C. Irma Yadira Izaguirre Hernández Junio 2016
- [75] FluorescenceAnalysis repositorio de GitHub del usuario LuciaOsi. Recuperado de <https://github.com/LuciaOsi/FluorescenceAnalysis/blob/main/Fluorescencia.ipynb>
- [76] Evaluación conjunta de "Polidimetilsiloxanos lineales" de productos químicos de productos básicos, septiembre de 1994 (Informe No. 26) ISSN 0773-6339 -26.
- [77] Courtney, Thomas H. (2013). Comportamiento mecánico de materiales . McGraw Hill Education (India). ISBN 978-1259027512. OCLC 929663641 .