

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Desarrollo de un biosensor para la detección de  
*Streptococcus pneumoniae* basado en el aptámero  
LYD-3 y nanopartículas de oro**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

PRESENTA:

**JORGE ALFREDO CAMPOY RAMÍREZ**

DIRECTOR:

**DR. JOSÉ DE JESÚS OLIVARES TREJO**

POSGRADO  
EN CIENCIAS  
GENÓMICAS

Ciudad de México, enero de 2024.

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

**INTEGRACIÓN DEL JURADO:**

Presidente: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Secretario: Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Vocal: Dra. Elisa Azuara Liceaga

**Plantel de adscripción:**

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

**DIRECTOR**

---

Dr. José de Jesús Olivares Trejo  
Posgrado de Ciencias Genómicas de la UACM.

## **Comité tutorial**

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Dra. Elisa Azuara Liceaga

Dra. Lilia López Cánovas

## **Lectores de tesis**

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Dra. Elisa Azuara Liceaga

Dra. Lilia López Cánovas

La presente tesis fue llevada a cabo en el Laboratorio 4 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) Plantel del Valle. Estuvo bajo la dirección del Dr. José de Jesús Olivares Trejo. Durante toda mi formación académica en la maestría en Ciencias Genómicas conté con el apoyo de la beca CONACYT No. 809243. Adicionalmente el proyecto fue favorecido por la Convocatoria del Colegio de Ciencia y Tecnología de la UACM con el proyecto número UACM CCYT-2023-IMP-16.

## Agradecimientos

Estimados lectores:

Es un placer para mí presentarles mi tesis titulada "Desarrollo de un biosensor para la detección de *Streptococcus pneumoniae* basado en el aptámero Lyd-3 y nanopartículas de oro.". Este trabajo representa el resultado de dos años de investigación en un área que me apasiona profundamente y que tiene una gran importancia para el desarrollo de nuevos mecanismos para detectar a *S. pneumoniae* en tiempo real.

Debo indicar que este trabajo recibió el apoyo financiero del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) a través de la beca número 809243, la cual permitió que pudiera dedicar mi tiempo y esfuerzo a este trabajo de manera completa.

Me gustaría empezar a agradecer a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por permitirme realizar este proyecto en el plantel Del Valle, inscrito al Posgrado de Ciencias Genómicas, donde se me asignó el Laboratorio 4, para poder desarrollar la investigación. Por lo cual me gustaría agradecer al Dr. José de Jesús Olivares Trejo, por permitirme trabajar bajo su directiva y contribuir con sus conocimientos y experiencia en la investigación. También quiero reconocer a la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez y a la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga por su apoyo y asesoramiento durante todo el proceso de investigación, sin sus aportes, este trabajo no habría salido adelante.

Deseo agradecer a mis profesores, específicamente a Dra. Lili y la M.C. Laura, así como a mis amigos en la UACM, Paola, Marcos y Geovanni. Nunca sin olvidar a mis amigos y colegas Dr. Fernando, Dr. Alexandro, M.C. Natali y a mi mejor amigo de toda la vida Rafael Barajas, así como a su familia que siempre ha sido un contrafuerte en mi vida. También quisiera hacer un apartado para mi familia, empezando con mi novia Norma Hernández, por todas sus palabras de apoyo, consejos y cariño, siempre haces que cada día se único. Para mi primo Olliver Santana y hermano Carlos Villeda, en los cuales siempre he encontrado a los hermanos que todos quieren tener, dándome apoyo y palabras de razón. Por último, pero con más peso, agradezco a mi mamá Isabel Ramírez, que siempre le dedico horas a mí enseñanza, a apoyarme, escucharme y a bendecir mi camino, para convertirme en la persona que ahora soy.

A todos los mencionados y a los que no, por su incondicional apoyo y motivación durante todo el proceso de investigación, les agradezco de manera infinita, ya que este trabajo no habría sido posible sin su ayuda y comprensión.

Espero que esta tesis contribuya al esfuerzo ligado al desarrollo de nuevas metodologías, como son los biosensores en la detección de enfermedades bacterianas en México y el mundo.

## Dedicatoria

Estimados lectores:

Deseo dedicar con todo mi corazón, la presente tesis a mi mamá, Isabel Ramírez, quien ha sido mi modelo por seguir mi guía y mi apoyo incondicional desde el primer día de mi educación, te dedico este y todos los logros a futuro. **“Gracias por tu amor y constante motivación.”**

También quiero agradecer a mi familia, en especial a mi primo Olliver Santana y a mi hermano Carlos Villeda, quienes siempre me han brindado su apoyo, comprensión y cariño, les dedico este trabajo con mucho cariño. **“Gracias por ser mis amigos y compañeros de fechorías.”**

Además, quisiera dedicar unas palabras a mi compañera de aventuras, Norma Hernández, por su constante apoyo y motivación en momentos difíciles. A ella le debo este y muchas cosas más. **“Te agradezco por siempre estar a mi lado, así como por la paciencia que me tienes.”**

Sin nunca olvidarlos porque son parte importante de mi vida quisiera agregar a esta dedicatoria a mi amigo Rafael Barajas, por estar presente en todo momento y brindar siempre una mano amiga, a él y su familia, les agradezco, ya que siempre me han recibido con los brazos abiertos. **“Muchas gracias por todo.”**

<b>1. Índice</b>	
<b>2. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>10</b>
<b>3. ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>12</b>
<b>4. ABREVIATURAS</b>	<b>13</b>
<b>5. RESUMEN</b>	<b>15</b>
<b>6. ABSTRACT</b>	<b>16</b>
<b>7. INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
7.1 GENERALIDADES DE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	17
7.2 MICROBIOLOGÍA	18
7.2.1 <i>Microbiología básica</i>	18
7.2.2 <i>Crecimiento y metabolismo</i>	18
7.2.3 <i>Estructura</i>	19
7.2.4 <i>Patogenia</i>	24
7.2.5 <i>Epidemiología</i>	28
7.2.6 <i>Diagnóstico</i>	29
<b>8. ANTECEDENTES PARTICULARES</b>	<b>35</b>
8.1 BIOSENSORES	35
8.2 ELEMENTOS DE UN BIOSENSOR	36
8.3 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSENSORES	37
8.4 APTÁMEROS	38
8.5 APTÁSENSORES	40
8.5.1 <i>Tipos de Aptásensores</i>	40
8.5.2 <i>Aptásensores ópticos</i>	40
8.6 POTENCIADORES DE LOS BIOSENSORES	41
8.6.1 <i>Nanomateriales</i>	42
8.7 NANOPARTÍCULAS DE ORO	44
8.7.1 <i>Aptámeros unidos a nanopartículas de oro</i>	46
8.8 APTÁSENSORES PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS	46
<b>9. HIPÓTESIS</b>	<b>48</b>
<b>10. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>48</b>
<b>11. OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
11.1 OBJETIVO GENERAL	49
11.2 OBJETIVOS PARTICULARES	49
<b>12. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>50</b>
<b>13. METODOLOGÍA</b>	<b>51</b>
13.1 MICROBIOLOGÍA	51
13.1.1 <i>Cepa bacteriana</i>	51

13.1.2	Cultivos en medio sólido .....	51
13.1.3	Cultivos en medio líquido .....	51
13.1.4	Crioconservación de las bacterias .....	51
13.1.5	Tinción de Gram .....	51
13.1.6	Prueba de la Catalasa .....	51
13.1.7	Prueba de Optoquina .....	52
13.2	APTÁMEROS.....	52
13.2.1	Selección y modificación de aptámeros.....	52
13.2.2	Gel de electroforesis de Agarosa.....	53
13.3	NANOPARTÍCULAS .....	53
13.3.1	Síntesis de AuNPs.....	53
13.3.2	Determinación del rendimiento de la síntesis de AuNPs .....	53
13.4	PREPARACIÓN DEL BIORECEPTOR O COMPLEJO AUNPS-LYD3.....	54
13.5	AGLOMERACIÓN POR NaCl .....	54
13.5.1	DETERMINACIÓN DE LA AGLOMERACIÓN DE LAS AUNPS .....	54
13.5.2	DETERMINACIÓN DE LA AGLOMERACIÓN DEL COMPLEJO AUNPS-LYD3.....	54
13.6.1	INCUBACIÓN DE AUNPS-LYD3 CON BACTERIAS.....	54
13.7	DETECCIÓN BACTERIANA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	55
13.8	CORRELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD DE LA SEÑAL A 525 NM POR ESPECTROFOTOMETRÍA Y LA CONCENTRACIÓN DE <i>S. PNEUMONIAE</i> (49619, TIGR4 Y R6) 55	
13.9	FILTRACIÓN Y AJUSTE DE PH PARA EL MEDIO DE OPOSICIÓN .....	55
13.10	DETECCIÓN DE <i>S. PNEUMONIAE</i> (49619, TIGR4 Y R6), POR EL COMPLEJO AUNPS-LYD3 EN MEDIO DE OPOSICIÓN .....	55
<b>14.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
14.1	PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>S. PNEUMONIAE</i> .....	56
14.2	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO .....	58
14.3	RENDIMIENTO DE LA SÍNTESIS DE AUNPS .....	59
14.4	APTÁMERO.....	60
14.5	ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL BIORECEPTOR.....	60
14.6	ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LAS ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DEL LYD-3 ...	61
14.7	ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LYD-3, SOBRE LA CONSTRUCCIÓN DEL BIORECEPTOR.....	62
14.8	CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEJO AUNPS-LYD3.....	63
14.9	PREPARACIÓN DEL AMORTIGUADOR PARA LA AGLOMERACIÓN DE LAS AUNPS .	64
14.10	INTERACCIÓN DEL COMPLEJO AUNPS-LYD3 CON <i>S. PNEUMONIAE</i> .....	65
14.11	INTERACCIÓN DE <i>S. PNEUMONIAE</i> (TIGR4, R6 Y 49619) Y DIFERENTES BACTERIAS COMO CONTROL NEGATIVO CON AUNPS-LYD3.....	67
14.12	ESPECIFICIDAD DEL APTÁMERO LYD-3 CONTRA EL APTÁMERO DTMRSA1 (CONTROL NEGATIVO).....	69

14.13 MICROSCOPIAS DE FLUORESCENCIA PARA <i>S. PNEUMONIAE</i> (TIGR4, R6 Y 49619) 71	
14.14 MICROSCOPIAS DE FLUORESCENCIA USANDO BACTERIAS INESPECÍFICAS (CONTROL NEGATIVO).....	72
14.15 CURVA DE CORRELACIÓN ESTÁNDAR ENTRE LA INTENSIDAD DE LA SEÑAL A 525 NM Y LA CONCENTRACIÓN DE <i>S. PNEUMONIAE</i> (49619, TIGR4 Y R6).....	73
14.16 CURVA DE CORRELACIÓN ESTÁNDAR ENTRE EL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN CLÁSICO Y EL BIOSENSOR PARA DETECTAR A <i>S. PNEUMONIAE</i> (49619, TIGR4 Y R6) .	74
<b>15. DISCUSIÓN .....</b>	<b>75</b>
<b>16. CONCLUSIONES .....</b>	<b>80</b>
<b>17. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>82</b>
<b>18. ANEXOS .....</b>	<b>89</b>

## 2. Índice de figuras

Figura 1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de <i>S. pneumoniae</i> .....	18
Figura 2. Crecimiento y morfología de <i>S. pneumoniae</i> en agar sangre. ....	19
Figura 3. Representación esquemática de los principales factores de virulencia de <i>S. pneumoniae</i> .....	21
Figura 4. Localización de los factores de virulencia de <i>S. pneumoniae</i> .. ....	24
Figura 5. Ciclo de vida de <i>S. pneumoniae</i> en el huésped y patogénesis de la enfermedad neumocócica.....	26
Figura 6. Prueba de sensibilidad a la optoquina. ....	30
Figura 7. Resultados negativos y positivos de la prueba de Catalasa. ....	30
Figura 8. Prueba de solubilidad en bilis.....	31
Figura 9. Diagrama esquemático de los elementos de un biosensor clásico.. ..	37
Figura 10. Esquema de la clasificación general de los tipos de biosensores. ....	38
Figura 11. Esquema de la selección in vitro de ácidos nucleicos funcionales o “SELEX”.....	39
Figura 12. Esquema de los aptásensores más comunes. ....	40
Figura 13. Esquema de la magnitud del tamaño de los nanomateriales. ....	42
Figura 14. Esquemas de la clasificación de los nanomateriales por su forma estructural.....	43
Figura 15. Proceso de nucleación en la síntesis de AuNPs y las formas resultantes. a) Representación del proceso de síntesis de las AuNPs... ..	45
Figura 16. Tinción de Gram para las cepas de <i>S. pneumoniae</i> .....	56
Figura 17. Prueba de la optoquina en <i>S. pneumoniae</i> . ....	57
Figura 18. Prueba de catalasa para <i>S. pneumoniae</i> . ....	57
Figura 19. Síntesis química de las AuNPs.. ....	58
Figura 20. Espectro de absorción en UV-visible de las AuNPs sintetizadas. ....	59
Figura 21. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 3% del aptámero Lyd-3 60 pM, 70 pM y 80 pM. ....	60
Figura 22. Monitoreo por espectrofotometría a 270 nm de la hibridación del bioreceptor a diferentes temperaturas y tiempos de incubación.. ....	61
Figura 23. Modelaje de la estructura secundarias de Lyd-3 a 4°C, 20°C y 37°C utilizando el software UNAFold Web Server*. ....	62
Figura 24. Optimización de la concentración de Lyd-3 con las condiciones preestablecidas de hibridación.....	62
Figura 25. Caracterización de los componentes del complejo AuNPs-Lyd3. ....	63
Figura 26. Análisis por espectrofotometría de las AuNPs por el amortiguador de aglomeración a diferentes concentraciones.. ....	64

Figura 27. Análisis por espectrofotometría de la resistencia del bioreceptor a NaCl.....	65
Figura 28. Análisis de absorbancia por espectrofotometría a 525nm para determinar la exposición de AuNPs-Lyd3 a las tres cepas de <i>S. pneumoniae</i> en diferentes cantidades de UFC/mL..	66
Figura 29. Actividad del complejo AuNPs-Lyd3 en presencia de <i>S. pneumoniae</i> (49619) y diferentes bacterias relacionadas al cuadro de enfermedades de la bacteria blanco.....	67
Figura 30. Actividad del complejo AuNPs-Lyd3 en presencia de <i>S. pneumoniae</i> (TIGR4) y diferentes bacterias relacionadas al cuadro de enfermedades de la bacteria blanco.....	68
Figura 31. Actividad del complejo AuNPs-Lyd3 en presencia de <i>S. pneumoniae</i> (R6) y diferentes bacterias relacionadas al cuadro de enfermedades de la bacteria blanco.....	68
Figura 32. Especificidad del aptámero Lyd-3 contra el aptámero DTMRSA1 (control negativo) para <i>S. pneumoniae</i> (49619).....	69
Figura 33. Especificidad del aptámero Lyd-3 contra el aptámero DTMRSA1 (control negativo) para <i>S. pneumoniae</i> (TIGR4)..	70
Figura 34. Especificidad del aptámero Lyd-3 contra el aptámero DTMRSA1 (control negativo) para <i>S. pneumoniae</i> (R6)..	70
Figura 35. Detección de la interacción entre el bioreceptor fluorescente y las cepas de <i>S. pneumoniae</i> ..	71
Figura 36. Detección de la interacción entre el bioreceptor fluorescente y bacterias no relacionadas (controles negativos)..	72
Figura 37. Relación lineal de las UFC de <i>S. pneumoniae</i> (TIGR4, R6 y 49619), contra la absorbancia a 525 nm.....	73
Figura 38. Relación entre el biosensor AuNPs-Lyd3 y el método de conteo en placa para la detección de <i>S. pneumoniae</i> ..	74

### 3. Índice de tablas

Tabla 1. Principales factores de virulencia de <i>S. pneumoniae</i> que intervienen en su patogenicidad.....	22
Tabla 2. Características de las técnicas de identificación microbiológica de <i>S. pneumoniae</i> . .....	31
Tabla 3. Características de las técnicas de identificación moleculares de <i>S. pneumoniae</i> . .....	34
Tabla 4. Clasificación de los nanomateriales según sus dimensiones. Esta clasificación se basa en las dimensiones que los nanomateriales tienen. ....	44
Tabla 5. Especificación representada de las modificaciones a la secuencia Lyd-3.....	52
Tabla 6. Especificación representada de las modificaciones a la secuencia DTMRSA1 .....	52
Tabla 7. Tamaño de AuNPs y la longitud de onda que se correlaciona con estas en un análisis por UV-bis .....	58
Tabla 8. Promedio del rendimiento en las síntesis de las AuNPs.....	59
Tabla 9. Selección de las cepas bacterianas como control negativo y su relación con <i>S. pneumoniae</i> , de acuerdo con la enfermedad que pueden provocar.....	67

## 4. Abreviaturas

**ABS:** Absorbancia

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ARNr:** Ácido ribonucleico ribosómico

**AuNPs:** Nanopartículas de oro

**AuNPs-Lyd3:** Complejo de nanopartículas de oro con aptámero Lyd-3 unido

**BgaA:**  $\beta$ -galactosidasa A

**BgaC:**  $\beta$ -galactosidasa C

**CbpA:** Proteína de superficie de unión a colina A

**CbpC:** Proteína de superficie de unión a colina C

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**Cps:** Polisacárido de cápsula

**°C:** Grados Celsius

**DTT:** Dithiothreitol

**DTMRSa1:** Aptámero negativo

**g:** gramos

**HAuCl<sub>3</sub>:** Ácido cloroáurico

**h:** Horas

**HtrA:** Proteasa similar al requisito de alta temperatura A

**Hyl:** Hialuronato liasa

**LTA:** Ácido lipoteicoico

**LytA:** Autolisina A

**LytB:** Autolisina B

**PspC:** Proteína C de superficie neumocócica

**LytC:** Autolisina C

**Lyd-3:** Aptámero para *Streptococcus pneumoniae*

**mm:** Milímetro

**mL:** Mililitro

**mM:** Milimolar

**min:** Minutos

**MiliQ:** Agua ultra purificada

**mV:** Milivoltios

**NanA:** Neuraminidasa

**Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>:** Citrato de sodio

**nM:** Nanomolar

**PAF:** Factor de agregación plaquetaria

**OD:** Densidad óptica

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**pH:** Escala logarítmica utilizada para especificar la acidez o basicidad de soluciones acuosas

**pIgR:** Receptor de inmunoglobulina polimérica

**PiaA/PiuA:** Proteínas de adquisición y absorción de hierro

**PLY:** Neumolisina

**PsaA:** Adhesina de superficie A

**PspA:** Proteína A de superficie neumocócica

**PsrP:** Proteína rica en serina

**QCM:** Microbalanzas de cristal de cuarzo

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RPM:** Revoluciones por minuto

**rPAF:** Factor de activación plaquetario

**s:** segundos

**SELEX:** Evolución sistemática de Ligandos por enriquecimiento exponencial

**SH:** Tíol

**StrA:** Sortasa A

**StrH:** Sortasa H

**TIGR4:** Cepa de *Streptococcus pneumoniae*

**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

**TSA:** Señal de tiramina

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**UFC/mL:** Unidades formadoras de colonias en mililitro

**μL:** Microlitro

**pM:** Pico molar

**49619:** Cepa de *Streptococcus pneumoniae*

**6-FAM:** 6-Carboxyfluorescein

## 5. Resumen

*Streptococcus pneumoniae* es una bacteria que se considera un problema de salud pública, es el agente causante de infecciones como otitis y sinusitis o infecciones más graves como neumonía o meningitis. Las enfermedades causadas por esta bacteria tienen una alta tasa de morbilidad y mortalidad, atribuida al fracaso en el diagnóstico, siendo el momento del diagnóstico el factor más importante para elegir el mejor tratamiento. Por lo que es muy importante desarrollar nuevos métodos de identificación que, en corto tiempo, permitan generar un esquema de tratamiento más adecuado. Una buena alternativa para este fin son los métodos basados en biosensores, con los que se puede dar un diagnóstico preciso, de forma rápida y a muy bajo costo. El objetivo de esta tesis fue desarrollar un biosensor que permita obtener la identificación de *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619) en un tiempo menor a una hora.

En esta tesis se diseñó un biosensor colorimétrico basado en un aptámero y AuNPs, para la detección específica de *S. pneumoniae*. El aptámero elegido fue Lyd-3 como elemento de reconocimiento y las AuNPs como indicador colorimétrico de la presencia del blanco. La unión de Lyd-3 a las AuNPs permitió estabilizarlas manteniéndose en solución por más tiempo. Cuando *S. pneumoniae* está presente en la solución con AuNPs-Lyd3, el aptámero Lyd-3 se disocia de las AuNPs, lo que da como resultado la conglomeración de las AuNPs, dando un cambio de color visible de rojo a azul. Este cambio colorimétrico se cuantificó mediante espectrofotometría, lo que permitió obtener una relación entre el número de UFC y la absorbancia de la solución. Por lo cual se comparó este nuevo método, con el resultado obtenido de un conteo de UFC, obteniéndose una  $R^2$  significativa para las tres cepas de *S. pneumoniae*. Este resultado nos indicó que el uso del biosensor nos proporciona el mismo resultado que utilizar la metodología tradicional por conteo de UFC, con la gran ventaja de que el biosensor nos proporciona la información de una forma más rápida, casi inmediata sin tener que esperar las 48 h de rigor, que se necesitan para la técnica tradicional.

## 6. Abstract

*Streptococcus pneumoniae* is a bacterium that poses a serious public health concern. It is the causative agent of infections such as otitis, sinusitis, as well as more serious infections such as pneumonia and meningitis. This pneumococcus has a high rate of morbidity and mortality, which can be attributed to a failure in diagnosis; the time taken for diagnosis is a crucial factor in choosing the best treatment. Therefore, it is important to develop new identification methods that allow for the generation of a more accurate treatment scheme in a shorter time. A good alternative is the use of biosensors, which can provide an accurate diagnosis quickly and at a very low cost. The goal of this investigation is to develop a device that allows for obtaining a result in almost immediate time. In this work, a Lyd-3 aptamer-based colorimetric biosensor was analyzed for the specific detection of *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619). The binding of Lyd-3 to the gold nanoparticles (AuNPs) stabilized the AuNPs, keeping the solution red. When *S. pneumoniae* was present in the solution, the Lyd-3 aptamer dissociated from the AuNPs, resulting in the aggregation of AuNPs and a visual color change of the solution from red to blue was observed. The color change was quantified by spectrophotometry and allowed for obtaining a relation between the number of CFUs (colony-forming units) and the absorbance of the solution. When comparing this new method with the results obtained from the CFUs count, a significant  $R^2$  was obtained for three strains. This relation indicates that the biosensor obtains the same results as that obtained by the quantification of CFUs, with the advantage of performing the detection almost immediately without having to wait the 48 h of waiting period required for traditional techniques.

## 7. Introducción

### 7.1 Generalidades de *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae*, es una bacteria esférica, característica principal de la cual proviene su nombre, siendo de las palabras griegas *strepto*, que significa “retorcido” y *coccus*, que significa “baya”. La segunda parte de su nombre denota el término “*pneumoniae*” que señala la tendencia de la bacteria a atacar pulmones y originar neumonía (Evans, 2022). Su denominación actual, *S. pneumoniae*, se le otorgó en el año de 1974 en la 8° edición del Manual de Bacteriología de Bergey por la observación de su morfología en cadenas cortas durante el crecimiento en medio líquido (Bennett *et al.*, 2005). *S. pneumoniae*, tiene la siguiente clasificación taxonómica:

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** *Firmicutes*

**Clase:** *Coccus*

**Orden:** *Lactobacillales*

**Familia:** *Streptococcaceae*

**Género:** *Streptococcus*

**Especie:** *pneumoniae*

Este neumococo es un microorganismo bacteriano altamente infeccioso. Es una bacteria capaz de producir una cápsula de carbohidratos que aumenta su virulencia. Estos mismos carbohidratos promueven las diferenciaciones entre las cepas que se extienden a un número mayor de 100 serotipos diferentes. La localización de *S. pneumoniae* es variada pero regularmente se encuentra asentado en la nasofaringe, desde donde puede extenderse y producir enfermedades severas, cuando esta extensión ocurre al exterior del torrente sanguíneo o de los órganos principales, generalmente las afectaciones son menos graves. Pero cuando la infección es invasiva, es decir, ocurre dentro del torrente sanguíneo o al interior de los órganos, causa enfermedades más graves y, en muchas de estas es mortal (Prado, 2010).

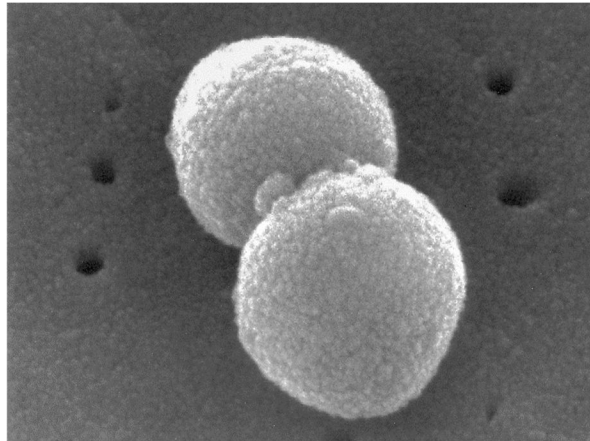
Las enfermedades asociadas a neumococos son mayormente en niños menores de dos años y adultos mayores de sesenta años (Ramírez *et al.*, 2015). Esto es porque se destaca que esta colonización se ve extendida después del nacimiento en los seres humanos, hasta llegar a los dos años, manteniéndose latente durante toda la edad adulta, siendo una bacteria oportunista debido a que puede volver a ser invasiva cuando el hospedero está inmunodeprimido. Para los humanos llegados los sesenta años sabemos que vuelve a aumentar la colonización de *S.*

*pneumoniae*, debido al desgaste del sistema inmunológico. El simple hecho de observar esta tendencia nos demuestra la alta incidencia de *S. pneumoniae* durante el transcurso de la vida humana (Ruvinsky, 2001).

## 7.2 Microbiología

### 7.2.1 Microbiología básica

*S. pneumoniae* es una bacteria Gram positiva que regularmente crece en una cadena pequeña de dos células llamada diplococo, esta bacteria comúnmente es conocida como neumococo (Bou *et al.*, 2011). Este neumococo de forma independiente tiene un diámetro aproximado de entre 0.5 a 2  $\mu\text{m}$ . *S. pneumoniae* fue aislado por primera vez en 1880, de forma independiente por Louis Pasteur en Europa, concretamente en su natal Francia y posteriormente en el mismo año por George Sternberg en Estados Unidos. En ambas situaciones este neumococo se encontró en saliva y se encontró como una bacteria mortal para los conejos, cuando estos eran inoculados. Posteriores estudios reconocieron que este organismo en humanos es la principal causa de neumonía adquirida (Ruvinsky, 2001).

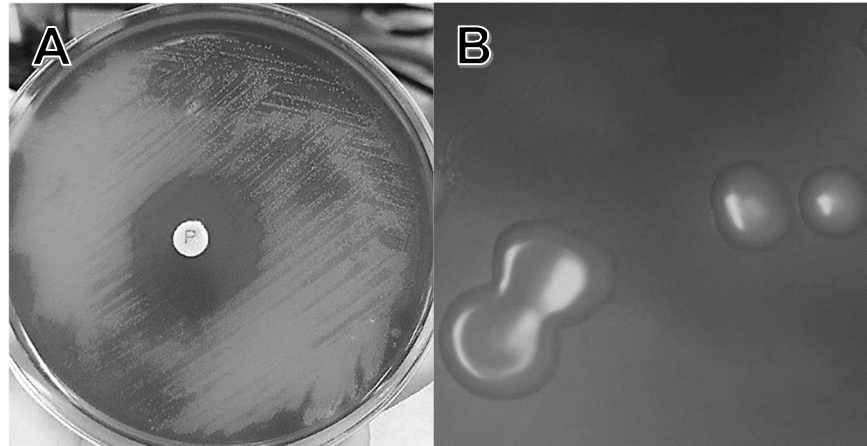


**Figura 1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de *S. pneumoniae*.** Morfología clásica de *S. pneumoniae*, creciendo en diplococos, con un tamaño de 1.8  $\mu\text{m}$  de diámetro individualmente. (Recopilación de la Biblioteca de imágenes de salud pública (PHIL), con número de identificación n.º263. Esta imagen es de dominio público y, por lo tanto, está libre de restricciones de derechos de autor)

### 7.2.2 Crecimiento y metabolismo

*S. pneumoniae* carece de elementos de la cadena de transporte de electrones y, por lo tanto, sobrepone esta carencia, obteniendo energía de la fermentación de azúcares. Este neumococo, puede fermentar una amplia variedad de azúcares, pero depende primordialmente de la glucosa que hay en sangre y la galactosa que se encuentra en el tracto respiratorio. Para su metabolismo, el lactato es un producto final fundamental de la metabolización de la glucosa, producto de la reducción del piruvato a través de la deshidrogenasa del ácido láctico. La fermentación de galactosa produce una fermentación ácida mixta con la obtención de formiato, acetato y etanol (Prado, 2010).

Aunque no puede realizar la fosforilación oxidativa, *S. pneumoniae* utiliza el oxígeno para oxidar el piruvato a acetilfosfato, dióxido de carbono y peróxido de hidrógeno. Este último producto se almacena en cantidades milimolares en cultivos de caldo, ya que esta bacteria es faltante de la enzima metabolizadora del peróxido de hidrógeno o catalasa. Debido a esto para el crecimiento en medios bacteriológicos, se requiere de glóbulos rojos para que estos proporcionen la catalasa. Otro factor que afecta el crecimiento de *S. pneumoniae*, corresponde al uso de bajas concentraciones de CO<sub>2</sub> (5-10%) esto nos permitirá tener el ambiente idóneo (Cacho *et al.*, 2007).



**Figura 2. Crecimiento y morfología de *S. pneumoniae* en agar sangre.** A) Se observa la hemólisis alfa en el rastro verdoso alrededor de la colonia debido a la actividad de la alfa hemolisina. B) Morfología de las colonias jóvenes de *S. pneumoniae* en agar sangre, bajo un aumento de 10X. (Recopilación de imágenes del Laboratorio 4 UACM, Posgrado en Ciencias Genómicas, imagen tomada por Paola Martínez)

### 7.2.3 Estructura

*S. pneumoniae* está constituida por diferentes estructuras, así como varios factores de virulencia, que ya han sido bien estudiados con el tiempo, entre ellos está la pared celular, una membrana plasmática que rodea la célula bacteriana. En conjunto, la comprensión de las estructuras de esta *S. pneumoniae* es esencial para el desarrollo de estrategias para detectar, prevenir y controlar enfermedades causadas por este neumococo (Weiser *et al.*, 2018).

#### 7.2.3.1 Membrana celular

La membrana celular o membrana plasmática, es un organelo que se encuentra en todas las células y está funge como divisor entre el interior de la célula y ambiente exterior. La membrana celular de *S. pneumoniae*, es una bicapa lipídica fluida, semipermeable, dinámica que, manteniendo la osmolaridad celular, permitiendo, el paso de nutrientes, iones y metabolitos del exterior al citosol celular, así como la salida de los productos de desecho (Evans, 2022).

Esta membrana tiene un grosor de 8 nm a unos 10 nm aproximadamente, esta se compone por fosfolípidos, de los cuales en su mayoría hay fosfatidilglicerol, cardiolipina y número importante de glucosil diglicérido y galactosil glucosil

diglicérido. Se conoce que en la membrana celular se encuentran diversas proteínas, estas se llaman proteínas integrales, la característica principal de estas proteínas es que atraviesan la membrana. Otras proteínas que se encuentran en este organelo son las proteínas periféricas, de las cuales la mayor parte son proteínas de característica lipoproteica cuya región lipídica es la que se asocia a la membrana. Estas proteínas interactúan entre ellas mismas para llevar a cabo los procesos esenciales de *S. pneumoniae* (Cacho *et al.*, 2007).

### **7.2.3.2 Pared celular**

La pared celular de la bacteria es una estructura dinámica que recubre la membrana celular, manteniendo la presión interna causada por las altas concentraciones de moléculas en el citoplasma, dando forma y aportando rigidez. Para *S. pneumoniae* esta estructura tiene un grosor de 40 a 80 nm y está por arriba de la membrana, apoyando a estabilizar a esta misma (Evans, 2022).

La estructura principal de la pared celular de *S. pneumoniae* se compone de peptidoglicano y ácido teicoico, pero a su vez los componentes restantes son glucosa, ribitol y galactosa que sobresalen junto con las proteínas. La estructura de peptidoglicano está formada de largas cadenas que alteran N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, extendiéndose cadenas de 4 a 6 aminoácidos que llamamos péptidos en tallo (Prado, 2010). Estos tallos están entrelazados mediante puentes de pentaglicina lo que proporciona rigidez y resistencia a la pared celular. En el caso del ácido teicoico, este es un polímero de carbohidratos que tiene fosforilcolina. Este, está unido covalentemente al peptidoglicano en la superficie externa de la pared celular y se prolonga al interior de la cápsula de *S. pneumoniae*. Uno de los compuestos característicos de los neumococos es el polisacárido C, presente en todos estos, pero solo en unas cuantas especies de *Streptococcus*. Siendo que también expresan proteínas particulares (Prado, 2001).

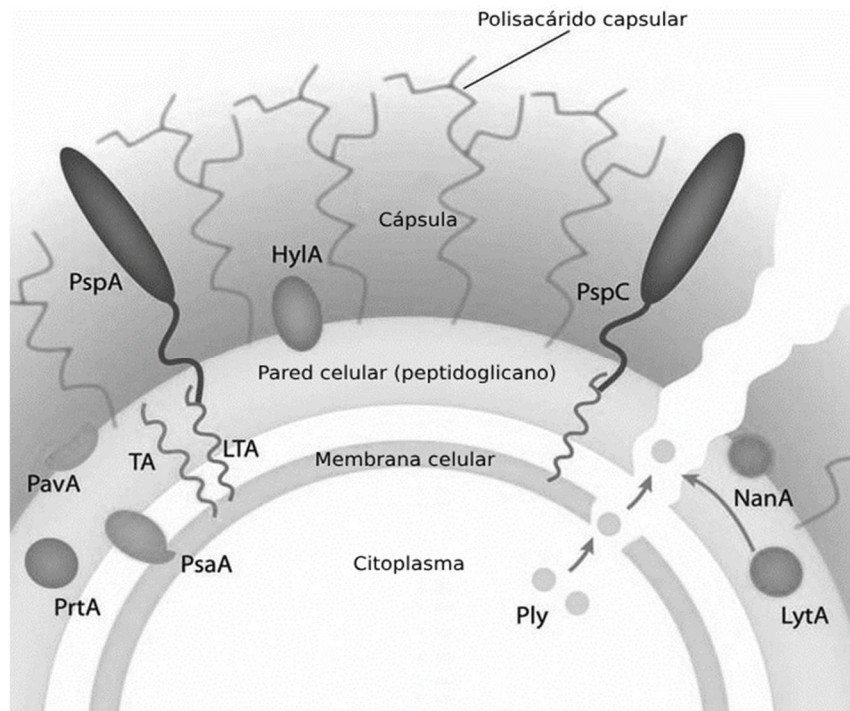
### **7.2.3.3 Cápsula**

La cápsula de *S. pneumoniae* es la capa más externa, la encontramos rodeando a la pared celular y tiene una naturaleza polisacárida. Una, de las funciones de esta cápsula es prevenir la pérdida de agua en la bacteria (Prado, 2010).

Específicamente, la cápsula se compone de unidades de oligosacáridos que aglomeran en unidades de dos a diez monosacáridos repetidos, siendo ésta muy importante para la patogénesis. Los componentes antigénicos de la cápsula varían dependiendo la cepa y permiten agrupar a *S. pneumoniae* en más de 100 serotipos. La variabilidad antigénica capsular de *S. pneumoniae* expone una idea de la alta incidencia y severidad de las infecciones por este neumococo. Una función primordial de la cápsula en las bacterias es resguardarse de las interacciones con los mecanismos del sistema inmune del huésped. En la neumonía y bacteriemia, se ha observado que la cápsula es esencial para evitar la opsonización, lo que permitirá el éxito de la infección; por lo que la cápsula también está considerada como un elemento de factor de virulencia en neumococos (Evans, 2022).

#### 7.2.3.4 Factores de virulencia

El factor de virulencia es una molécula que produce el patógeno, la cual influirá en la célula hospedera, lo que hará que el patógeno se vea favorecido en su crecimiento y supervivencia durante la infección, este puede ser de origen proteico, por ejemplo, una enzima que se encuentre en la superficie o puede ser una secreción por *S. pneumoniae*. Este factor de virulencia favorece significativamente al proceso de infección y a la patogénesis (Kadioglu *et al.*, 2008).



**Figura 3. Representación esquemática de los principales factores de virulencia de *S. pneumoniae*.** Se muestran los diferentes factores de virulencia de *S. pneumoniae* con su respectiva localización en la bacteria (cápsula, pared celular, membrana celular y citoplasma). La cápsula se muestra como una capa marrón, donde los polisacáridos están representados como estructuras ramificadas. De izquierda a derecha: serín proteasa (PrtA), adhesina A de superficie neumocócica (PsaA), factor A de virulencia y adherencia neumocócica (PavA), proteína A de superficie neumocócica (PspA), hialuronato liasa (HylA), proteína C de superficie neumocócica (PspC), Neuraminidasa A (NanA), Neumolisina (Ply) y Autolisina (LytA). También se muestran los componentes de la pared celular: ácido lipoteicoico (LTA) y ácido teicoico (TA). La alteración de la membrana y la pared celulares mediada por LytA permite la liberación de Ply al medio extracelular (Nieto *et al.*, 2013).

La patogenicidad bacteriana de *S. pneumoniae* es la capacidad para provocar la enfermedad en el hospedero susceptible. La patogenicidad de este neumococo se ha asociado a varios mecanismos, tanto de la cápsula que aportaría los factores estructurales de virulencia y los factores secretados. Este conjunto de factores de virulencia necesita ser expresado de manera coordinada para una exitosa invasión tisular. La adherencia del neumococo a las células del tracto nasofaríngeo involucra múltiples factores. El primero se denomina efecto puente y se lleva a cabo entre las

proteínas de unión a colina, de la pared bacteriana, a las colinas y carbohidratos en la superficie de las células epiteliales del hospedero. Esta unión es apoyada por receptores adicionales expuestos por la actividad de la neuraminidasa, infecciones virales previas o la activación de citoquinas mediada por la neumolisina de *S. pneumoniae*. Así mismo se suman aquellas debilidades en el hospedero, ya que *S. pneumoniae* es considerada una bacteria oportunista y aprovecha aquellos momentos más susceptibles, es así como el conjunto nos dé una alta morbilidad y mortalidad causada por este microorganismo (Kadioglu *et al.*, 2008; Weiser *et al.*, 2018).

En un hospedero sano, al aspirar secreciones que contienen a *S. pneumoniae*, normalmente la bacteria se elimina con rapidez, esto gracias a los mecanismos de defensa de las vías respiratorias inferiores, incluyendo la tos, los reflejos de la epiglotis, la “capa” mucociliar y la fagocitosis de los macrófagos alveolares. Sin embargo, los hospedadores que alteran la eficiencia de estas defensas consienten que los neumococos lleguen a los alvéolos y proliferen; estas alteraciones pueden ser desde enfermedades pulmonares crónicas, daño al epitelio bronquial por el tabaquismo o la contaminación ambiental, disfunción respiratoria causada por alcoholismo, el uso de drogas, anestesia y/o traumatismo (Kadioglu *et al.*, 2008).

Una vez que *S. pneumoniae*, se encuentra en el alveolo, los factores de virulencia proceden en dos etapas. En la primera etapa, gracias a la cápsula se puede evitar la fagocitosis, lo que permite que *S. pneumoniae* pueda proliferar y propagarse. En la segunda etapa, el neumococo comienza a disociarse y libera factores de virulencia que le permiten atravesar y al torrente sanguíneo (Weiser *et al.*, 2018).

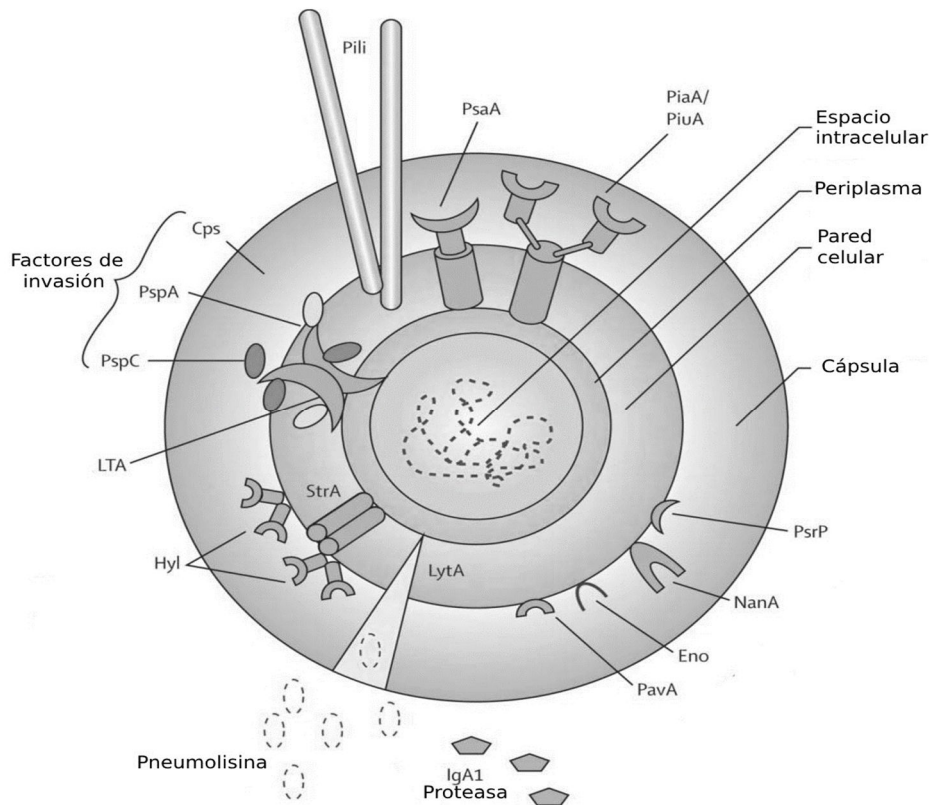
### 7.2.3.5 Factores de virulencia y su localización en *S. pneumoniae*

Los factores de virulencia en *S. pneumoniae*, se encuentran ubicados en toda la superficie del neumococo, así como a diferentes niveles, algunos son secretados para poder facilitar la colonización y generar la infección en el hospedero.

**Tabla 1. Principales factores de virulencia de *S. pneumoniae* que intervienen en su patogenicidad (Short y Diavatopoulos, 2015; Morimura *et al.*, 2021).**

Factores de virulencia del neumococo	Función principal
Autolisina ( <b>LytA</b> )	Es una enzima capaz de hidrolizar la capa de peptidoglicano de neumococo, permitiendo la liberación de su contenido citoplasmático en la célula blanco. De esta manera es posible que otras bacterias viertan su contenido en la célula blanco y puedan iniciar la infección.
Neumolisina ( <b>Ply</b> )	Es una toxina que se encuentra en el citoplasma y es liberada debido a la acción de la autolisina. Ply se puede añadir a la membrana celular del hospedero por medio de receptores de colesterol, donde se polimeriza hasta formar canales

Neumolisina ( <b>Ply</b> )	transmembranales que anteceden a la lisis a través de la formación de poros. También inhibe la respuesta proliferativa de los linfocitos, lo cual indica que es parte importante de la capacidad invasiva y de la virulencia de <i>S. pneumoniae</i> .
Neuraminidasa	Es una enzima asociada a la pared neumocócica, separa el ácido siálico terminal de las glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos presentes en la superficie de las células del hospedero; esta separación facilita la adhesión del neumococo a las células epiteliales del hospedero, es importante en la diseminación y multiplicación de <i>S. pneumoniae</i> en los tejidos infectados.
Hialuronidasa	Se expresa en la superficie de <i>S. pneumoniae</i> y es esencial para facilitar a la diseminación e invasión de neumococo en el tejido tisular mediante la degradación del componente ácido hialurónico de la matriz extracelular.
Proteína de superficie de unión a colina A ( <b>CbpA</b> ) o Proteína C de superficie neumocócica ( <b>PspC</b> )	Se expresa en la superficie de <i>S. pneumoniae</i> y reconoce un dominio colina en la IgA y la proteína C3 del complemento, evadiendo así la acción del sistema inmune.
Neuraminidasa A ( <b>NanA</b> ), $\beta$ galactosidasa A ( <b>BgaA</b> ) y Nacetilhexosaminidasa expuesta de superficie ( <b>StrH</b> )	Son enzimas que actúan de manera secuencial para escindir los azúcares terminales de las glicoproteínas de las células hospederas, de esta manera se exponen receptores de la célula hospedera para la adherencia e invasión neumocócica.
Hialuronato liasa ( <b>Hyl</b> )	Es capaz de invadir al hospedero por la desestabilización de la membrana, degradando los componentes de la matriz extracelular de la célula hospedera.
Proteína de superficie A ( <b>PspA</b> )	Evade al sistema inmune porque evita la unión componente C3 del complemento en la superficie neumocócica, evitando el reconocimiento del sistema inmune.
Adhesina de superficie A ( <b>PsaA</b> )	Es componente del sistema de transporte ABC, que está implicado en la resistencia al estrés oxidativo. Evita que la bacteria sea dañada por radicales libres generados por las células alveolares.
Cápsula	Es considerado como el factor más importante en la colonización, debido a que facilita la interacción con el moco nasal, permitiendo así el acceso a las superficies epiteliales. Adicionalmente también inhibe el reconocimiento por el sistema inmune.



**Figura 4. Localización de los factores de virulencia de *S. pneumoniae*.** PsaA= Antígeno de superficie A. PiaA/PiuA= Proteínas de adquisición y absorción de hierro. PsrP= Proteína rica en serina. NanA= Neuraminidasa. Eno= Enolasa. PavA= Adhesión y virulencia neumocócica. LytA= autolisina. StrA= sortasa A. Hyl= Hialuronato liasa. LTA= ácido lipoteicoico. PspC= proteína de superficie C. PspA= proteína de superficie A. Cps= polisacárido de cápsula. PAF= factor de agregación plaquetaria (Johnson, 2017).

La virulencia de *S. pneumoniae* se atribuye al conjunto de los factores de virulencia, principalmente a la combinación de los factores de la superficie y las disminuciones del hospedero. Así también los factores de virulencia, como la cápsula y las proteínas de la superficie de esta, pueden determinar la resistencia a la fagocitosis y la resistencia al sistema inmunológico del hospedero (Alghory *et al.*, 2023).

#### 7.2.4 Patogenia

La colonización nasofaríngea es el primer paso en la aparición de las enfermedades neumocócicas. Una vez que la bacteria se establece en la nariz y la garganta, puede diseminarse a otras partes del cuerpo, como el oído medio, el tracto respiratorio inferior o el torrente circulatorio, lo que puede provocar otitis media, neumonía o sepsis, respectivamente. Además, el neumococo puede atravesar la barrera hematoencefálica y causar meningitis, lo que puede tener graves consecuencias neurológicas. La neumonía, sepsis o meningitis causada por neumococos se consideran enfermedades neumocócicas invasivas y tienen una alta mortalidad, incluso tratándose con antibióticos. La relación entre el patógeno y el hospedador, así como el papel de la microbiota, es importante para comprender cómo se

establecen las enfermedades neumocócicas invasivas. En el proceso de patogénesis de las enfermedades neumocócicas se pueden diferenciar en tres etapas: colonización, invasión y enfermedad (Li *et al.*, 2023).

#### 7.2.4.1 Colonización

La colonización de *S. pneumoniae* del tracto respiratorio superior, es un proceso asintomático, previo a la infección. Este paso regularmente también lo podemos conocer como estadio de portación y tiende a ser largo para *S. pneumoniae*, ya que recordemos es una bacteria oportunista, sin embargo, este estado es el principal constituyente de la transmisión de *S. pneumoniae* (Short y Diavatopoulos, 2015).

En la colonización la adhesión del neumococo al epitelio es crucial para su persistencia en la nasofaringe. Esta adhesión se logra en gran medida a través de interacciones específicas entre *S. pneumoniae* y el hospedador. Como se mencionó anteriormente, la cápsula es uno de los principales factores de virulencia que influyen en la capacidad de adhesión del neumococo. Se ha demostrado que, en presencia de anticuerpos anticapsulares, la adhesión a la nasofaringe se reduce, lo que sugiere que la cápsula se expresa y es necesaria en este ambiente para la colonización. Sin embargo, también se ha observado que la presencia de grandes cantidades de cápsula inhibe la adhesión del neumococo. Por lo tanto, la regulación de la expresión de la cápsula es fundamental para el éxito de la colonización nasofaríngea del neumococo (Weiser *et al.*, 2018).

Para efectuar la colonización *S. pneumoniae* expresa exoglicosidasas como NanA, BgaA y StrH, las cuales son crucial para la colonización nasofaríngea del neumococo. Estas enzimas actúan de manera secuencial sobre diferentes residuos glicosilados, eliminando los residuos de ácido siálico, galactosa y N-acetilglicosamina, la eliminación de estos residuos glicosilados permite que los receptores glicosilados sean accesibles para *S. pneumoniae*, lo que facilita el proceso de adhesión del neumococo a las células del epitelio (Short y Diavatopoulos, 2015). Además, existen proteínas como PavA y PavB que juegan un papel importante en este proceso de adhesión. Estas proteínas tienen una alta afinidad por la unión con fibronectina y plasminógeno, lo que les permite unirse a la matriz extracelular y facilitar la adhesión del neumococo a las células del epitelio. En resumen, tanto la expresión de exoglicosidasas como la presencia de proteínas de adhesión son esenciales para la colonización nasofaríngea del Neumococo. Otro grupo de proteínas con un papel importante en la colonización son las que tienen actividad proteasa, como HtrA, y otras de la superficie bacteriana, como PspC, CbpG, BgaC, o las hidrolasas de pared celular LytB, LytC y Pce (Kadioglu *et al.*, 2008).

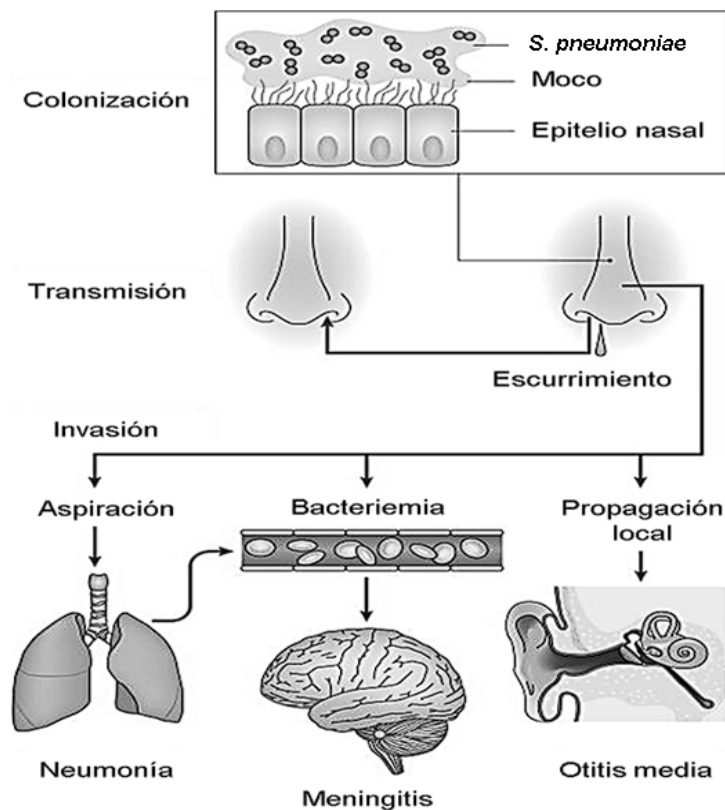
El factor externo también juega un papel muy importante, un ejemplo es una infección viral la cual incrementa la posibilidad de colonización. Esto porque las infecciones virales causan pérdida de la integridad del epitelio respiratorio, incrementa la secreción de citoquinas proinflamatorias y por tanto el aporte de

nutrientes lo que facilitará el crecimiento del *S. pneumoniae* y su migración a vías inferiores. El paso de colonización a la invasión es un proceso que va a depender de factores derivados tanto del neumococo como del huésped y de factores ambientales (Weiser *et al.*, 2018).

#### 7.2.4.2 Invasión

Este proceso es una manera de diseminación de *S. pneumoniae*, la invasión puede iniciar desde el sitio de colonización que normalmente es la nasofaringe hasta el torrente sanguíneo. Hay varios mecanismos que permiten a *S. pneumoniae* atravesar el epitelio, los cuales únicamente mencionaremos ya que desarrollarlos podría no representar la finalidad de esta tesis. Los más estudiados son el mecanismo mediado por el factor de activación plaquetario (rPAF), el mecanismo de unión a la proteína PspC al fragmento plgR y por último el mecanismo de unión plasminógeno (Kadioglu *et al.*, 2008).

Tanto la colonización e invasión dependen de la importante capacidad de *S. pneumoniae* para evadir o aprovechar las respuestas inflamatorias e inmunes del huésped, sin embargo, la finalidad es la misma, logran la diseminación del neumococo.



**Figura 5. Ciclo de vida de *S. pneumoniae* en el huésped y patogénesis de la enfermedad neumocócica.** *S. pneumoniae* coloniza la mucosa del tracto respiratorio superior, lo que es un requisito para la transmisión a otros huéspedes, así como para causar alguna de las enfermedades invasivas en el portador (Weiser *et al.*, 2018).

### **7.2.4.3 Enfermedades que provoca *S. pneumoniae***

Este estreptococo causa infección de las vías respiratorias superiores, asociándose a otitis media y sinusitis, así como a las infecciones respiratorias en las vías respiratorias inferiores asentándose en tráquea y pulmón. También puede transferirse por diseminación hematógena provocando meningitis, endocarditis, artritis y peritonitis (Short y Diavatopoulos, 2015).

#### **7.2.4.3.1 Otitis media aguda**

La otitis media aguda es la causa más frecuente de consultas médicas entre los infantes menores de 3 años. Esta incidencia va reduciéndose en menor proporción conforme el infante crece, donde apenas y se presenta después de los 5 a los 6 años o en adolescentes o mayores de edad (Ramírez *et al.*, 2015).

La otitis media aguda es una entidad infecciosa, que se ve favorecida por la reducción de la trompa de Eustaquio, esto es a causa de la congestión de la mucosa orofaríngea durante procesos agudos de las vías respiratorias superiores, provocando catarro común o faringoamigdalitis aguda. Los signos y síntomas son la otalgia intensa, otorrea purulenta y pérdida de la audición, presentándose también con fiebre, vértigo o nistagmos, lo que se hace suficiente para dar un diagnóstico de otitis media aguda (Ruvinsky, 2001).

Para *S. pneumoniae*, ya sea en asociación a una infección viral o por independiente, es la bacteria más frecuente asociada a otitis media aguda en muestras obtenidas de niños o adultos. En caso de no tratarse la infección, la otitis media aguda se extenderá localmente y puede solo ocasionalmente complicarse gravemente en forma de mastoiditis aguda o afectar los procesos intracraneales con abscesos cerebrales, meningitis o trombosis en los senos venosos (Kadioglu *et al.*, 2008).

#### **7.2.4.3.2 Rinosinusitis aguda**

La sinusitis aguda causa inflamación e hinchazón de los espacios dentro de la nariz (senos paranasales). Esto altera el proceso de secreción y provoca la acumulación de mucosidad. Respirar por la nariz puede resultar difícil debido a la sinusitis aguda. La región que rodea los ojos y la cara puede sentirse hinchada, acompañada de dolor facial punzante o cefaleas. La sinusitis aguda causa inflamación e hinchazón de los espacios dentro de la nariz (senos paranasales). Esto altera el proceso de secreción y provoca la acumulación de mucosidad. Respirar por la nariz puede resultar difícil debido a la sinusitis aguda. La región que rodea los ojos y la cara puede sentirse hinchada, acompañada de dolor facial punzante o cefaleas (Weiser *et al.*, 2018).

#### **7.2.4.3.3 Neumonía**

La neumonía es una enfermedad que puede afectar a los lóbulos pulmonares, esto es bien conocido como neumonía lobular, también puede afectar los bronquios llamada bronconeumonía o en pocas situaciones puede llegar al tejido intersticial llegando a conocerse como neumonía intersticial. En un paciente con neumonía el

tejido que es parte de los pulmones se inflama, se llena de líquido y esto convierte a la enfermedad en algo muy doloroso (Dockrell *et al.*, 2015).

En la infección pulmonar por neumococo, se secreta una citotoxina, llamada neumolisina, que es capaz de formar poros en las membranas celulares alveolares, no sólo mediante la lisis de las membranas celulares del hospedero, sino también mediante la inhibición de los latidos mucociliares de las células epiteliales, además de la pérdida de las uniones estrechas. Esta modificación de la interacción influye en la penetración de *S. pneumoniae* en las células dendríticas y evita la apoptosis de las células del hospedero ya que inhibe la secreción de las citoquinas, lo que le permite al neumococo poder cumplir su objetivo en el hospedero (Evans, 2022).

#### **7.2.4.3.4 Bacteriemia**

La bacteriemia es la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo. Puede producirse espontáneamente o durante la infección de determinados tejidos. Durante la bacteriemia, la cápsula neumocócica es el elemento más importante durante su desarrollo, esto es debido a que esta le permite evadir el sistema inmune, inhibiendo la vía del complemento. Esta inhibición puede tener diferentes dimensiones dependiendo el serotipo de neumocócico (Dockrell *et al.*, 2015).

#### **7.2.4.3.5 Meningitis**

La meningitis estreptocócica es una inflamación aguda y purulenta de las membranas que rodean el cerebro y la médula espinal. Esta ocurre cuando las bacterias ingresan al torrente sanguíneo y luego cruzan la barrera hematoencefálica o por contacto directo de las meninges con la piel o la cavidad nasal. El foco más frecuente de infección es la nasofaringe colonizada por *S. pneumoniae* que evade el sistema inmunológico del huésped. El torrente sanguíneo resulta invadido y se activan los sistemas del complemento y de la coagulación. Los mediadores inflamatorios se liberan masivamente, lo que facilita que las bacterias atraviesen la barrera hematoencefálica. La inflamación es responsable de todos los signos típicos de la meningitis bacteriana, es decir, la pleocitosis (Ruvinsky, 2001).

#### **7.2.5 Epidemiología**

Las infecciones neumocócicas se transmiten de persona a persona a través de los aerosoles y la colonización nasofaríngea, que es un requisito previo para la enfermedad neumocócica. La tasa de portación alcanza su punto máximo alrededor de los 2 a 3 años y luego disminuye a tan solo el 10% de la población adulta. Sin embargo, los adultos con niños pequeños en casa pueden tener una tarifa de transporte más alta. *S. pneumoniae* ingresa a la cavidad nasal y se adhieren a las células epiteliales nasofaríngeas y luego pueden permanecer como colonizadoras o extenderse a otros órganos, como los oídos, los senos nasales o a través de los bronquios hasta los pulmones y luego potencialmente penetrar la barrera mucosa para ingresar al torrente sanguíneo y/o cruzar la barrera hematoencefálica para causar meningitis (Ramírez *et al.*, 2015). El seguimiento de la propagación global o local de los neumococos se realiza habitualmente mediante la serotipificación del

polisacárido capsular. Hasta el momento, se han descrito al menos 93 estructuras/serotipos capsulares diferentes. Ciertos serotipos se encuentran con mayor frecuencia en niños pequeños, como los tipos 6B, 9V, 14, 19F y 23F. Una comparación de aislados de enfermedades invasivas y aislados portadores de la misma región durante el mismo período sugiere que la virulencia difiere según el serotipo capsular. Algunos serotipos, como el 1 y el 7F, son más prominentes en la enfermedad invasiva (tienen un alto potencial de enfermedad invasiva), mientras que otros tipos participan principalmente en el transporte. Sin embargo, sólo los serotipos raros causan únicamente transporte. Los pacientes infectados con serotipos con un bajo potencial de enfermedad invasiva tenían con mayor frecuencia una enfermedad subyacente antes de la infección neumocócica en comparación con los pacientes infectados con serotipos con un alto potencial de enfermedad invasiva. Sin embargo, las tasas de mortalidad más altas se encontraron en pacientes infectados con serotipos de menor potencial de enfermedad invasiva, como los tipos 3, 6B y 19F (Li *et al.*, 2023).

### **7.2.6 Diagnóstico**

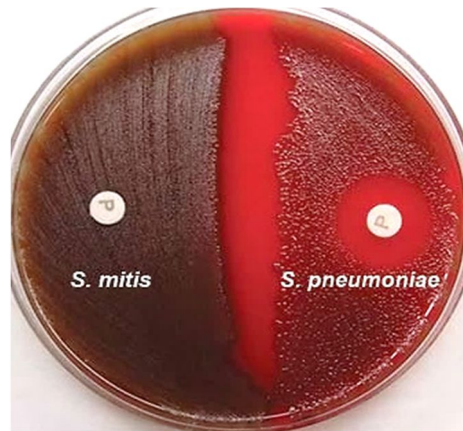
Con el objetivo de identificar al agente etiológico, responsables del proceso infeccioso y para conocer las implicaciones patogénicas/patológicas, así como para aplicar un diagnóstico eficaz para la infección por *S. pneumoniae*; la microbiología clínica es un pilar fundamental, el origen de constituir la asignación de una especie al aislamiento microbiano. La microbiología clínica es la práctica rutinaria diaria del diagnóstico, los laboratorios de microbiología aplican técnicas fenotípicas que permiten lograr este objetivo, sin embargo, en algunos casos más especiales muestran algunas limitaciones. Las situaciones atípicas son cubiertas por técnicas más precisas, entre las que encontramos los métodos moleculares, que permiten remediar algunas de estas limitaciones, a comparación de los métodos clásicos microbiológicos (Sotillo *et al.*, 2014; Loughran *et al.*, 2019).

#### **7.2.6.1 Pruebas microbiológicas de identificación para *S. pneumoniae***

Las pruebas microbiológicas de identificación son herramientas esenciales en la identificación y caracterización de diferentes tipos de microorganismos infecciosos para el ser humano. Por lo tanto, la identificación temprana y precisa de *S. pneumoniae* es fundamental para su tratamiento, así como para evitar la propagación de la enfermedad que cause. En este texto, discutiremos algunas de las pruebas microbiológicas más comunes utilizadas para identificar específicamente *S. pneumoniae* (Blaschke, 2011).

### 7.2.6.1.1 Prueba de sensibilidad a la optoquina

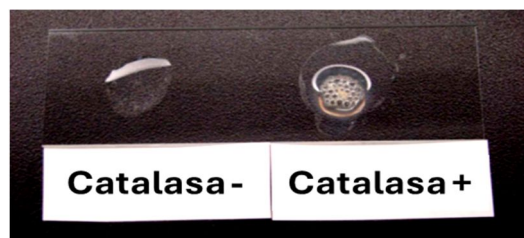
En esta prueba se utiliza un disco de papel absorbente, el cual está impregnado con 5 µg de etilhidroxicupreína (optoquina), posteriormente este disco se coloca en la superficie de una placa de agar, la cual previamente tiene un sembrado de *S. pneumoniae*, al paso del tiempo con el crecimiento del cultivo, nos percatamos de la formación de una aureola donde no hay crecimiento de la bacteria, alrededor del disco de optoquina, lo cual nos indicará la sensibilidad por parte de *S. pneumoniae* (Prado, 2001).



**Figura 6. Prueba de sensibilidad a la optoquina.** Resultado de la prueba de optoquina (etilhidroxicupreína), utilizada para confirmar la presencia de la bacteria *S. pneumoniae*, que es sensible a la optoquina. De este modo, *S. pneumoniae* puede diferenciarse de otros organismos estreptocócicos alfa-hemolíticos, como *S. mitis*, que son resistentes. El resultado revela que *S. pneumoniae* sensible a la optoquina estaba presente en la derecha, dada la zona de inhibición alrededor del disco de optoquina, mientras que las bacterias resistentes a la optoquina en la izquierda crecieron sin inhibiciones hasta el borde del disco. (Recopilación de la Biblioteca de imágenes de salud pública (PHIL), con número de identificación n.º19332. Esta imagen es de dominio público y, por lo tanto, está libre de restricciones de derechos de autor)

### 7.2.6.1.2 Prueba de la actividad de la catalasa

La catalasa es una enzima que está presente en la mayoría de los microorganismos que tienen citocromos. Aquellas bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso, el cual es liberado en forma de burbujas visibles a simple vista. Sin embargo, en el caso de *S. pneumoniae* no se cuenta con esta enzima, por lo tanto, al aplicar esta prueba, debemos obtener un resultado negativo para dicho neumococo (Bou *et al.*, 2011).

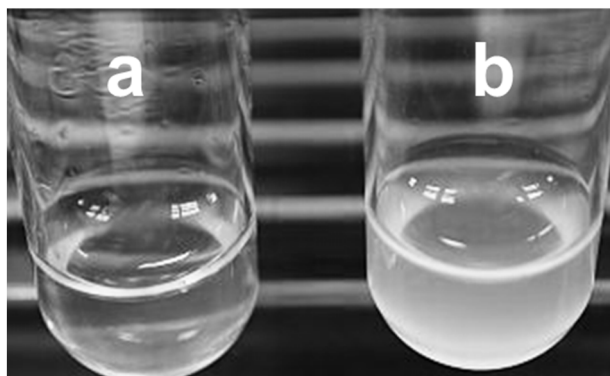


**Figura 7. Resultados negativos y positivos de la prueba de Catalasa.** Del lado izquierdo del portaobjetos se muestra a *S. pneumoniae* con un resultado negativa para esta prueba, mientras que del lado derecho se observa un portaobjetos con *S. aureus* la cual es una bacteria que tiene un

resultado positivo a esta prueba. (Recopilación de la Biblioteca de imágenes de salud pública (PHIL), con número de identificación n.º1921. Esta imagen es de dominio público y, por lo tanto, está libre de restricciones de derechos de autor)

### 7.2.6.1.3 Prueba de la sensibilidad a la bilis

*S. pneumoniae* tiene una enzima autolítica intracelular, esta enzima es una amidasa, la cual lisa la pared celular durante la división. Al añadir desoxicolato de sodio (sales biliares) esta enzima y se produce la autólisis del microorganismo. La prueba de solubilidad de la bilis es un método preciso y técnicamente no exigente para identificar a *S. pneumoniae* (Bou *et al.*, 2011).



**Figura 8. Prueba de solubilidad en bilis.** a) Del lado izquierdo se observa una muestra de *S. pneumoniae* sometida a esta prueba, por lo que se ha eliminado la turbidez del medio que se observa al suspender a la bacteria en una solución líquida. b) Del lado derecho se colocó una muestra de una bacteria negativa a la prueba de solubilidad en bilis, por lo que se nota la turbidez en el medio. (Recopilación de la Biblioteca de imágenes de salud pública (PHIL), con número de identificación n.º1823. Esta imagen es de dominio público y, por lo tanto, está libre de restricciones de derechos de autor)

**Tabla 2. Características de las técnicas de identificación microbiológica de *S. pneumoniae*.**

Método de identificación	Ventajas	Desventajas	Tiempo para obtener resultados
<b>Catalasa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Económicas.</li> <li>Los reactivos son fáciles de obtener.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Poco específica.</li> <li>La enzima está presente sólo en cultivos viables.</li> <li>Los cultivos mal manejados pueden dar resultados falsos negativos.</li> </ul>	10-20 s a partir de un cultivo bacteriano (18-24 h).
<b>Optoquina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Son sencillas de realizar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Existen cepas de <i>S. pneumoniae</i> resistentes a la optoquina.</li> <li>Un porcentaje elevado de cepas no capsuladas tienen sensibilidad intermedia.</li> </ul>	De 18-24 h a partir de un cultivo bacteriano.
<b>Solubilidad en bilis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Obtenemos resultados fáciles de interpretar.</li> </ul>	La prueba no debe realizarse con cultivos antiguos, ya que la actividad enzimática podría perderse.	2 h a partir de un cultivo bacteriano (18-24h).

### **7.2.6.2 Pruebas moleculares de identificación de *S. pneumoniae***

Las pruebas moleculares son herramientas avanzadas que permiten la identificación precisa de los microorganismos en muestras clínicas o en cepas aisladas. Al ser utilizadas para *S. pneumoniae*, estas pruebas ayudan al diagnóstico rápido y efectivo de las enfermedades respiratorias que causa este neumococo, como la neumonía y la otitis media. Al utilizar estas herramientas se nos permite una identificación con mayor precisión y rapidez, a diferencia de las pruebas microbiológicas. Entre las tecnologías moleculares utilizadas destacan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tanto en tiempo real como convencional, la secuenciación de ADN y los microarreglos. Estas metodologías nos permiten la identificación exacta de *S. pneumoniae*, ya que basan su funcionamiento en las secuencias específicas de ADN que son únicas de esta bacteria (Evans, 2022).

#### **7.2.6.2.1 Reacción en cadena de la Polimerasa**

La PCR es una de las técnicas de diagnóstico moleculares que se utilizan con más frecuencia, de todas las técnicas moleculares. Esto se debe a que se cuenta con un protocolo estandarizado que es rápido y de fácil uso para el personal especializado. Generalmente la PCR requiere de 2 a 4 h, para poder proporcionarnos un resultado que indique la presencia de *S. pneumoniae*. En la actualidad existen diferentes kits que facilitan el proceso de identificación mediante PCR de *S. pneumoniae*, pero se requiere de personal especializado para la manipulación del ADN y la interpretación de los resultados (Short y Diavatopoulos, 2015).

Esta metodología requiere de utilizar un termociclador, en donde el ADN genómico de *S. pneumoniae* se utiliza como molde para la amplificación por PCR de una secuencia del ARNr 16S. Para esto se utilizan cebadores universales o complementarios a las regiones conservadas, por lo que se amplificaba únicamente el gen del ARNr 16S de *S. pneumoniae* en la que los cebadores hibriden, permitiéndonos identificar la presencia de *S. pneumoniae* en el hospedero. Las ventajas de la PCR para la detección de *S. pneumoniae* en comparación con otros métodos de detección incluyen su alta especificidad, la velocidad y la precisión en la detección del patógeno. Sin embargo, como cualquier técnica, tiene desventajas y limitaciones, como una alta tasa de falsos positivos, debido a la contaminación de la muestra (Silva-Costa *et al.*, 2023).

#### **7.2.6.2.2 Secuenciación**

La tecnología de secuenciación de ácidos nucleicos ha dado pasos increíbles en los últimos diez años. Con esta tecnología, los genomas pueden ser completamente secuenciados en poco tiempo (meses, semanas o hasta horas), en lugar de años, debido a que las nuevas metodologías para hacer secuenciación no requieren bibliotecas de ADN, sólo los ácidos nucleicos aislados. El uso de la secuenciación ha ampliado la recopilación de los genomas bacterianos secuenciados, lo que ha ayudado a identificar los agentes potenciales, bacterianos. Esta técnica es muy efectiva en la identificación precisa y la caracterización de las cepas de *S. pneumoniae*, lo que permite una mejor comprensión de su papel en la enfermedad

y su respuesta a los tratamientos. En la identificación bacteriana la secuenciación del ARNr 16S es la herramienta más utilizada, como marcador en la mayoría de las bacterias, este se presenta como una familia de múltiples genes cuya función no se modifica con el tiempo y por lo que actúa como un marcador eficiente. El ARNr 16S es útil para la detección de *S. pneumoniae*, ya que proporciona información elemental y rápida para la identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas (Ramírez *et al.*, 2015).

Las ventajas de la secuenciación para la detección de *S. pneumoniae* en comparación con otros métodos de detección incluyen su alta especificidad y sensibilidad, lo que permite identificar la presencia de la bacteria y de variantes genéticas específicas. Además, la secuenciación permite una caracterización detallada de la bacteria, incluyendo su resolución genética, los perfiles de resistencia a los antimicrobianos, la detección de cepas multirresistentes y la evaluación de la prevalencia de patógenos específicos en poblaciones humanas. Sin embargo, como cualquier técnica, tiene algunas desventajas, un alto costo y la necesidad de equipos especializados y experiencia técnica (Evans, 2022).

#### **7.2.6.2.3 Microarreglos**

Los microarreglos son una poderosa herramienta de análisis de expresión de genes, debido al mayor número de sondas que se pueden analizar al mismo tiempo y tienen grandes ventajas sobre otras técnicas, en la detección de *S. pneumoniae*, las sondas moleculares están diseñadas para detectar regiones específicas del genoma de la bacteria. Esta técnica se realiza en varias etapas, en la primera etapa, se extrae y amplifica el ADN de la muestra clínica, que puede ser sangre, líquido cefalorraquídeo o exudado faríngeo. En la segunda, se deja hibridar el ADN amplificado con las sondas específicas impresas en la superficie de la microplaca. Para que finalmente, se analice la fluorescencia de las uniones, lo que determina la presencia de moléculas específicas de *S. pneumoniae* en la muestra (Ramírez *et al.*, 2015).

Las ventajas de los microarreglos en comparación con otros métodos de detección es su alta especificidad y sensibilidad en la detección de determinadas sondas moleculares específicas. Además, los microarreglos permiten la detección simultánea de múltiples objetivos, lo que ahorra tiempo y es más eficiente. No obstante, el proceso de microarreglos puede ser costoso, requiere un alto nivel de experiencia técnica (Le *et al.*, 2023).

**Tabla 3. Características de las técnicas de identificación moleculares de *S. pneumoniae* (Ramírez et al., 2015).**

Método de identificación	Ventajas	Desventajas	Tiempo para obtener resultados
<b>PCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bajas cantidades de muestra</li> <li>- No depende de la viabilidad de la muestra</li> <li>- Alta especificidad y sensibilidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Alta tasa de falsos</li> <li>-Requiere de personal especializado</li> <li>-Costo alto</li> <li>-Dificulta ensayos múltiples</li> </ul>	2 a 4 h
<b>Microarreglos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bajas cantidades de muestra</li> <li>- No depende de la viabilidad de la muestra</li> <li>- Alta especificidad y sensibilidad</li> <li>- Análisis de múltiples objetivos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Requiere de personal especializado</li> <li>-Costo alto</li> <li>-Solo laboratorios de referencia</li> <li>- No distingue viabilidad en la muestra</li> </ul>	4 a 6 h
<b>Secuenciación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bajas cantidades de muestra</li> <li>- No depende de la viabilidad de la muestra</li> <li>- Alta especificidad y sensibilidad</li> <li>Identificación</li> <li>-Caracteriza a la bacteria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Requiere de personal especializado</li> <li>-Costo alto</li> <li>-Solo laboratorios de referencia</li> <li>-Preparación de las muestras</li> </ul>	7 a 12 h

Los métodos moleculares presentan algunas desventajas en comparación con los métodos de cultivo. En primer lugar, aún no son ampliamente utilizados en la práctica diaria, lo que limita su relevancia en ciertas situaciones. Además, su uso puede ser costoso, ya que requiere equipos y reactivos que pueden ser caros en comparación con los métodos de cultivo. Estas técnicas también pueden ser complicadas, requieren un alto nivel de experiencia y utilizan productos químicos peligrosos, lo que puede dificultar su uso rutinario para la detección de varias muestras. Debido a la falta de protocolos estandarizados y la variabilidad en la calidad de los equipos y reactivos, su adopción como herramienta de diagnóstico es desafiante, particularmente para usuarios no especializados en laboratorios (Li *et al.*, 2023).

### **7.2.6.3 El futuro para la identificación de *S. pneumoniae***

En la última década, el desarrollo de nuevas técnicas ha revolucionado la identificación de patógenos, incluyendo *S. pneumoniae*. Durante mucho tiempo, la identificación de este patógeno y otros dependió de técnicas microbiológicas clásicas y cultivo en medios selectivos. Aunque estos métodos son útiles, todavía

presentan algunas limitaciones, como el alto tiempo para obtener un resultado y la posibilidad de obtener resultados inexactos. Por lo tanto, los métodos de identificación requieren evolucionar hacia la incorporación de técnicas moleculares (Evans, 2022).

La PCR es una técnica molecular cada vez más utilizada para la detección de *S. pneumoniae* y muchos otros patógenos en muestras de pacientes. La técnica de PCR se basa en la amplificación específica e in vitro de ADN lo permite la detección precisa del patógeno. Además, técnicas como la secuenciación y los microarreglos también se utilizan cada vez con mayor frecuencia para la identificación de patógenos. Si bien sabemos que estas técnicas moleculares son muy útiles, todavía presentan algunas desventajas, como el alto costo, la complejidad técnica, la necesidad de equipos y personal especializados. Por lo tanto, el desarrollo de tecnologías como los biosensores parece ser una buena perspectiva para la identificación de patógenos, incluyendo a *S. pneumoniae* (Prado, 2010).

Los biosensores son dispositivos molecularmente diseñados que permiten la detección específica y en tiempo real de microorganismos y sustancias en muestras clínicas. Los biosensores utilizan técnicas avanzadas de detección, como la amplificación molecular, y pueden ser diseñados para detectar microorganismos o cepas específicas. Además, los biosensores presentan como ventaja la facilidad de uso que las técnicas moleculares existentes no pueden, así como pueden reducir el costo de la identificación del patógeno en tiempo real (Sotillo *et al.*, 2014).

## **8. Antecedentes particulares**

### **8.1 Biosensores**

Recientemente, los métodos basados en biosensores han irrumpido de manera importante en el campo del diagnóstico microbiológico, lo cual tiene sin duda un gran impacto en la organización futura de los servicios de microbiología; ya que representan alternativas precisas, como las técnicas moleculares, teniendo la peculiaridad de permitirnos un costo económico similar a las técnicas microbiológicas tradicionales; las ventajas más apreciadas en los biosensores es su característica por tener una alta tasa de seguridad, por su peculiar ahorro de tiempo, así como su fácil manipulación (Perumal *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2022).

En concreto un biosensor es un dispositivo que cuenta con un receptor biológico (anticuerpo, enzima, ácido nucleico o carbohidrato) y un transductor, el cual está integrado y convierte la respuesta biológica en una señal cuantificable, señal que es encendida al momento que el bioreceptor interactúa con la molécula de interés (analito), lo que proporciona la señal útil para el transductor (Mehrotra, 2016; Babaei *et al.*, 2022). Así mismo es importante aclarar que un biosensor se diseña de acuerdo con las necesidades que requiere cada situación, esto es lo que

determinará los elementos que conforman a cada biosensor (Hegde *et al.*, 2022). Actualmente el diseño y el desarrollo de biosensores, ocupa un gran interés en una alta gama de aplicaciones, desde la dedicación al ámbito médico y el diagnóstico de enfermedades, pasando por el monitoreo del ambiente, la calidad del agua y alimentos, llegando hasta a la detección de elementos inertes (Kadadou *et al.*, 2022). Los principales desafíos para el desarrollo de los nuevos biosensores son:

1) La captura eficiente de la señal de reconocimiento biológico, la transformación de esta señal en una medición cuantificable que permita interpretar el resultado, como una señal eléctrica, óptica, gravimétrica o acústica (esto es lo que llamamos el proceso de transducción).

2) Mejorar el rendimiento de la señal transducida o, acrecentar la sensibilidad y la reproducibilidad, así como disminuir el tiempo de respuesta o los límites de detección, para revelar incluso moléculas individuales.

3) Hacer más pequeños los dispositivos de biodetección, utilizando tecnologías en unidades micro, nano, pico o fentométricas (Naresh *et al.*, 2021).

## **8.2 Elementos de un biosensor**

Un biosensor combina el elemento biológico (como un aptámero o un anticuerpo), con un componente de transducción para generar una señal cuantificable. El transductor es capaz de detectar, registrar y transmitir información acerca de un cambio fisiológico o la presencia de diferentes materiales químicos y biológicos en un medio (Dincer *et al.*, 2019). Los biosensores pueden adoptar diversas formas y tamaños, estos son capaces de detectar cantidades bajas de patógenos específicos, sustancias químicas tóxicas y niveles de pH. Lo que indica que un biosensor tradicional tiene como elementos básicos los siguientes componentes:

a) El analito es la sustancia de interés cuyo constituyente se está identificando (glucosa, amoníaco, lactosa, etc.).

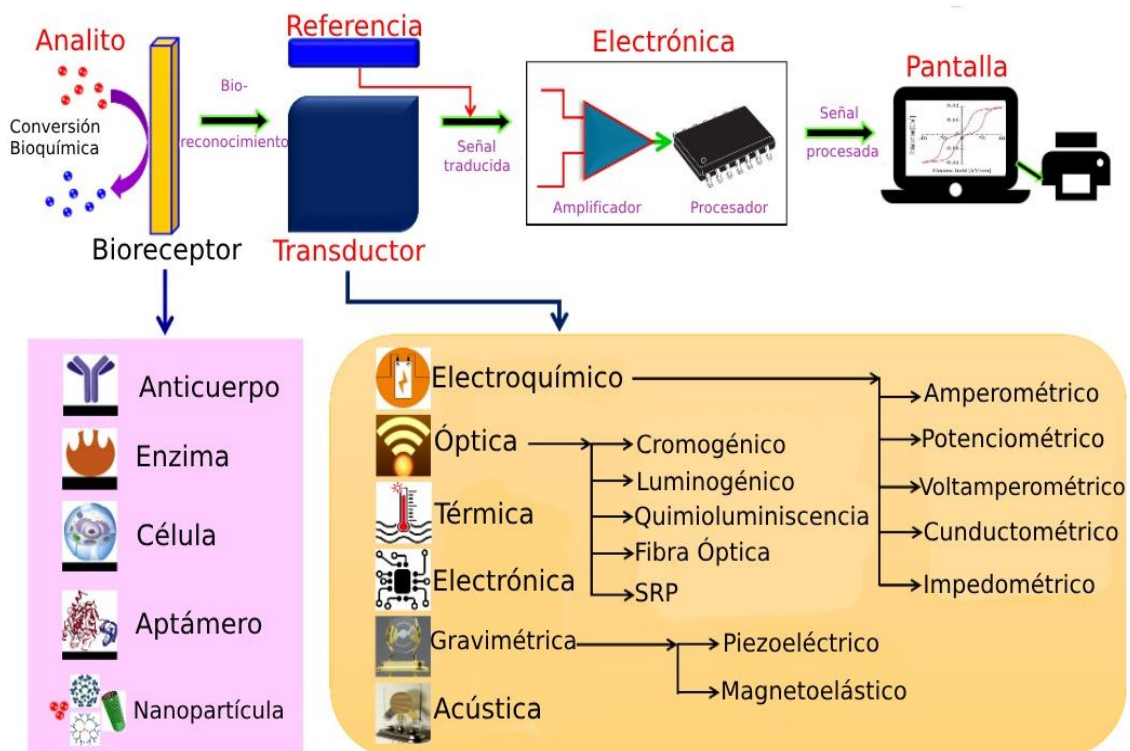
b) El bioreceptor es una biomolécula capaz de reconocer e interactuar con el sustrato objetivo, es decir el analito. La señal que emerge durante la interacción de estos dos elementos (bioreceptor y analito) se denomina bioreconocimiento.

c) El transductor es un elemento que interpreta la señal captada de una forma a otra. Este elemento es clave en un biosensor, ya que transforma el evento de bioreconocimiento en una señal cuantificable. El transductor se clasifica según el principio de funcionamiento en: transductor electroquímico, óptico, térmico, electrónico y gravimétrico.

d) La electrónica se encarga de procesar la señal transducida y prepararla para la visualización. Las señales se amplifican y posteriormente se convierten en formato digital.

e) La pantalla, es un sistema de interpretación para el usuario, tal como una computadora o una impresora, que genera una salida para que la respuesta correspondiente sea legible y comprensible para el usuario. El resultado mostrado en la pantalla puede tener formato numérico, gráfico, tabular o de una figura, dependiendo del requisito del usuario final (Cajigas *et al.*, 2021).

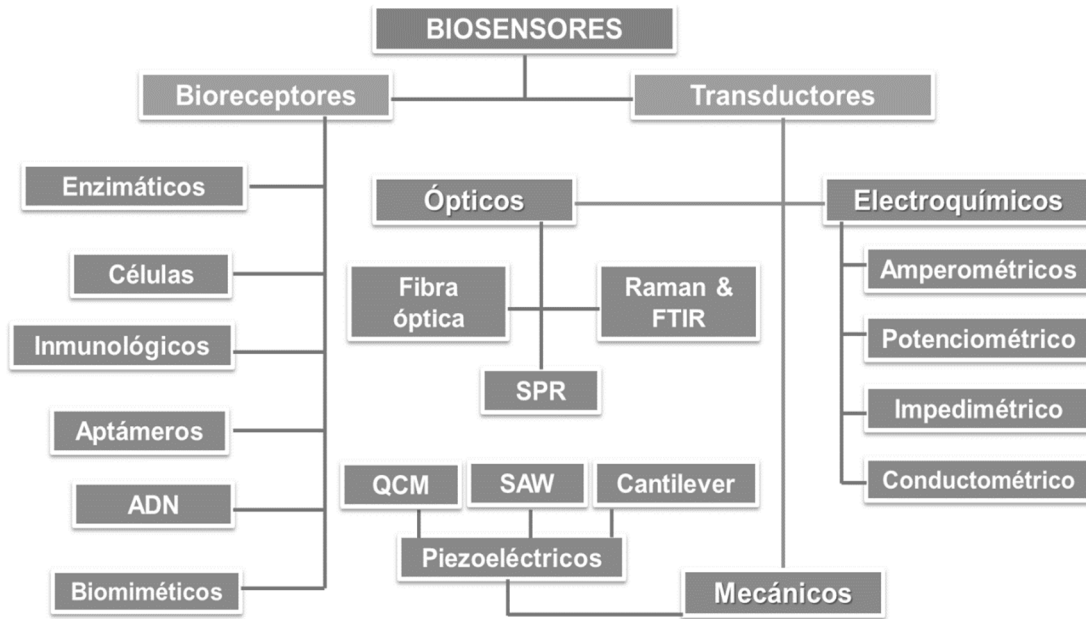
Los componentes del biosensor serán distintos de acuerdo con cada requerimiento del diseño, ya que contamos con biosensores que no cuentan con la electrónica o la pantalla, sin embargo, en el proceso de diseño y estandarización pasan por estas interfaces para poder establecer su metodología que le permitirá ser un proceso repetible (Naresh *et al.*, 2021).



**Figura 9. Diagrama esquemático de los elementos de un biosensor clásico.** Esquema de los elementos de un biosensor, así como una variedad de tipos de bioreceptores y transductores utilizados regularmente en los biosensores (Naresh *et al.*, 2021).

### 8.3 Clasificación de los biosensores

La clasificación de los biosensores es muy amplia, esto va a depender de la categoría que sea nuestro parámetro, por ejemplo: el analito, la fuente de energía, contacto (de contacto físico o sin contacto), analógico o digital, tipo de señal (física, química, térmica), el tipo de bioreceptor (ADN, ARN, aptámero, anticuerpo, enzima, etc.) por mencionar algunas de las tantas clasificaciones (Seok *et al.*, 2016).



**Figura 10. Esquema de la clasificación general de los tipos de biosensores.** Los bioreceptores se dividen en seis categorías, los transductores en tres categorías y cada uno a su vez se subdivide en otras subcategorías de acuerdo con la técnica que se implemente para determinar la muestra (Mendoza-Madrigal et al., 2013).

En el caso de la clasificación por bioreceptor, se puede dividir en dos categorías de acuerdo con el segmento, según el principio de bioreconocimiento, los biosensores catalíticos y biosensores de afinidad o no catalíticos:

Biosensores catalíticos, la interacción del analito bioreceptor da lugar al desarrollo de un nuevo producto de reacción bioquímica. Los biosensores catalíticos pueden incluir enzimas, microorganismos, tejidos o células.

Biosensor de afinidad (no catalíticos), son aquellos donde el analito se une al receptor de forma irreversible y, durante la cual no se forma ningún nuevo producto de reacción bioquímica. Los biosensores de afinidad comprenden anticuerpos, receptores celulares y ácidos nucleicos como su objetivo (Mendoza-Madrigal et al., 2013).

Cuando hablamos de biosensores de afinidades, se comprende aquellos que están dirigidos a un blanco específico, en esta categoría podemos encontrar a los biosensores basados en aptámeros, conocidos también como aptásensores (Uhuo et al., 2022).

#### 8.4 Aptámeros

Los ácidos nucleicos son capaces de hibridarse entre sí, utilizando un código bidimensional, además pueden formar estructuras tridimensionales altamente complejas que sirven como andamiajes para interacciones moleculares con diferentes blancos (Fu et al., 2020). Esta propiedad siempre ha estado presente en los ácidos nucleicos, sólo que recientemente se ha manipulado como un avance

tecnológico para el desarrollo de métodos *in vitro* con el fin de diseñar sondas de ADN o ARN que no se encuentran en el microambiente de manera natural (Marrazza, 2017). Estos avances en los métodos de síntesis de ADN han permitido la generación de grandes poblaciones de sondas que se unen a cualquier blanco. Mientras que, por otro lado, la PCR ha hecho posible la amplificación de pequeñas cantidades de moléculas en cantidades que son más fáciles de manipular (Ning *et al.*, 2020). La combinación periódica de estos dos avances permitió la capacidad de dividir oligonucleótidos en base a sus actividades de unión a un blanco, lo que dio lugar a la “selección *in vitro* de ácidos nucleicos funcionales”, también conocida como SELEX. Las sondas de ácidos nucleicos que se generan utilizando SELEX se llaman aptámeros, un término del latín que significa “*adaptable*” (Keefe *et al.*, 2010). Los aptámeros son una de las pocas clases de moléculas que, al igual que los anticuerpos, son capaces de diseñarse para unirse a múltiples blancos diferentes (Ospina, 2020).

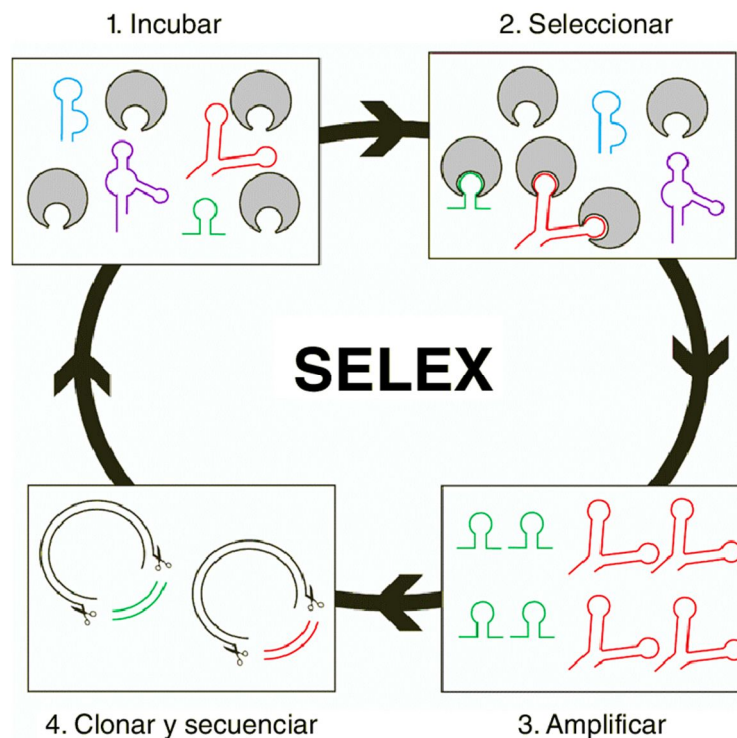


Figura 11. **Esquema de la selección *in vitro* de ácidos nucleicos funcionales o “SELEX”.** Apartado, 1) Incubación: la librería previamente diseñada es puesta en contacto con las moléculas blanco. 2) Selección: separación de los aptámeros que se unen a las moléculas blanco y descarte de aquellos que no lo hacen. 3) Amplificación: mediante PCR se obtienen múltiples copias de los aptámeros seleccionados. Se repiten los pasos 1, 2 y 3 hasta obtener aptámeros con gran afinidad y especificidad. 4) Clonación y secuenciación: una vez obtenidos los aptámeros afinados, se clonan y se secuencian para conocer su composición de nucleótidos (Ospina, 2020).

Los aptámeros tienen una gran afinidad por su blanco, además tienen propiedades maleables y grandes ventajas como su bajo costo y alto rendimiento (Alsager *et al.*, 2018).

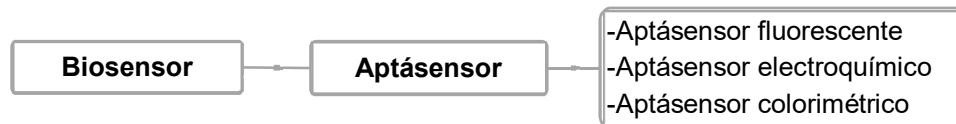
## 8.5 Aptásensores

Los aptámeros se han convertido en herramientas moleculares cada vez más importantes para el diagnóstico (Gutiérrez-Santana *et al.*, 2020; Ospina, 2020; Liu *et al.*, 2022). En concreto, los biosensores que emplean aptámeros como elemento de reconocimiento se denominan aptásensores, estos aptásensores presentan grandes ventajas sin precedentes en comparación con los biosensores que utilizan receptores como anticuerpos y enzimas, por ejemplo:

1. Los aptámeros de alta especificidad y afinidad pueden seleccionarse *in vitro* para cualquier blanco, desde pequeñas moléculas a grandes proteínas e incluso células, lo que permite desarrollar una amplia gama de biosensores basados en cada blanco deseado (Seok *et al.*, 2016).
2. Una vez seleccionados, los aptámeros pueden sintetizarse con gran reproducibilidad y pureza. Además, a diferencia de los anticuerpos o enzimas basados en proteínas, los aptámeros de ADN tienden a ser químicamente más estables.
3. Los aptámeros suelen sufrir cambios conformacionales significativos al unirse a su blanco. Esto ofrece una gran flexibilidad en el diseño de nuevos biosensores con alta sensibilidad y selectividad (Kalra *et al.*, 2018).

### 8.5.1 Tipos de Aptásensores

Se han utilizado diferentes modelos de detección para el desarrollo de aptásensores, que van desde métodos sin etiquetas, como la resonancia de plasmón superficial (SPR) y la medición de microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM), hasta otros métodos que a menudo requieren etiquetas, como la electroquímica, fluorescencia y quimioluminiscencia (Mehrotra, 2016). Todos estos procesos han sido objeto de estudio y mejoras, impulsando el avance de esta tecnología (Hosseinzadeh *et al.*, 2020).



**Figura 12. Esquema de los aptásensores más comunes.** Clasificación de los aptásensores por su metodología, cada aptásensor tiene una metodología distinta que varía dependiendo el resultado que buscamos.

### 8.5.2 Aptásensores ópticos

Existen varias estrategias para modificar los aptámeros y convertirlos en aptásensores, éstas pueden variar dependiendo de las técnicas de medición utilizadas en el proceso de detección (Atapour *et al.*, 2022). Los aptásensores ópticos se pueden dividir en varias categorías, como colorimétricos, fluorescentes y SERS (Dispersión Raman Mejorada en Superficie). Entre los distintos formatos de ensayo, la fluorescencia y la colorimetría son las dos técnicas más populares, debido a la facilidad para generar reacciones que permitan observar la identificación del blanco (Yuan, Wu, *et al.*, 2014).

### **8.5.2.1 Aptásensores de fluorescencia**

La detección fluorescente es empleada habitualmente en los aptásensores, ya que hay aptásensores a base de fluorescencia que se caracterizan por su facilidad por el etiquetado de los aptámeros con fluoróforos, así mismo la disponibilidad de múltiples fluoróforos y la capacidad para la detección en tiempo real, hacen que sea una de las técnicas más utilizadas (Bayraç and Donmez, 2018; Sharma and Ramena, 2021). A lo largo del tiempo, con este tipo de biosensores se han desarrollado varias estrategias principales para convertir los aptámeros en sondas de señalización fluorescentes que actúan como marcador en un aptásensor (Kim *et al.*, 2011).

Los aptásensores fluorescentes más utilizados actualmente, son aquellos basados en las técnicas que anteriormente utilizaban anticuerpos, en las cuales se sustituyó este anticuerpo, por un aptámero, un ejemplo muy cotidiano es el uso de una señal molecular basada en aptámeros, donde se coloca una estructura molecular en forma de horquilla, que es etiquetada en un extremo con un fluoróforo. La unión de este complejo a su blanco interrumpe la formación de la horquilla, separando el fluoróforo del cebador, lo que genera la señal de fluorescencia (Mehrotra, 2016). Otro formato adoptado con frecuencia es el colocar un aptámero marcado con un fluoróforo en una estructura dúplex con una secuencia de ADN complementaria marcada; la presencia de su blanco fuerza la liberación de la hebra complementaria del aptámero, lo que genera la señal de fluorescencia (Zhang, *et al.*, 2019).

### **8.5.2.2 Aptásensores colorimétricos**

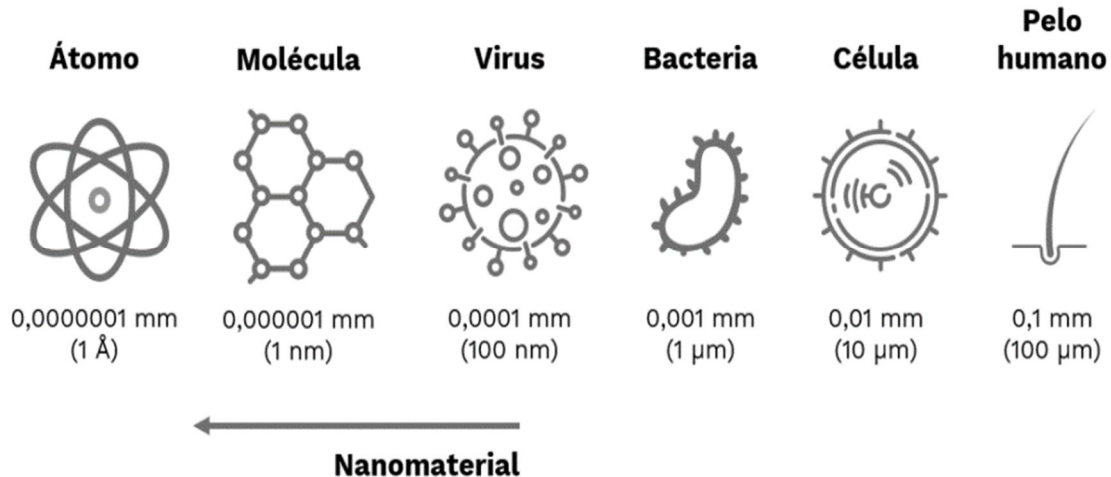
En los últimos 5 años, los aptásensores colorimétricos se han vuelto cada vez más populares debido a su bajo costo, simplicidad, alta sensibilidad y su capacidad para detectar de manera específica sin la necesidad de equipos complejos (Yuan *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021). Se han descrito muchos mecanismos de detección relacionados con la técnica colorimétrica, tales como la catálisis de nanozimas, la resonancia de plasmón superficial (SPR) y la unión del ligando-receptor (Xiao *et al.*, 2022).

Una de las características más buscadas en un aptásensor colorimétrico, es la capacidad de obtener un resultado inmediato basado en la colorimetría de ciertos elementos. Existen metodologías que se basan en la aglomeración de las AuNPs, las cuales permiten generar un cambio cuantificable de acuerdo con el color. Un ejemplo de esto es el cambio de rojo a azul en presencia de blanco, y se logra gracias a la separación de un aptámero unido a las AuNPs (Yuan, Wu, *et al.*, 2014; Sadsri *et al.*, 2020).

## **8.6 Potenciadores de los biosensores**

Los biosensores han surgido como una prometedora alternativa en la detección de diferentes moléculas. Sin embargo, la mayoría de las técnicas utilizadas para el desarrollo de estos dispositivos presentan una gran desventaja, dado que proporcionan un resultado apenas cuantificable (Hegde *et al.*, 2022). Por ello se ha

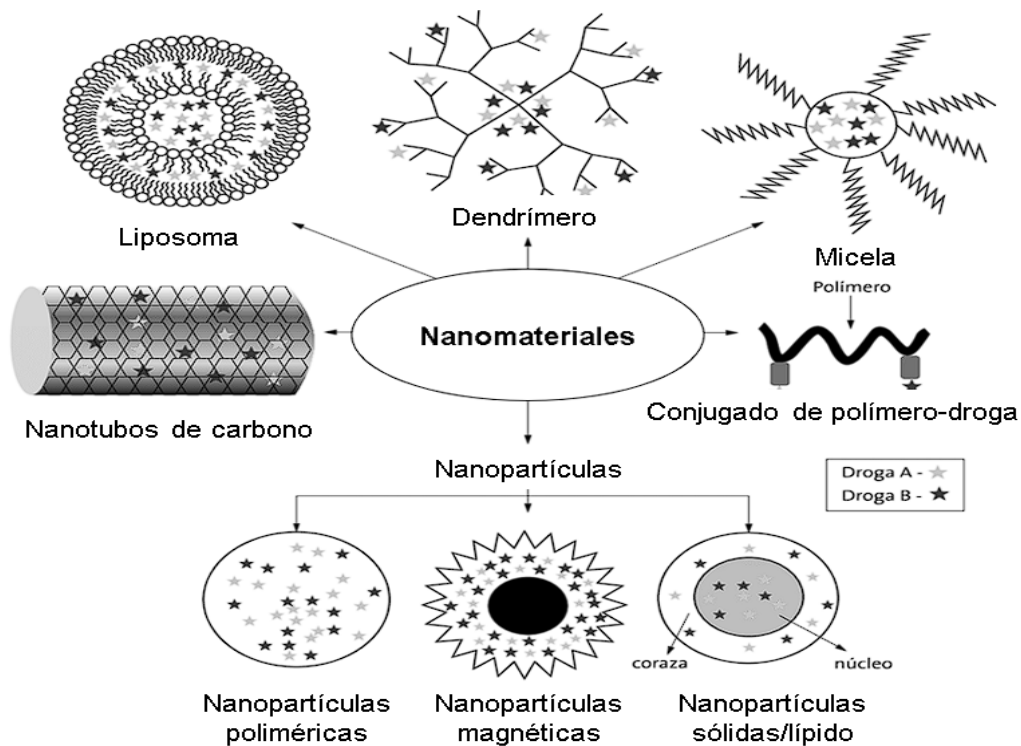
buscado contrarrestar esta desventaja con potenciadores que permitan aumentar los resultados que son proporcionados. De esta manera, se podrían diseñar biosensores que no dependan de equipos grandes, ni de personal especializado. Los nanomateriales, se han vuelto cada vez más populares debido a su capacidad para mejorar el rendimiento de los biosensores (Wang *et al.*, 2015). Gracias a su tamaño reducido, estos materiales permiten que los biosensores obtengan un mejor resultado y, por tanto, se conviertan en una opción altamente más atractiva (Seok *et al.*, 2016).



**Figura 13. Esquema de la magnitud del tamaño de los nanomateriales.** Un pelo humano tiene un diámetro de 0.1 mm, mientras que el nanomaterial más grande es de 0.0001 mm, lo que es comparable con un virus. (Recopilación de la Agencia Europea de Química 2016, esta imagen es de dominio público y, por lo tanto, está libre de restricciones de derechos de autor, imagen diseñada por Anders Norén)

### 8.6.1 Nanomateriales

El estudio y desarrollo de los nanomateriales ha cobrado gran importancia en el campo de la nanotecnología debido a sus sorprendentes propiedades físicas y químicas. Para considerar un material como un nanomaterial, su tamaño debe ser inferior a 100 nm (Jia *et al.*, 2016). Debido al tamaño extremadamente pequeño de los nanomateriales, el comportamiento de los electrones se ve altamente influenciado por su entorno y por la disposición de los átomos en el material (Naresh *et al.*, 2021). Esto significa que, para un material nanométrico, la cantidad de átomos presentes en la superficie con respecto a su interior es mucho mayor y como resultado, el movimiento de los electrones se encuentra altamente limitado por las dimensiones del propio material. Gracias a estas propiedades tan particulares, es posible diseñar materiales con propiedades únicas y específicas para cada necesidad. Se ha clasificado los nanomateriales actuales en seis tipos, lo que demuestra el creciente interés por este importante campo de estudio (Grzelczak *et al.*, 2008).




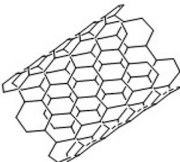


**Figura 14. Esquemas de la clasificación de los nanomateriales por su forma estructural.** Los nanomateriales se han clasificado dependiendo de las características que presentan. El liposoma, compuesto de lípidos, puede utilizarse como un potente vehículo. Los dendrímeros, estructuras macromoleculares que comprenden una serie de "ramificaciones" alrededor de un núcleo interno, son capaces de transportar múltiples moléculas tanto en el núcleo interno como en la superficie. Las micelas poliméricas son partículas nanocoloidales con un núcleo hidrofóbico, donde se pueden transportar diferentes tipos de moléculas hidrofóbicas. Los nanotubos de carbono se pueden utilizar como vehículos para administrar múltiples medicamentos o moléculas. Las nanopartículas son partículas coloidales donde se pueden transportar múltiples moléculas. Además, se muestran ejemplos representativos de diferentes nanopartículas, como nanopartículas poliméricas, nanopartículas magnéticas y nanopartículas de lípidos sólidos (Parhi and Sahoo, 2012).

Actualmente la síntesis de distintos tipos de nanopartículas se basa en metales como plata, oro, cobre, óxido de cobre, óxido de zinc y magnetita estos materiales han encontrado aplicaciones en diversas metodologías de diagnóstico con biosensores, farmacología y biología. En la medicina, se está aprovechando la capacidad bactericida de algunas de estas nanopartículas (Jia and Wang, 2016). En el ámbito de la nanotecnología, se ha planteado la posibilidad de integrar nanopartículas en el diagnóstico, y para ello se han desarrollado sistemas de biodetección que emplean una amplia gama de biomateriales, desde el quitosano, el colágeno, las nanopartículas metálicas, el grafeno y los nanomateriales a base de carbono, hasta los puntos cuánticos, los dendrímeros y los nanomateriales de silicio (Naresh and Lee, 2021).

Entre la variedad de nanopartículas metálicas disponibles, las AuNPs están ganando un gran interés en este campo debido a su excepcional capacidad de conjugación, estabilidad y propiedades de amplificación de señal. Estas

propiedades hacen de ellas los sistemas de nanopartículas más biocompatibles, lo que les ha otorgado una gran popularidad en el campo del diagnóstico y la medicina (Wang *et al.*, 2015).

**Tabla 4. Clasificación de los nanomateriales según sus dimensiones.** Esta clasificación se basa en las dimensiones que los nanomateriales tienen (Parhi *et al.*, 2012).

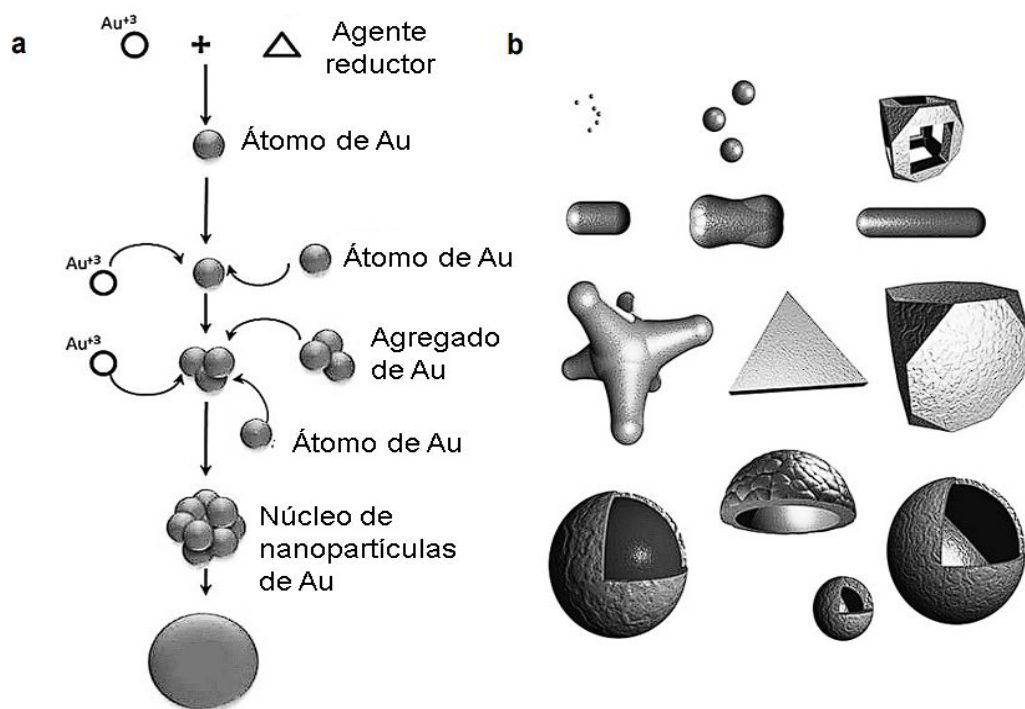
Estructura	Ejemplos
<p data-bbox="467 499 651 522"><b>Cero-dimensional (0D)</b></p> 	<ul data-bbox="833 535 1177 682" style="list-style-type: none"> <li>● Fullerenos</li> <li>● Partículas coloidales</li> <li>● Puntos cuánticos</li> <li>● Nanoclusters</li> <li>● Nanopartículas (Au y Ag)</li> </ul>
<p data-bbox="467 732 667 756"><b>Uni-dimensional (1D)</b></p> 	<ul data-bbox="833 800 1170 915" style="list-style-type: none"> <li>● Nanocables y nanofibras</li> <li>● Nanotubos</li> <li>● Nanovarillas</li> <li>● Fibra polimérica</li> </ul>
<p data-bbox="451 984 667 1008"><b>Bi-dimensional (2D)</b></p> 	<ul data-bbox="833 1020 1128 1136" style="list-style-type: none"> <li>● Monocapas</li> <li>● Nanorecubrimientos</li> <li>● Películas poliméricas</li> <li>● Películas multicapa</li> </ul>
<p data-bbox="451 1247 688 1270"><b>Tri-dimensional (3D)</b></p> 	<ul data-bbox="833 1320 1073 1436" style="list-style-type: none"> <li>● Nanoestructuras</li> <li>● Policristales</li> <li>● Nanobobinas</li> <li>● Nanoflores</li> </ul>

## 8.7 Nanopartículas de oro

Las AuNPs están ampliamente utilizadas gracias a su capacidad para funcionalizar con una amplia gama de biomoléculas. En particular, las AuNPs son capaces de actuar como una salida de señal que se puede rastrear sin la necesidad de utilizar equipos relativamente complejos, lo que las hace muy deseables (Zhang *et al.*, 2021). Además, las AuNPs son conocidas por su facilidad de operación y visualización, lo que las hace excelentes candidatas para ser utilizadas como biosensores colorimétricos (Khorshid *et al.*, 2023).

En este sentido, la integración de las nanopartículas de oro en biosensores ha mejorado en gran medida la eficiencia de captura de analitos y reducido los falsos positivos. Los biosensores basados en AuNPs se basan en un principio según el cual, la distancia más corta entre las partículas provoca la interacción del plasmón de superficie, lo que provoca un cambio de color de rojo a azul. El principal beneficio de los ensayos colorimétricos es que no requieren procedimientos adicionales para la amplificación de la señal, lo que significa que no se necesitan instrumentos analíticos complejos (Yuan *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2020).

A pesar de que estos biosensores han mostrado una gran efectividad en la identificación de diversos organismos objetivo utilizando este cambio de color como señal analítica, la investigación traslacional para utilizar biosensores de nanopartículas de oro en aplicaciones clínicas está limitada debido a ciertos desafíos, como la preparación de muestras y los efectos de la matriz. Es importante destacar que la integración del sistema también representa otro gran desafío que debe ser abordado en el futuro para ampliar el uso de biosensores con AuNPs en aplicaciones clínicas (Garcia-Melo *et al.*, 2019; Moraldo *et al.*, 2022).



**Figura 15. Proceso de nucleación en la síntesis de AuNPs y las formas resultantes.** a) Representación del proceso de síntesis de las AuNPs. Partiendo de un átomo de oro y un agente reductor, es posible controlar el tamaño y velocidad de la síntesis de las AuNPs. b) Formas que se pueden obtener de las AuNPs mediante la síntesis química. La versatilidad en las formas que se pueden obtener las AuNPs permite sintetizar AuNPs más sencillas (esféricas) hasta las AuNPs con formas más complejas (estrella, huecas, hexagonales, tubos) (Parhi *et al.*, 2012).

### **8.7.1 Aptámeros unidos a nanopartículas de oro**

Dentro del desarrollo de biosensores, se han comenzado a incorporar aptámeros en nanomateriales para crear aptásensores de alto rendimiento. Las AuNPs son un material ideal para utilizar en estos aptásensores debido a su facilidad de funcionalización con aptámeros (ya sea a través de la adsorción física o de grupos tiol) y esto gracias a sus características físicas y químicas, que las hacen superiores a otros nanomateriales (Mehrotra, 2016). Hay estudios en los cuales se emplearon AuNPs y nanopartículas de hierro magnéticas funcionalizadas con un aptámero para detectar al patógeno *Vibrio parahaemolyticus*, en muestras de mariscos. Cuando una muestra contenía estas bacterias, quedaban intercaladas entre los aptámeros de ambas nanopartículas, y se podían separar de manera magnética. Las AuNPs permitían la detección del patógeno sin la necesidad de instrumentos, esto gracias a que se podía observar como el cambio de color en la muestra al momento de tener presencia de la bacteria blanco (Sadsri *et al.*, 2020).

Hay otros ejemplos donde se demuestra, cómo se diseñó un ensayo basado en aptámeros y AuNPs para detectar muestras con contaminación por *Escherichia coli* en jugo de frutas. Este ensayo colorimétrico utilizó nanozimas y AuNPs, las cuales se acoplaron con un aptámero específico para *E. coli*, aptámero que se separó de la superficie de las AuNPs en presencia de *E. coli*, dejando la superficie de las AuNPs desprotegidas contra 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), el cual oxida las AuNPs cambiando la solución de un color rojo a azul. Sin embargo, cuando los aptámeros permanecían unidos a las AuNPs debido a la ausencia de *E. coli*, el aptámero no se separaba, por lo que TMB no oxida a las AuNPs y se mantenía el color rojo de la solución original (Das *et al.*, 2020).

Además, en la literatura se encuentra un ensayo basado en un aptámero específico para la bacteria *Bacillus carboniphilus*, el cual se empleó para la creación de un aptásensor colorimétrico. En presencia del organismo objetivo, el aptámero se adhirió a la bacteria, dejando solo unos pocos aptámeros libres que no pudieron proteger a las AuNPs de la agregación inducida por la sal, lo que hacía que la solución se volviera azul. Si los aptámeros no se unían específicamente al organismo objetivo, quedaban una gran cantidad de aptámeros libres que protegían a las AuNPs de la agregación inducida por la sal y preservaban el color rojo de la solución (Wang *et al.*, 2021).

Este enfoque permitió la detección precisa de la bacteria objetivo. En general, la utilización de nanopartículas de oro funcionalizadas con aptámeros presenta un gran potencial para la creación de aptásensores con diversas aplicaciones.

### **8.8 Aptásensores para la detección de microorganismos**

La detección, identificación y cuantificación de patógenos microbianos es esencial para salvaguardar la salud pública. Asimismo, es crucial identificar enfermedades causadas por estos patógenos para realizar un estudio adecuado del posible tratamiento a seguir. Para detectar microorganismos, se suele recurrir a sondas de

detección del patógeno que identifican proteínas en la superficie. Sin embargo, actualmente se presenta una gran limitación para diseñar estas sondas, debido a que a pesar de que la idea de usar aptámeros para la construcción de biosensores no es nueva, es aún poco explorada (Ma *et al.*, 2017).

En la literatura se encuentran biosensores basados en aptámeros y AuNPs, que tienen la finalidad de detectar microorganismos, un ejemplo muy enriquecedor es la construcción de un aptásensor para detectar a *Salmonella typhimurium* utilizando nanopartículas de oro de 15 nm y un aptámero específico para su blanco. Este ensayo presenta una metodología colorimétrica a base de ácido acético para generar la aglomeración de las AuNPs. Las pruebas de este aptásensor permitieron determinar una detección mínima del blanco de 56 UFC/mL en medio líquido. El complejo se formó mediante la interacción de las cargas negativas del aptámero con las AuNPs, formando un enlace débil que se desprende en presencia de su blanco, que en este caso es la bacteria *S. typhimurium*. Con este biosensor, se logra la detección de la bacteria con gran precisión y rapidez, lo que puede ser muy beneficioso en la detección temprana de contaminación de alimentos (Ma *et al.*, 2017).

Así también se encuentran metodologías que desarrollan biosensores con estructuras más complejas como es el caso del aptásensor colorimétrico basado en AuNPs para la detección de la bacteria *Staphylococcus aureus* utilizando tecnología de amplificación de señal de tiramina (TSA). Para lo cual se inmovilizó un aptámero biotinilado específico para *S. aureus*, en pocillos de una placa de microtitulación mediante la unión de biotina-avidina. Posteriormente, se introdujo sucesivamente en los pocillos las bacterias blanco, con los conjugados de aptámero biotinilado-estreptavidina-HRP, la tiramina biotinilada, el peróxido de hidrógeno y la avidina-catalasa. Lo cual le permitió a la catalasa consumir el peróxido de hidrógeno presente en la muestra, para que finalmente, se añadió trihidrato de cloruro de oro (III) recién preparado, situación que genera un cambio colorimétrico. Este cambio permite hacer una relación entre la absorbancia a 550 nm y la concentración de *S. aureus*, lo que les permitió obtener una relación lineal en el rango de 10 a  $1 \times 10^6$  UFC/mL. El límite de detección de este método desarrollado fue de 10 UFC/mL, y en condiciones óptimas, se logró la detección precisa y sensible de la bacteria *S. aureus*, lo que tiene importantes aplicaciones en el diagnóstico de infecciones de origen bacteriano en tiempo real (Yuan *et al.*, 2014).

Los antecedentes descritos demuestran la necesidad de desarrollar biosensores capaces de detectar otros tipos de bacterias relevantes en el campo clínico.

## 9. Hipótesis

El aptámero Lyd-3 acoplado a nanopartículas de oro, permite la detección de *S. pneumoniae* de manera rápida y con una alta especificidad.

## 10. Justificación

Se considera importante el desarrollo de un biosensor que sea rápido y sensible lo cual tendrá un impacto significativo en la identificación de *S. pneumoniae*. Esta bacteria es una de las principales causas de neumonía y es responsable de la muerte de aproximadamente 4 millones de niños menores de 5 años y de un número similar de adultos mayores de 60 años alrededor del mundo (Bosak *et al.*, 2019; Evans, 2022).

Los métodos convencionales para la identificación de este microorganismo son las pruebas microbiológicas clásicas como la prueba de la optoquina, la prueba de solubilidad en bilis o la prueba de catalasa. Sin embargo, en la actualidad se utilizan otros como la determinación del antígeno capsular o métodos moleculares para la determinación de genes de virulencia, como la autolisina (Lyt A) y la neumolisina (Ply), utilizando la PCR. Desafortunadamente estas técnicas requieren un gran tiempo o un gasto económico mayor y el obligatorio requerimiento de personal especializado, sin mencionar que muchas veces las técnicas moleculares únicamente se utilizan en laboratorios de referencia, todas estos hechos son un impedimento para el pronto diagnóstico (Bennett, *et al.*, 2005; Morimura *et al.*, 2021). Hay una gran necesidad de enfocar el diagnóstico clínico en etapas tempranas, lo que lleva al desarrollo de nuevas técnicas analíticas, que sean capaces de detectar a sus blancos de manera sensible y específica.

Por lo tanto, actualmente hay un interés creciente en el desarrollo de biosensores para la detección de patógenos, ya que muestran un rendimiento analítico superior, junto con una medición en tiempo real y mayor sensibilidad (Hamed *et al.*, 2020; García-Melo *et al.*, 2022). Además, también evitan un lapso entre la preparación y el análisis de las muestras, presentando una gran ventaja en relación con los métodos convencionales, esto sin la mención de sus bajos costos de producción (Cajigas *et al.*, 2021).

## **11. Objetivos**

### **11.1 Objetivo General**

Diseñar un método de detección funcional basado en el aptámero Lyd-3 y nanopartículas de oro para la identificación de *S. pneumoniae*.

### **11.2 Objetivos particulares**

- Construir un bioreceptor basado en el aptámero Lyd-3 y AuNPs que sea capaz de identificar a *S. pneumoniae*.
- Evaluar la sensibilidad y la especificidad del bioreceptor AuNPs-Lyd3 para *S. pneumoniae*.
- Utilizar el bioreceptor AuNPs-Lyd3 para diseñar un biosensor, que permita la identificación de *S. pneumoniae*.

## 12. Estrategia experimental



## **13. Metodología**

### **13.1 Microbiología**

#### **13.1.1 Cepa bacteriana**

La bacteria que se utilizó para llevar a cabo las pruebas fue *S. pneumoniae*, específicamente los serotipos TIGR4 (ATCC BAA-334), R6 (ATCC BAA-255) y 49619 (ATCC 49619), además se utilizó como controles negativos las bacterias *Klebsiella pneumoniae* (ATCC-9633), *Staphylococcus aureus* (ATCC-33591), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC-12228), *Haemophilus influenzae* (ATCC-19418) y *Streptococcus mutans* (ATCC-25175).

#### **13.1.2 Cultivos en medio sólido**

Los cultivos se realizaron en agar base sangre, enriquecidos con sangre de cordero al 5% estéril, las placas fueron incubadas a 37 °C durante un periodo de 18 h, con una atmósfera regulada de CO<sub>2</sub> al 10%.

#### **13.1.3 Cultivos en medio líquido**

Después del crecimiento en agar base sangre enriquecido, las bacterias se recuperaron y se sembraron en medio líquido Todd Hewitt (TH) el cual se enriqueció con extracto de levadura al 5% estéril, este medio líquido se incubó de igual forma a 37 °C durante 18 h en una atmósfera de CO<sub>2</sub> regulada al 10%.

#### **13.1.4 Crioconservación de las bacterias**

Las cepas bacterianas fueron colocadas en crioviales estériles de 1 mL, los cuales contenían 500 µL de medio de cultivo líquido TH y glicerol estériles en una relación 3:1 para almacenarlas a una temperatura de -80 °C.

#### **13.1.5 Tinción de Gram**

La tinción se realizó respecto de una dilución de *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619) a 10<sup>4</sup> UFC/mL en agua MiliQ estéril, agregando 10 µL de dilución a un portaobjetos de manera independiente por cepa. La gota se distribuyó de manera uniforme por el portaobjetos y se fijó por calor, frente al mechero. Una vez que se secó, a la muestra se le agregaron tres gotas de cristal violeta por 1 min, pasado el tiempo se lavó con agua estéril abundante, para agregar 3 gotas más de Lugol por 1 min, una vez que terminó de reaccionar, se procedió a lavar de la misma manera, posteriormente, se agregaron 3 gotas de alcohol-cetona (1:1) por 10 s, se enjugó y por último se agregó safranina por 1 min y se realizó el último lavado. Las muestras se dejaron secar frente al mechero. Se colocó el cubreobjetos y se selló con barniz. Las muestras se observaron en el microscopio óptico con los aumentos 40X y 100X.

#### **13.1.6 Prueba de la Catalasa**

Para realizar esta prueba, se obtuvo de una caja de cultivo de agar sangre con *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619), una azada de manera independiente, bajo condiciones de esterilidad, esta se colocó en un portaobjetos por cepa de *S. pneumoniae*, a los cuales se les agregó 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Se consideró el

parámetro de la prueba, para el cual la reacción burbujeante como positiva y la que no genera burbujas como negativa.

La finalidad de esta prueba es que la catalasa, que es una enzima, que tiene la capacidad de descomponer el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, genere una reacción capaz de formar H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>.

### 13.1.7 Prueba de Optoquina

Por cada cepa de *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619), se realizó un cultivo masivo en una caja de agar base sangre, para lo cual se colocó un disco de optoquina en el centro del cultivo, para dejar en crecimiento por 18 h. Posteriormente las cajas se incubaron a 37 °C durante un periodo de 18 h, con una atmósfera regulada de CO<sub>2</sub> al 10%. Pasado este tiempo, se observó si alrededor del disco de optoquina había un halo de inhibición de crecimiento y se midió el tamaño de este halo. Se consideró positiva la prueba si el halo estaba presente y negativa si no había presencia del halo.

## 13.2 Aptámeros

### 13.2.1 Selección y modificación de aptámeros

El aptámero principal que se utilizó es Lyd-3 (Bayraç and Donmez, 2018), el cual se modificó mediante la adición de un grupo tiol (SH) en el extremo 3' de la secuencia y se realizó una segunda modificación en la cual se agregó un grupo 6-FAM (6-carboxifluoresceína) en el extremo 6', como se representa en la Tabla 5.

**Tabla 5. Especificación representada de las modificaciones a la secuencia Lyd-3**

	Secuencia
<b>Sentido</b>	5'/TGACGAGCCCAAGTTACCTGCCCCGAACCATACCACACGATGCCCG TACCCA GCCACCGAATCTCCGCTGCCTACA/ <b>SH/- 3'</b>
<b>Sentido</b>	5'/6fam/TGACGAGCCCAAGTTACCTGCCCCGAACCATACCACACGATGCC CGTA CCCAGCCACC GAATCTCCGCTGCCTACA/ <b>SH/- 3'</b>

Además, se buscó un segundo aptámero, que se utilizó como control negativo DTMRSA1(Turek, 2013), únicamente se modificó mediante la adición de un grupo tiol (SH) en el extremo 3', como se representa en la Tabla 6.

**Tabla 6. Especificación representada de las modificaciones a la secuencia DTMRSA1**

	Secuencia
<b>Sentido</b>	5'/ATCCAGACGTGACGCAGCATGCGGTTGGTTGCGGTTGGGCATGAT GTATTT CTGTGTGGACACGGTGGCTTAGTA/ <b>SH/- 3'</b>

Los aptámeros, se rehidrataron con 150 µL de Ditiotretol (DTT) a una concentración de 100 mM por 2 h a 60 °C, hasta que todo el DTT se evaporó, posteriormente se agregó 100 µL de Amortiguador TE pH 8.0 para rehidratar y se hicieron alícuotas para evitar la exposición continua, así como para su almacenamiento a -20 °C y a -80 °C.

### **13.2.2 Gel de electroforesis de Agarosa**

Se preparó un gel de agarosa al 3% se pesaron 3 g de agarosa y disolvieron en 100 mL de amortiguador TAE 0.5X. La mezcla se calentó en un matraz Erlenmeyer dentro del horno microondas por 30 s, evitando la ebullición para no evaporar el amortiguador, hasta obtener una mezcla homogénea. Esta mezcla se colocó en una bandeja de geles con un peine de pozos, evitando la formación de burbujas al verter la mezcla y se dejó enfriar durante 20 min. Posterior a la preparación, el gel se sumergió en una cámara de electroforesis con amortiguador TAE 0.5X hasta alcanzar el señalamiento de la cámara. Se añadió la muestra designada en cada pozo, para lo cual se agregó 1  $\mu\text{L}$  de marcador con 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga para el pozo 1, para las muestras siguientes se agregaron 7  $\mu\text{L}$  de muestra y 3  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga. Una vez que se terminó de cargar el gel se corrió a 70 mV por 45 min. Finalmente, el gel se reveló mediante una cámara de luz UV y se fotografió para obtener la evidencia.

## **13.3 Nanopartículas**

### **13.3.1 Síntesis de AuNPs**

El material que se utilizó para la síntesis de AuNPs, fue previamente lavado con agua regia (ácido nítrico más ácido clorhídrico, 3:1) para la eliminación de materiales químicos. A continuación, se enjuaga con abundante agua MiliQ, se dejó secar a temperatura ambiente y se esteriliza por un ciclo de la autoclave, para eliminar los residuos biológicos.

En un matraz de 250 mL, se agregó 10 mL de ácido tricloroáurico ( $\text{HAuCl}_3$ ) a una concentración de 1 mM en 90 mL de agua MiliQ, posteriormente se esperó a la ebullición en agitación continua por 10 min; calentándolo en una plancha magnética a 200 °C. Cuando se alcanzó nuevamente la ebullición se agregó 18 mL de una solución de citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) a una concentración 38.8 mM, se esperó 15 min a que se alcanzara la ebullición y se retiró del calor, posteriormente se dejó enfriar por 1 h a temperatura ambiente.

Para eliminar los posibles residuos de la síntesis, una vez que se enfrió, se procedió a realizar tres lavados del producto final, llevando a cabo una centrifugación a 15000 rpm por 15 min a una temperatura de 4 °C, de lo cual se formaron dos fases, de estas, retiraremos la fase superior o el excedente (líquido transparente) y se rehidrata con el mismo contenido retirado, con agua MiliQ para finalmente almacenar a 4°C, por un tiempo máximo de una semana.

### **13.3.2 Determinación del rendimiento de la síntesis de AuNPs**

Esta determinación se realizó por diferencia de pesos con un tubo Eppendorf, para lo cual, se pesó el tubo Eppendorf de 1.5mL antes de agregar 1 mL de AuNPs o de AuNPs-Lyd3. Una vez que se agregó 1mL, se procedió a secar en el equipo speenback, el cual centrifugó nuestras muestras al vacío y eliminó el líquido a una temperatura de 60 °C por 120 min. El Eppendorf, se pesó nuevamente con el residuo sólido que se quedó, las diferencias de peso en los tubos, del antes y

después de adicionar las AuNPs o AuNPs-Lyd3 se consideró como el rendimiento de la síntesis por mililitro de muestra de manera independiente.

### **13.4 Preparación del bioreceptor o complejo AuNPs-Lyd3**

El bioreceptor, se preparó a partir de las AuNPs sintetizadas previamente y Lyd-3. Para lo cual las AuNPs de 20 nm se incubaron con el aptámero Lyd-3, para generar el enlace entre el grupo tiol del aptámero y la superficie de la AuNPs. Esto se realizó agregando 100  $\mu$ L del aptámero a 60  $\mu$ M, 70  $\mu$ M o 80  $\mu$ M, de manera independiente, con 700  $\mu$ L de AuNPs, para posteriormente proceder a incubar a 37°C por un tiempo de 30 h. Posteriormente una vez pasado el tiempo, se retiró el excedente de Lyd-3, por centrifugación a 10000 rpm, desechando el sobrenadante de las dos fases formadas, para que finalmente se rehidrata con agua MiliQ, agregando la misma porción que se retiró de sobrenadante; para el almacenamiento se guardó a 4°C, por un máximo de cuatro semanas.

### **13.5 Aglomeración por NaCl**

#### **13.5.1 Determinación de la aglomeración de las AuNPs**

Se observó la aglomeración de las AuNPs, utilizando 100  $\mu$ L de NaCl a 1.2 M, 1.5 M, 1.7 M y 2M de manera independiente en 800  $\mu$ L de AuNPs, dejando reaccionar por 15 min, El resultado de esta exposición se analizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 520 nm, para registrar el cambio colorimétrico debido a la aglomeración de las AuNPs.

#### **13.5.2 Determinación de la aglomeración del complejo AuNPs-Lyd3**

Se observó la aglomeración del complejo AuNPs-Lyd3, utilizando 100  $\mu$ L de NaCl a 1.5 M y 1.7 M de manera independiente en 800  $\mu$ L de AuNPs-Lyd3, dejando reaccionar por 10 min. El resultado de esta exposición se analizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 525 nm, para registrar el cambio colorimétrico debido a la aglomeración de las AuNPs, sin romper a AuNPs-Lyd3.

### **13.6 Complejo AuNPs-Lyd3**

#### **13.6.1 Incubación de AuNPs-Lyd3 con bacterias**

El complejo AuNPs-Lyd3 se incubó con *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619) y con las bacterias control (negativo):, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus mutans*, bajo las condiciones experimentales óptimas, con una concentración bacteriana de 0 UFC/mL, 50 UFC/mL, 70 UFC/mL  $10^2$  UFC/mL,  $10^3$  UFC/mL,  $10^4$  UFC/mL,  $10^5$  UFC/mL,  $10^6$  UFC/mL,  $10^7$  UFC/mL y  $10^8$  UFC/mL de manera individual, utilizado 100  $\mu$ L de bacteria que se incubó con 800  $\mu$ L de AuNPs-Lyd3 por 15 min, a lo cual posteriormente se agregaron 100  $\mu$ L de NaCl a 1.5 M y se dejó incubar por 10 min más. El resultado de esta exposición de AuNPs-Lyd3, se analizó por el espectrofotómetro a una longitud de onda de 525 nm, para registrar los cambios.

### **13.7 Detección bacteriana por microscopía de fluorescencia**

*S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619), y las bacterias control negativo: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus mutans* se fijaron por calor, de una dilución a  $10^4$  UFC/mL de manera independiente y estéril, en un portaobjetos. Una vez fijadas, se agregó a la fijación 10  $\mu$ L de IP a una concentración de 1 mM para dejar secar por 20 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo se procedió a lavar el exceso de IP, con lavados de agua destilada estéril. Posteriormente al lavado, se agregaron 10  $\mu$ L del complejo AuNPs-Lyd3 marcado con 6-FAM por 20 min, una vez cumplido el tiempo, se lavó abundante con agua destilada estéril. Por último, se colocó el cubreobjetos para sellar con barniz, los portaobjetos armados se observaron posteriormente en el microscopio de fluorescencia y se almacenaron a 4 °C.

### **13.8 Correlación entre la intensidad de la señal a 525 nm por espectrofotometría y la concentración de *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6)**

El complejo AuNPs-Lyd3 se incubó con *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619), en una placa de 96 pozos por cepa, en diferentes concentraciones: desde 0 UFC/mL, 70 UFC/mL,  $10^2$  UFC/mL,  $10^3$  UFC/mL,  $10^4$  UFC/mL,  $10^5$  UFC/mL,  $10^6$  UFC/mL hasta  $10^7$  UFC/mL por cepa de manera individual. Para lo cual se utilizaron 800  $\mu$ L de AuNPs-Lyd3 con 100  $\mu$ L de *S. pneumoniae* y se dejó reaccionar por 15 min, pasado este tiempo se agregaron 100  $\mu$ L de NaCl a 1.5 M; dejando la reacción por 10 min y, una vez pasado un total de 25 min se analizó por espectrofotometría, a una longitud de onda de 525 nm. Este experimento se analizó por triplicado para cada cepa de *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619), teniendo las mismas condiciones para todas las réplicas, una vez se obtuvieron todos los datos se procedió a hacer un análisis de regresión lineal por el software GraphPad 8. Las placas armadas para este experimento no se almacenaron.

### **13.9 Filtración y ajuste de pH para el medio de oposición**

Se utilizó 100 mL de leche entera ultra pasteurizada, para una prueba que simule un ambiente hostil, lo que denominamos prueba de oposición. De esta cantidad de leche se hicieron alícuotas de 20 mL y se centrifugó cada alícuota durante 15 min a 15000 RPM para eliminar proteínas y excesos de grasas. Posteriormente el sobrenadante que se obtuvo se filtró dos veces con papel filtro, este filtrado se pasó nuevamente por una unidad de filtración de 0.45  $\mu$ m. Al resultado de la filtración se le ajustó el pH a 7.7, esto fue usando un amortiguador de Tris-HCl y se preservó la leche filtrada a 4°C por un tiempo máximo de una semana.

### **13.10 Detección de *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6), por el complejo AuNPs-Lyd3 en medio de oposición**

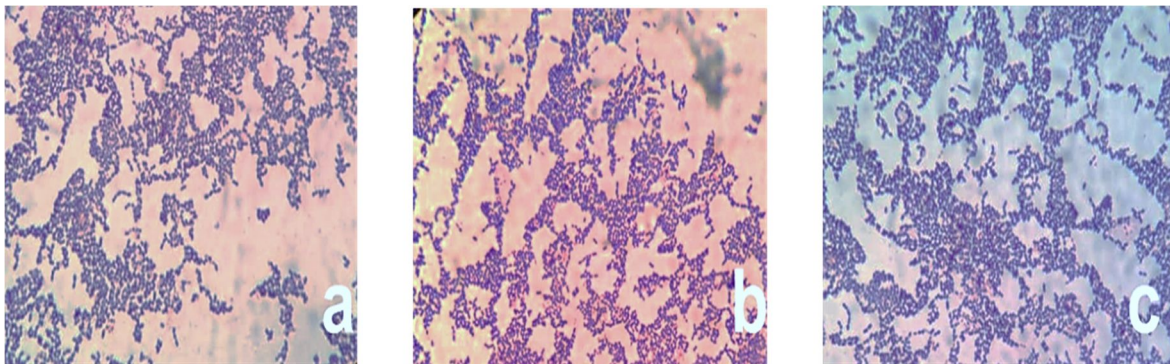
La muestra de leche filtrada con el pH ajustado se dividió en 8 partes de 900  $\mu$ L, donde a cada alícuota se le añadió *S. pneumoniae* para obtener una cantidad de 0 UFC/mL, 70 UFC/mL, 100 UFC/mL, 150 UFC/mL, 200 UFC/mL, 250 UFC/mL, 300 UFC/mL y 350 UFC/mL. Por último, *S. pneumoniae* en leche, se analizó tomando

100  $\mu$ L de cada concentración independiente, para incubar con 800  $\mu$ L de AuNPs-Lyd3 por 15 minutos, una vez pasado el tiempo se agregaron 100  $\mu$ L de NaCl a 1.5 M dejando la reacción por 10 min, y una vez pasado un total de 25 min se analizó por espectrofotometría, a una longitud de onda de 525 nm. Además, se tomaron 100  $\mu$ L adicionales de *S. pneumoniae* en leche, para sembrar en una placa de agar sangre al 5%, la cual se incubó a 37°C por 18 h, una vez pasado el tiempo se procedió a hacer un conteo de UFC en placa tradicional para cada concentración, resultados que fueron comparados con los obtenidos por espectrofotometría en las lecturas de *S. pneumoniae* en leche. Este experimento se analizó por triplicado para cada cepa de *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619), teniendo las mismas condiciones para todas las réplicas, una vez se obtuvieron todos los datos se procedió a hacer un análisis de regresión lineal con el software GraphPad 8. Las placas armadas para este experimento no se almacenaron.

## 14. Resultados

### 14.1 Pruebas microbiológicas para la identificación de *S. pneumoniae*

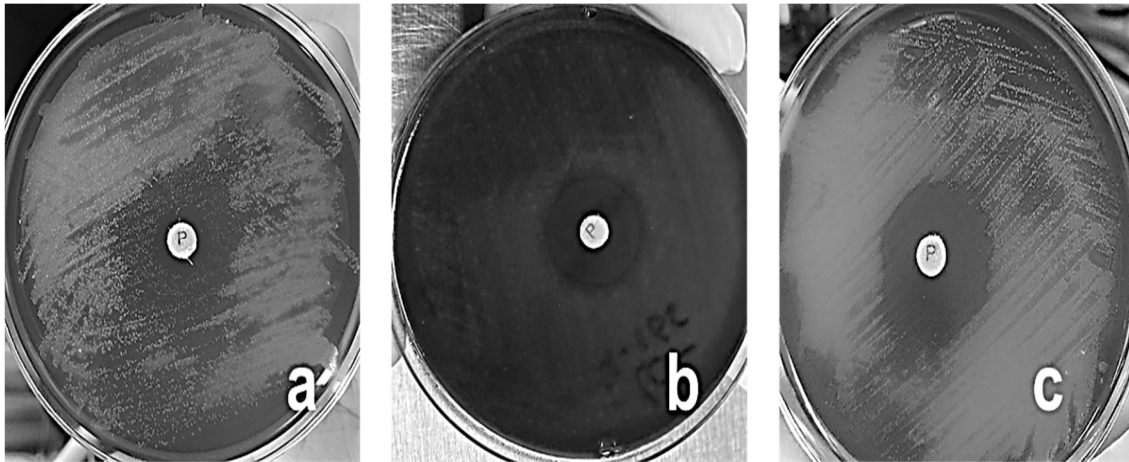
Con la finalidad de identificar las tres cepas de *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6) se realizó una tinción de Gram. El resultado de esta tinción mostró bacterias con una forma de coco, teñidas de color morado-azulado (Gram positiva), creciendo en diplococos o formando cadenas cortas de cocos (Figura16). Las características presentes en la tinción coinciden con las descripciones de la literatura (Prado, 2010).



**Figura 16. Tinción de Gram para las cepas de *S. pneumoniae*.** Se observó la tinción para a) Cepa 49619, b) Cepa TIGR4 y c) Cepa R6. La observación se realizó en un microscopio óptico de campo claro con el objetivo 40x más un zoom digital x2.

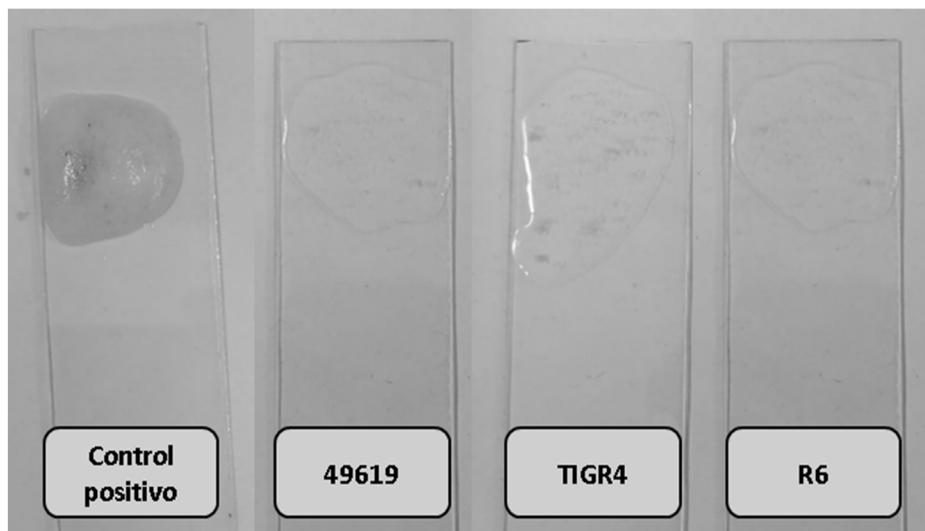
Además de haber realizado una tinción de Gram para identificar a *S. pneumoniae*, se hizo una prueba de sensibilidad a la optoquina. Por lo que se utilizó un disco de optoquina para la siembra de cada una de las tres cepas de *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6) y se midió el halo de inhibición después de 24 h. Obteniendo un diámetro de 0.14 mm para la cepa 49619, de 0.24 para la cepa TIGR4 y de 0.20 mm para la cepa R6. Este resultado fue tomado como positivo si el halo era mayor o igual a 14 mm y negativo si el halo era menor de 14 mm, lo que nos indicó que las

tres cepas son sensibles a la optoquina (Figura 17). La sensibilidad a la optoquina coincide como una de las características descritas en la literatura (Evans, 2022).



**Figura 17. Prueba de la optoquina en *S. pneumoniae*.** a) Cepa 49619. b) Cepa TIGR4. c) Cepa TIGR4. Se puede observar un halo de inhibición en el crecimiento de *S. pneumoniae* alrededor del sensidisco en las tres cepas.

Por último, se aplicó la prueba de la catalasa, en la cual se observó que el resultado para las tres cepas es negativo, ya que no hay una reacción de burbujeo al estar en contacto con el peróxido de hidrógeno. El parámetro para esta prueba fue considerar como positivo, solo si la reacción era burbujeante y fue considerado negativo cuando no se generó burbujeo (Figura 18). Ser catalasa negativa es una de las características descritas en la literatura (Prado, 2010)

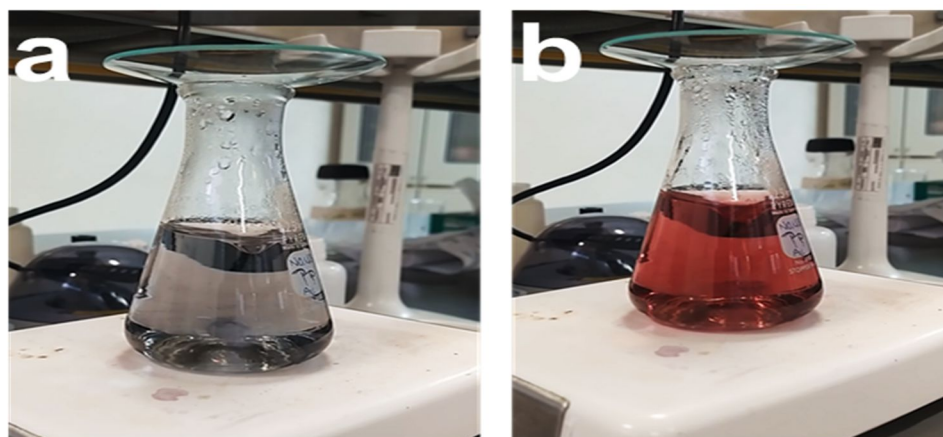


**Figura 18. Prueba de catalasa para *S. pneumoniae*.** En el primer portaobjetos tenemos a *S. aureus* como control positivo y a las tres cepas de *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6) en los portaobjetos siguientes. Se observó que, a diferencia del control positivo, las cepas de *S. pneumoniae* no presentaron burbujeos.

La suma de los resultados de las tres pruebas microbiológicas clásicas realizadas, coinciden con la presencia de *S. pneumoniae* para sus tres cepas. Según lo descrito en la literatura (Cacho *et al.*, 2007; Evans, 2022).

#### 14.2 Síntesis de nanopartículas de oro

Como se expuso en la metodología, la técnica que utilizamos fue mediante la síntesis química o método de Turkevich (Dong *et al.*, 2020), esto para la síntesis de las AuNPs empleadas en los experimentos consecuentes. La síntesis se pudo conseguir mediante el seguimiento del cambio de color de la mezcla de reacción, para lo cual usamos como agente reductor el citrato de sodio a 18 mM, el cual nos permitió formar las AuNPs a un tamaño de 20 nm, mediante el citrato de sodio, la sal de oro se redujo a oro metálico, con el que se forman las nanopartículas, las cual son distinguibles por el paso de una coloración amarilla de la solución inicial, a una coloración negra y por último rojo carmesí, proceso que fue supervisado hasta su estandarización (Figura 19).



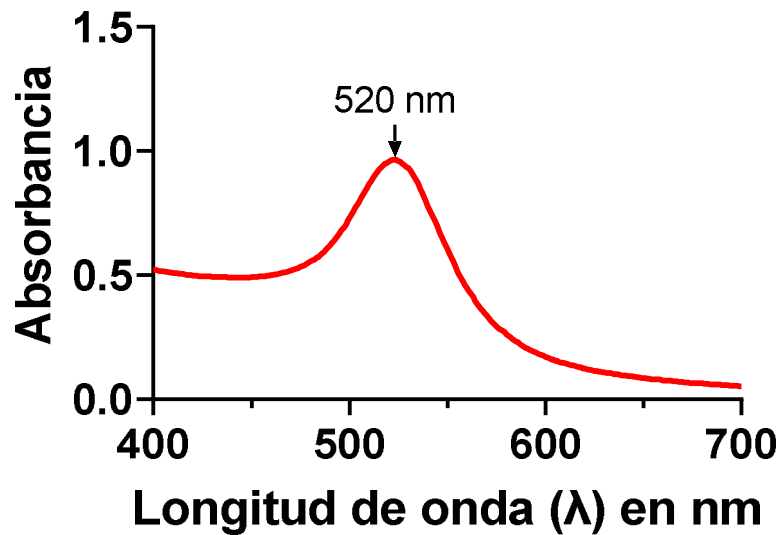
**Figura 19. Síntesis química de las AuNPs.** Al iniciar la síntesis se observó un cambio de coloración, pasando de una solución translúcida a un color gris (panel a). Minutos después del cambio de color se observó una nueva coloración pasando de gris a rojo. Al final de la síntesis se mantuvo el color rojo carmesí, que es la principal característica de las AuNPs de 20 nm (panel b).

Las AuNPs sintetizadas fueron caracterizadas por espectrofotometría, el rango que la literatura reportó para las AuNPs de 20 nm es de 218 nm a 522 nm (Grzelczak *et al.*, 2008). En este trabajo la lectura obtenida fue de 520 nm, resultado que permitió sugerir que el tamaño de la síntesis obtenida es de 20 nm (Figura 20) (Tabla 7).

**Tabla 7. Tamaño de AuNPs y la longitud de onda que se correlaciona con estas en un análisis por UV-bis**

AuNPs	Longitud <sub>min</sub> (nm)*	Longitud <sub>max</sub> (nm)*
40 nm	229	533
30 nm	524	527
20 nm	518	522

Rangos del espectro de absorción UV-visible para AuNPs de diferentes tamaños. \*Valores de referencia tomados de: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/753610>



**Figura 20. Espectro de absorción en UV-visible de las AuNPs sintetizadas.** Se realizó el espectro de absorbancia de las síntesis de AuNPs, a una  $\lambda$  de 400 a 700 nm que mostró el pico más alto a los 520 nm.

### 14.3 Rendimiento de la síntesis de AuNPs

La evaluación del rendimiento de la síntesis de AuNPs, se realizó a través de la diferencia de pesos que se obtenían antes y después de la eliminación del eluyente de las AuNPs (agua MiliQ), esto se realizó con un total de 10 microtubos por cada síntesis de AuNPs y se tomaron en cuenta un máximo de 10 síntesis. Por lo cual se analizó un total de 100 diferentes pesos promediados generando 10 resultados. De estos promedios se obtuvo el rendimiento general para cada síntesis (Tabla 8).

**Tabla 8. Promedio del rendimiento en las síntesis de las AuNPs.**

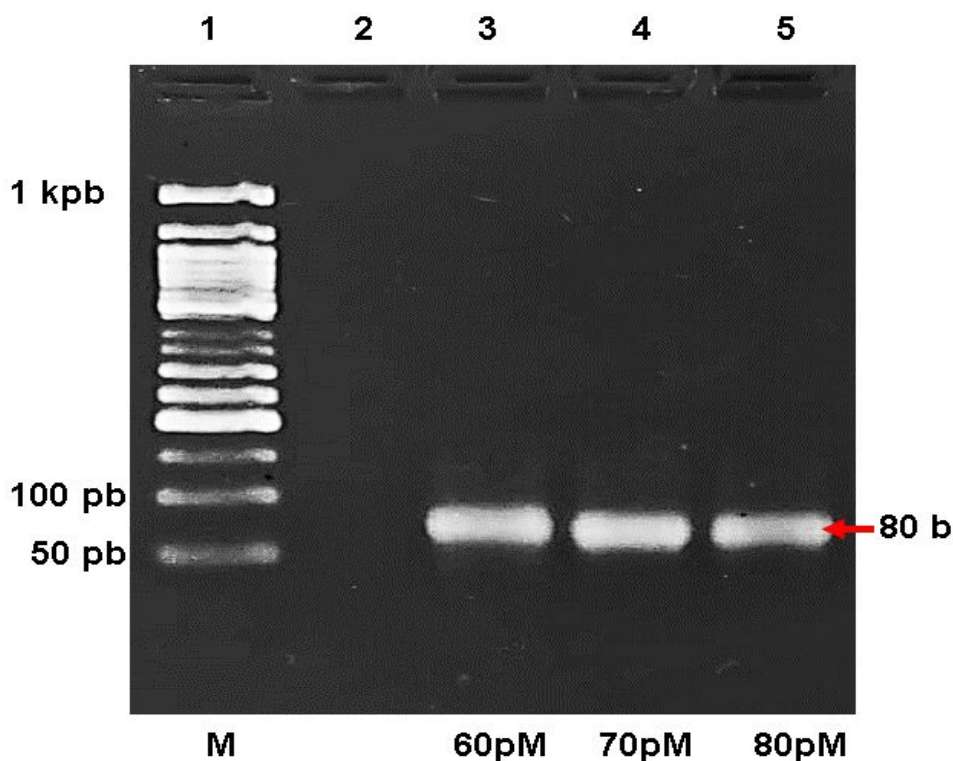
Promedio de 10 síntesis	Peso promedio de la síntesis de AuNPs ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0.69
2	0.68
3	0.67
4	0.60
5	0.59
6	0.65
7	0.70
8	0.71
9	0.62
10	0.66
<b>Promedio general de 100 síntesis</b>	0.657

Se utilizó un total de 10 síntesis promediadas para obtener un promedio final de la reacción en  $\mu\text{g/mL}$ .

El promedio total del rendimiento de la síntesis de AuNPs fue de 0.657  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 14.4 Aptámero

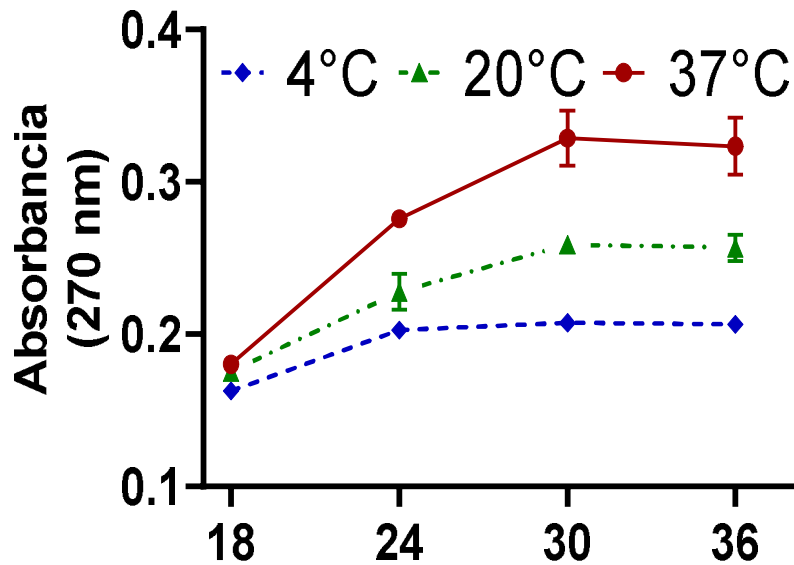
Al aptámero Lyd-3, se le realizaron una serie de modificaciones para poder permitir que se una a la superficie de la nanopartícula, la modificación más importante que se realizó con este propósito fue la de agregar un grupo tiol al extremo 3', esto permitió que las AuNPs se pueda funcionalizar con el aptámero (Tabla 5). Por lo que fue necesario determinar el tamaño y la integridad del aptámero, lo que se corroboró a través de una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 3%, el resultado demostró que el aptámero Lyd-3 estaba en una buena condición ya que no se observó degradación del aptámero en el gel (Figura 21).



**Figura 21. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 3% del aptámero Lyd-3 60 pM, 70 pM y 80 pM.** En el carril 1 se encuentra el marcador de 50 pb a 1kpb y para los carriles 3, 4 y 5 se encuentra Lyd-3 en sus diferentes concentraciones, la flecha muestra el tamaño de 80b del aptámero Lyd-3.

#### 14.5 Estandarización de las condiciones para la construcción del bioreceptor

La construcción del bioreceptor se llevó a cabo incubando 100  $\mu\text{L}$  del aptámero a una concentración de 100 nM con 500  $\mu\text{L}$  de AuNPs, para garantizar un exceso del aptámero. Posteriormente se cuantificó el aptámero unido a la AuNPs por espectrofotometría a 4°C, 20°C y 37°C a una longitud de onda de 270 nm, siendo obtenida del tiempo de hibridación en h contra la temperatura (Figura 22).

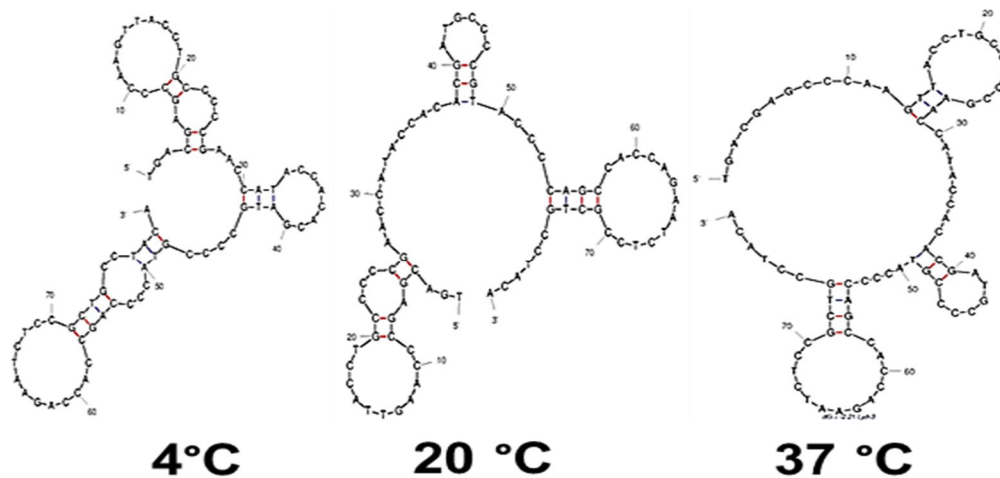


**Figura 22. Monitoreo por espectrofotometría a 270 nm de la hibridación del bioreceptor a diferentes temperaturas y tiempos de incubación.** Se analizó la absorbancia a 270 nm de la incubación del aptámero Lyd-3 con las AuNPs a 4 °C (rombo con línea azul), 20 °C (triángulo con línea verde) y 37 °C (círculo línea roja) en un tiempo de 18 h, 24 h, 30 h y 38 h, para determinar un estándar de hibridación óptimo.

El mejor resultado se obtuvo a una temperatura de 37 °C, por un periodo de 30 h de incubación (Figura 22). Este resultado, se correlacionó con las estructuras secundarias obtenidas a través del servidor *UNAFold Web Server* \* (Figura 23), donde se observa que el grupo tiol queda más expuesto a 37°C que a 4°C, permitiendo que sea más fácil la formación del enlace con las AuNPs.

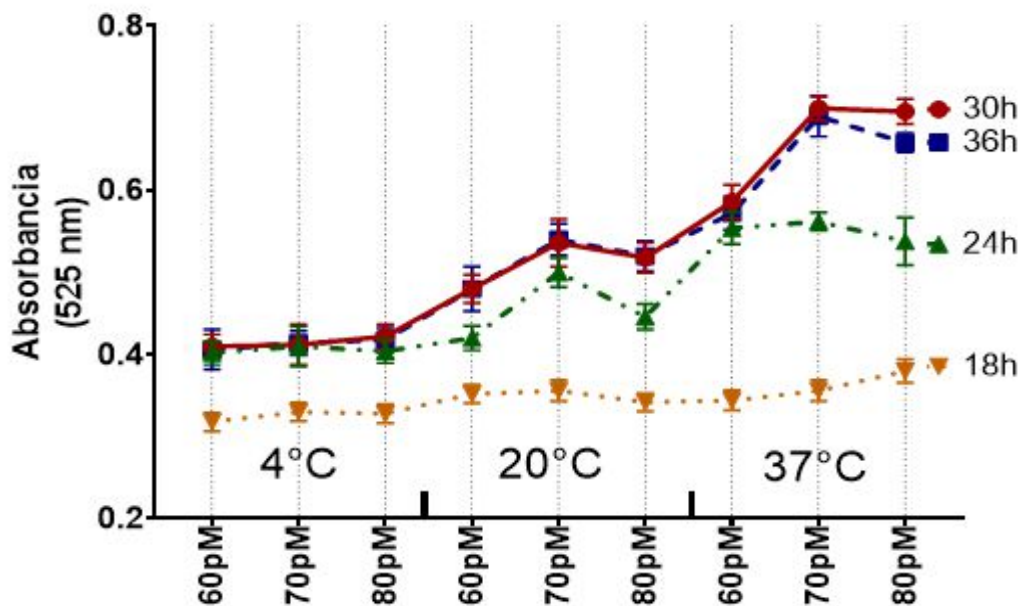
#### 14.6 Análisis computacional de las estructuras secundarias del Lyd-3

La secuencia del aptámero Lyd-3, fue modelada mediante el servidor *UNAFold Web Server* \*. El resultado reveló las estructuras secundarias características de los aptámeros a temperaturas de 4 °C, 20 °C y 37 °C (de izquierda a derecha) (Figura 23). La formación de estas estructuras secundarias permitió o negó el acceso al a la región 3', que es donde se encuentra el grupo tiol, el cual es responsable de formar la unión entre la AuNPs y el aptámero Lyd-3, esta unión fue indispensable debido a que es la base del bioreceptor.



**Figura 23. Modelaje de la estructura secundarias de Lyd-3 a 4°C, 20°C y 37°C utilizando el software UNAFold Web Server\*. En la imagen se muestran las estructuras predichas para el aptámero Lyd-3 a diferentes temperaturas (4 °C, 20 °C y 37 °C). Las estructuras se presentan con los enlaces más probables en rojo y los menos probables en negro. Además, se proporciona el número de base nitrogenada y el inicio y fin de la secuencia.**

#### 14.7 Estandarización de la concentración de Lyd-3, sobre la construcción del bioreceptor



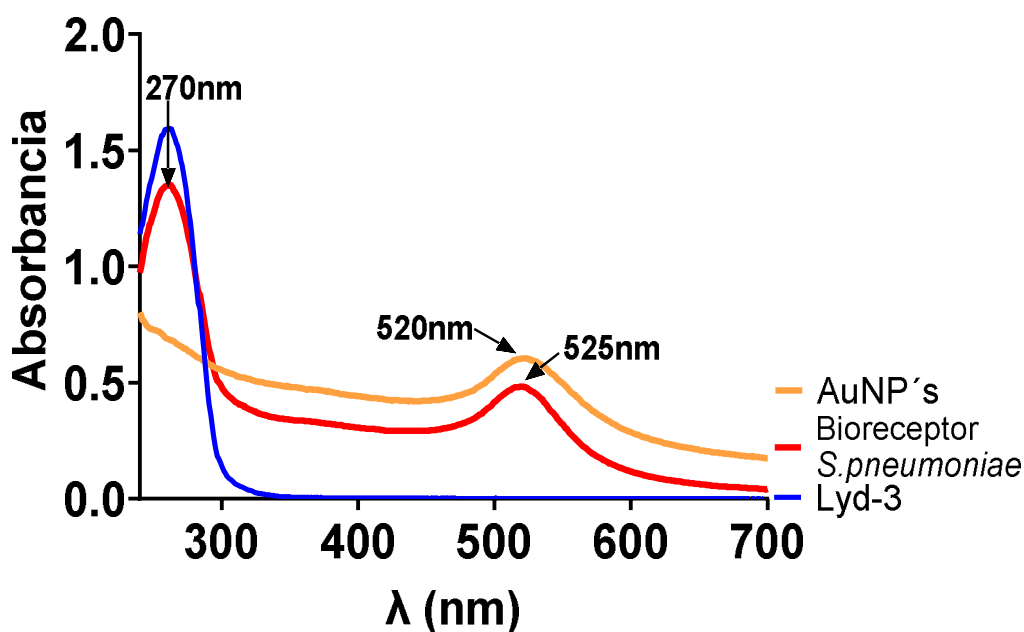
**Figura 24. Optimización de la concentración de Lyd-3 con las condiciones preestablecidas de hibridación.** Hibridación del aptámero Lyd-3 con las AuNPs a 18 h (triángulo amarillo), 24 h (triángulo verde), 30 h (círculo rojo) y 36 h (cuadrado azul) contra la concentración de Lyd-3 a 60 pM, 70 pM y 80 pM en una temperatura de 4°C, 20°C y 37°C, para determinar el óptimo de las características que nos permitió obtener una mayor formación del bioreceptor Lyd3-AuNPs, análisis por espectrofotometría a 525 nm.

Se conservan la mejor temperatura y el tiempo de hibridación preestablecidos, (Figura 22), independientemente de la concentración del aptámero Lyd-3. Sin

embargo, es importante mencionar que el mejor rendimiento de la hibridación se obtiene con una concentración de 70 pM, ya que cuando se utilizó una concentración mayor, por ejemplo, 80 pM la AuNPs tiende a mostrar una absorbancia ligeramente menor o igual, lo que se interpreta como una posible saturación de unión a las AuNPs (Figura 24). De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos asegurar que las mejores condiciones para formar el bioreceptor AuNPs-Lyd3, se obtienen a una temperatura de 37°C, por 30 h con una concentración de 70 pM de Lyd-3.

#### 14.8 Caracterización de los componentes del complejo AuNPs-Lyd3

Se realizó una caracterización del bioreceptor y de cada uno de sus componentes por espectrofotometría, para poder determinar los cambios que las AuNPs sufren en las fases de su construcción (Figura 25).

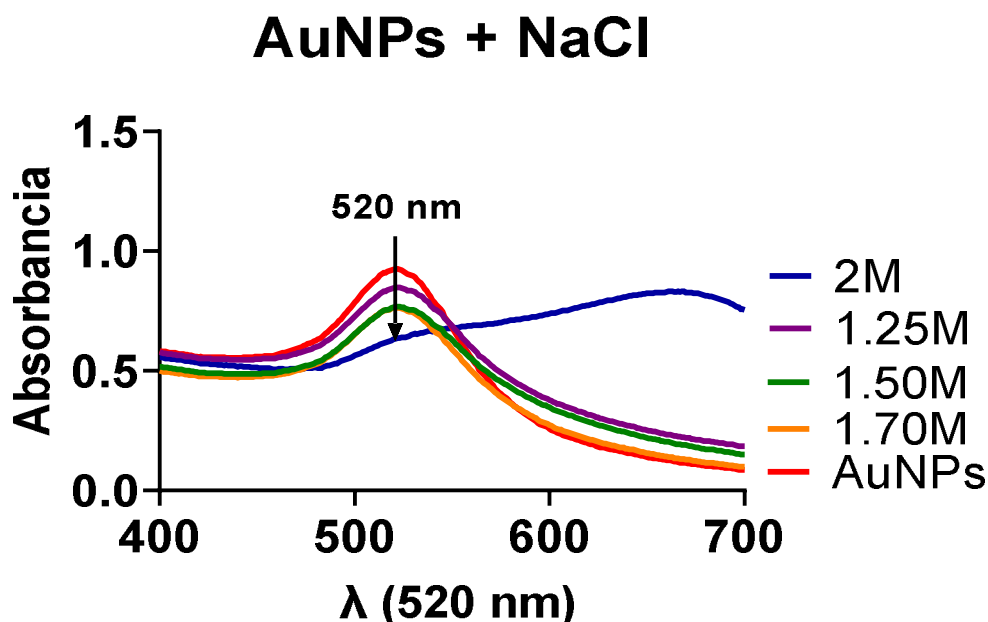


**Figura 25. Caracterización de los componentes del complejo AuNPs-Lyd3.** Espectro de absorción del bioreceptor AuNPs-Lyd3, en un rango de longitud de onda ( $\lambda$ ) 230-700 nm. Complejo AuNPs-Lyd3 (línea roja), AuNPs (línea amarilla) y aptámero Lyd-3 (línea azul). Las flechas indican la posición del pico más alto de cada elemento del bioreceptor indicado a 525nm, las AuNPs 520 nm y el Lyd-3 a 270nm.

El espectro analizado mostró que las bandas de absorción más altas fueron a 270 nm, para Lyd-3, a 520 nm para las AuNPs sin funcionalizar. Además, se observó un patrón que corresponde a la banda de absorción del bioreceptor (AuNPs-Lyd3), este tiene dos picos: uno que corresponde al aptámero (270 nm) que está unido a las AuNPs y un segundo pico a 525 nm, correspondiente a las AuNPs funcionalizadas o bioreceptor. Lo que corrobora que el bioreceptor se sintetizó es el desplazamiento del pico de 520 nm (AuNPs sin funcionalizar) a 525 nm (bioreceptor) (Figura 25).

### 14.9 preparación del amortiguador para la aglomeración de las AuNPs

Con la finalidad de inducir la aglomeración de las AuNPs, se recurrió a desestabilizarlas utilizando NaCl lo cual modificara el pH y provoca que las AuNPs se aglomeren, tornando la solución de un color rojo vino a un morado hasta llegar a un azul, estos cambios de color nos indican que las AuNPs tendrían un cambio en el tamaño cercano a los 100 nm de longitud. Se decidió utilizar diferentes concentraciones de NaCl (1.25 M, 1.5 M, 1.7 M y 2 M) con la finalidad de obtener la óptima (Figura 26).



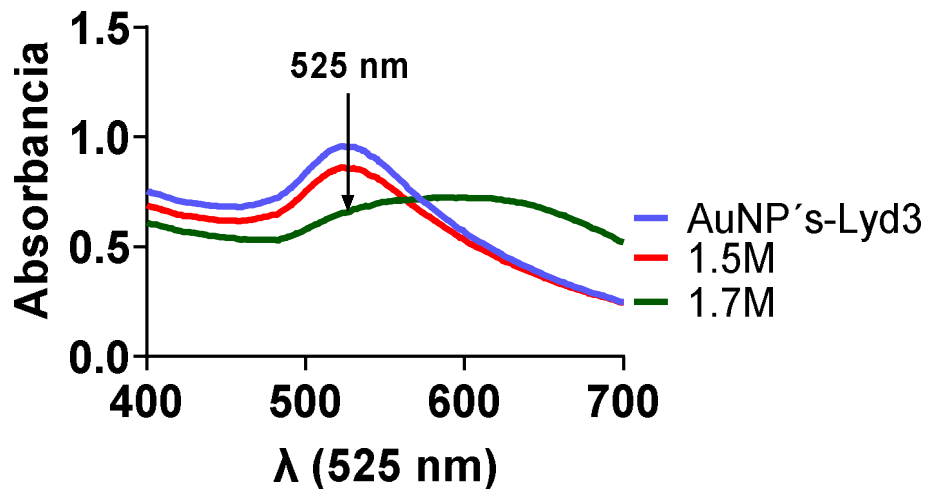
**Figura 26. Análisis por espectrofotometría de las AuNPs por el amortiguador de aglomeración a diferentes concentraciones.** Las AuNPs con un amortiguador de 1.25 M (línea morada), 1.5 M (línea verde), 1.70 M (línea amarilla) y 2 M (línea azul) y las AuNPs sin amortiguador de aglomeración (línea roja) como control. La línea recta que cruza las gráficas indica el pico máximo de longitud de onda a 520 nm para las AuNPs. Espectro de absorción en un rango de 400 nm a 700 nm.

Se obtuvieron dos valores que cumplen con las características óptimas, estos valores son 1.5 M y 1.70 M de NaCl, ya que antes de llegar a 1.5 M no hay una modificación que se denote al cambiar el equilibrio de las AuNPs, sin embargo, pasando cuando se llega a 2 M, el equilibrio se rompe por completo (Figura 26).

Las AuNPs pueden protegerse de los efectos de aglomeración, debido a la funcionalización con Lyd-3 y al ser una secuencia de ADN, confiere una carga negativa al complejo evitando que los átomos de NaCl interactúen con el oro de las AuNPs. Por lo tanto, se buscó una molaridad óptima de NaCl, que le ayude al analito a desprender el aptámero Lyd-3 y por consiguiente se aglomeren las AuNPs.

Los resultados mostraron que las concentraciones de NaCl 1.5M y 1.7M fueron las más adecuadas para llevar a cabo la aglomeración de las AuNPs (Figura 27)

## AuNPs-Lyd3 + NaCl

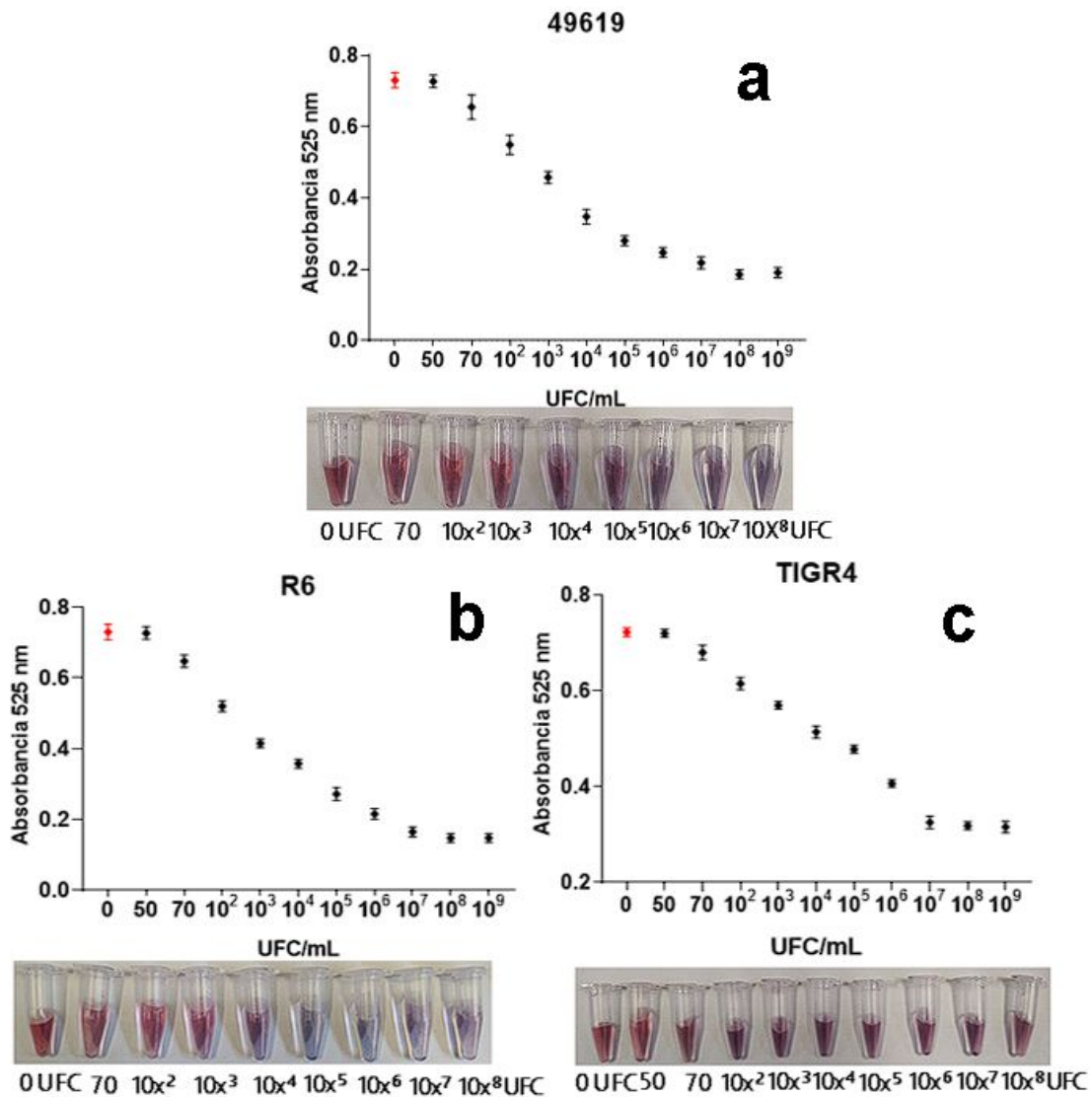


**Figura 27. Análisis por espectrofotometría de la resistencia del bioreceptor a NaCl.** El bioreceptor AuNPs-Lyd3 contra una concentración de 1.5 M (línea roja), 1.7 M (línea verde) y el bioreceptor sin NaCl (línea morada) como control. La línea recta que cruza las gráficas indica el pico máximo de longitud de onda 525 nm en el caso de AuNP's-Lyd3.

El resultado nos indica que 1.5 M de NaCl es la concentración óptima para el bioreceptor AuNPs-Lyd3 (Figura 27).

### 14.10 Interacción del complejo AuNPs-Lyd3 con *S. pneumoniae*

El bioreceptor (AuNPs-Lyd3) fue probado con las diferentes cepas de *S. pneumoniae*, para permitir que Lyd-3 reconociera a su blanco y se desprendiera de las AuNPs, induciendo su aglomeración, lo cual se pudo corroborar observando un cambio de color del rojo al azul. Este viraje de tonalidad pudo ser cuantificable a través de espectrofotometría, midiendo la OD a una longitud de onda de 525 nm. La cuantificación de la disminución del complejo AuNPs-Lyd3, se realizó para la interacción con las tres cepas de *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619), cambio que se analizó desde en las siguientes concentraciones: 0 UFC/mL, 50 UFC/mL, 70 UFC/mL,  $10^2$  UFC/mL,  $10^3$  UFC/mL,  $10^4$  UFC/mL,  $10^5$  UFC/mL,  $10^6$  UFC/mL,  $10^7$  UFC/mL hasta  $10^8$  UFC/mL (Figura 28).



**Figura 28. Análisis de absorbancia por espectrofotometría a 525nm para determinar la exposición de AuNPs-Lyd3 a las tres cepas de *S. pneumoniae* en diferentes cantidades de UFC/mL. a) *S. pneumoniae* cepa 49619 b) *S. pneumoniae* cepa R6 c) *S. pneumoniae* cepa TIGR4. Para las tres cepas se puede denotar un cambio colorimétrico originado por la separación del complejo AuNPs-Lyd3 en presencia de *S. pneumoniae* en un rango de 0 UFC a 10<sup>8</sup> UFC.**

Este bioreceptor es capaz de identificar a *S. pneumoniae* para sus tres cepas a partir de 70 UFC/mL y hasta 10<sup>7</sup> UFC/mL, ya que posteriormente a esta cantidad, tenemos una saturación del sistema. Interesantemente este resultado también se puede observar visualmente a partir de 70 UFC/mL en donde observamos el cambio de rojo a azul, que se mantiene posterior a 10<sup>7</sup> UFC/mL (Figura 28).

Podemos resaltar que el bioreceptor fue capaz de detectar un mínimo de 70 UFC/mL y hasta un máximo de 10<sup>7</sup>UFC/mL, este resultado es similar y repetible para las tres cepas de *S. pneumoniae*.

### 14.11 Interacción de *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619) y diferentes bacterias como control negativo con AuNPs-Lyd3

El complejo AuNPs-Lyd3 fue expuesto a una variedad de cepas de bacterias diferentes Tabla 8, para determinar si la especificidad del bioreceptor es aceptable para discriminar bacterias que causan patologías similares al cuadro clínico de *S. pneumoniae*, como la neumonía, la meningitis, la otitis media entre otras (Tabla 8) (Figuras 29, 30 y 31).

Tabla 9. Selección de las cepas bacterianas como control negativo y su relación con *S. pneumoniae*, de acuerdo con la enfermedad que pueden provocar.

Bacteria	Neumonía	Meningitis	Otitis Media	Bacteriemia	No relación
<i>K. pneumoniae</i>	✘				
<i>S. aureus</i>			✘		
<i>H. influenzae</i>		✘			
<i>S. mutans</i>				✘	
<i>S. epidermidis</i>					✘

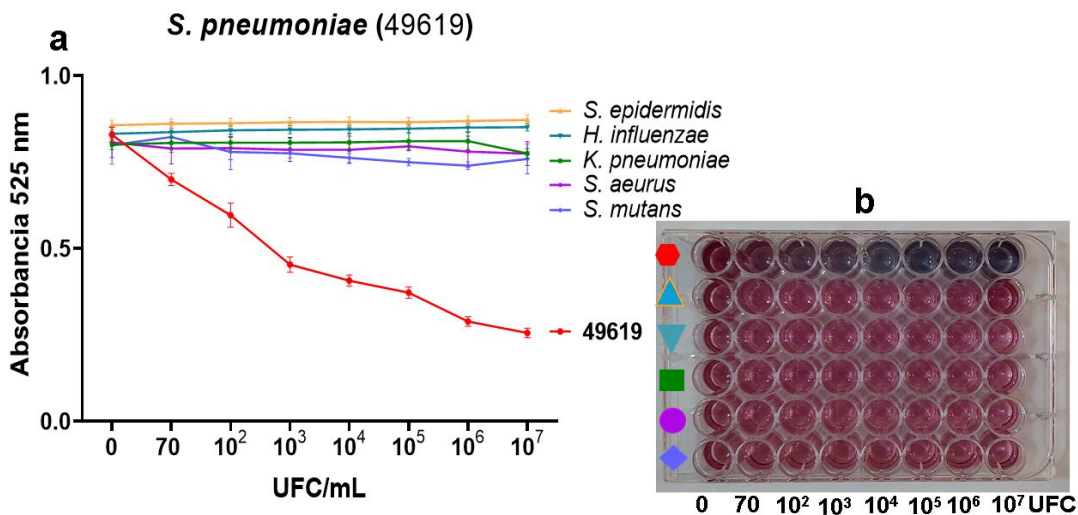
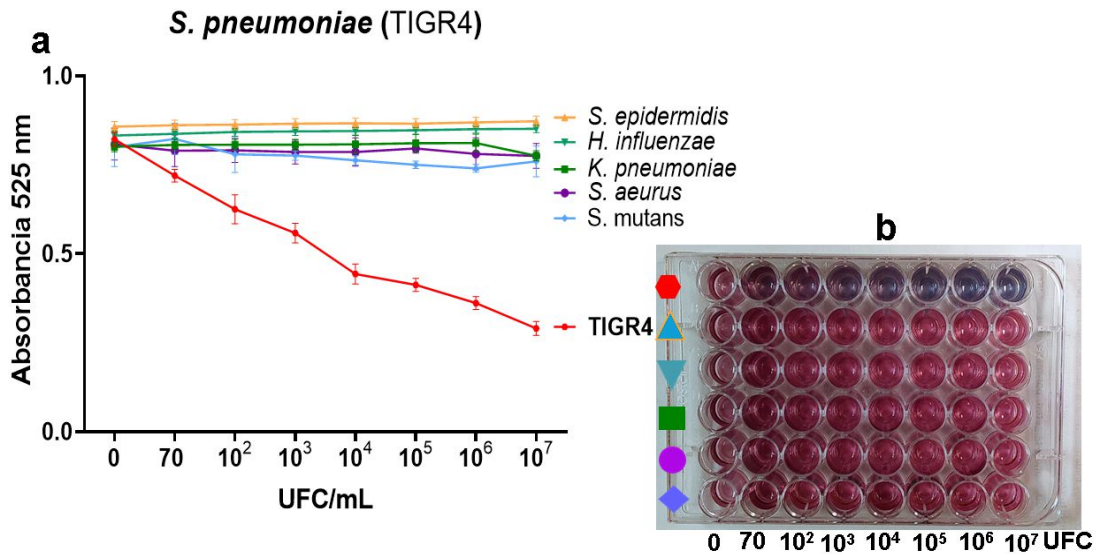
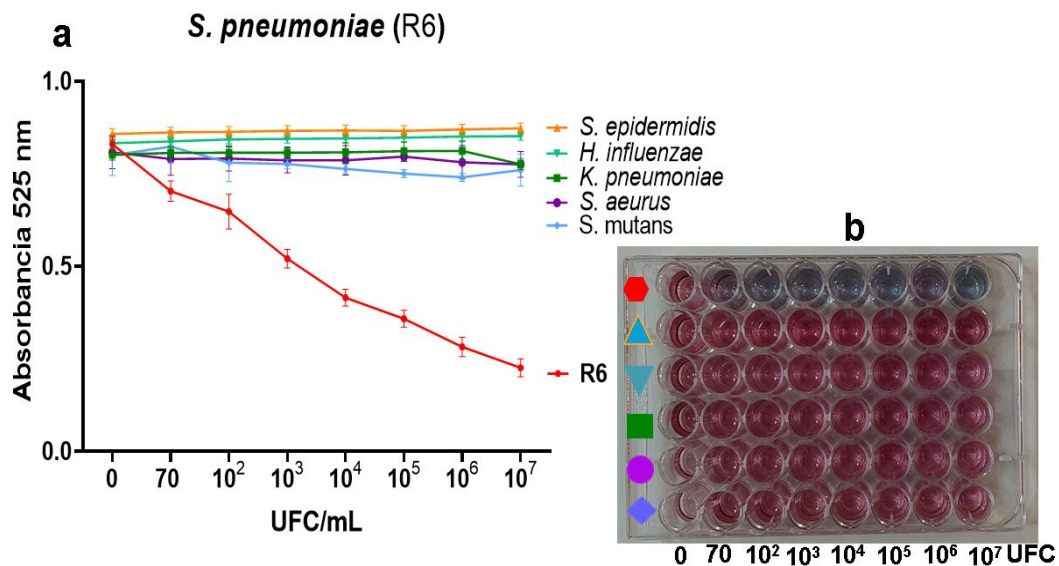


Figura 29. Actividad del complejo AuNPs-Lyd3 en presencia de *S. pneumoniae* (49619) y diferentes bacterias relacionadas al cuadro de enfermedades de la bacteria blanco. a) Análisis de absorbancia a 525 nm del complejo AuNPs-Lyd3 contra *S. pneumoniae* (49619) (hexágono color rojo), *S. epidermidis* (triángulo arriba color amarillo), *H. influenzae* (triángulo abajo color turquesa), *K. pneumoniae* (cuadrado color verde), *S. aureus* (círculo color rosa), *S. mutans* (rombo color morado). b) Placa de 96 pozos con la reacción colorimétrica del análisis del apartado a), podemos observar una reacción colorimétrica del complejo AuNPs-Lyd3 únicamente para la bacteria blanco *S. pneumoniae* (49619).



**Figura 30. Actividad del complejo AuNPs-Lyd3 en presencia de *S. pneumoniae* (TIGR4) y diferentes bacterias relacionadas al cuadro de enfermedades de la bacteria blanco.** a) Análisis de absorbancia a 525nm del complejo AuNPs-Lyd3 contra *S. pneumoniae* (TIGR4) (hexágono color rojo), *S. epidermidis* (triángulo arriba color amarillo), *H. influenzae* (triángulo abajo color turquesa), *K. pneumoniae* (cuadrado color verde), *S. aureus* (círculo color rosa), *S. mutans* (rombo color morado). b) Placa de 96 pozos con la reacción colorimétrica del análisis del apartado a), podemos observar una reacción colorimétrica del complejo AuNPs-Lyd3 únicamente para la bacteria blanco *S. pneumoniae* (TIGR4).

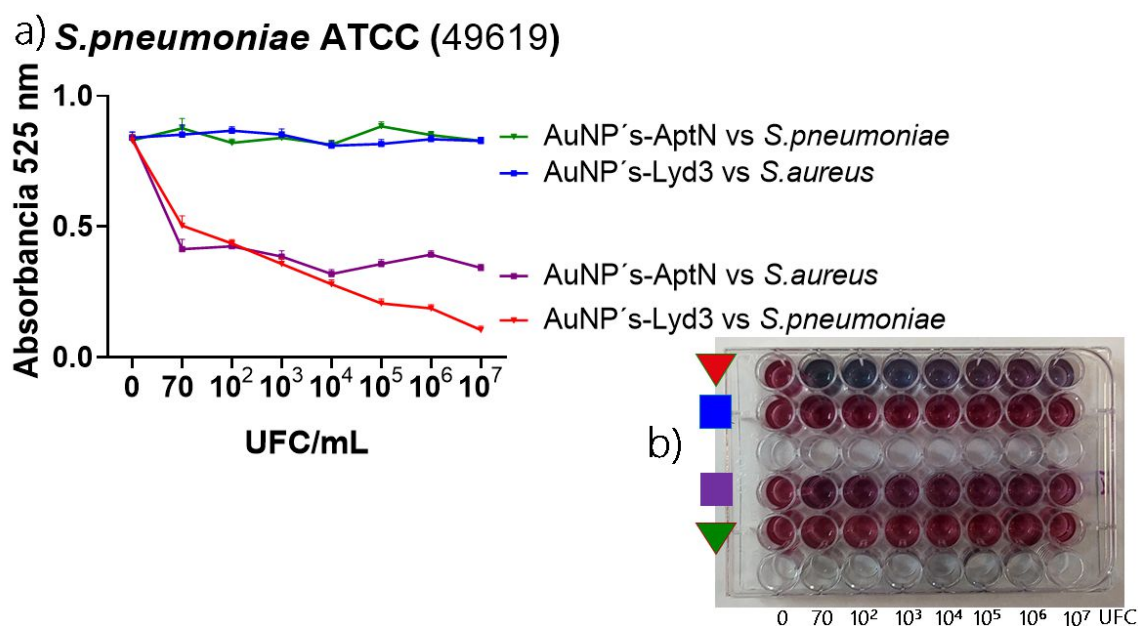


**Figura 31. Actividad del complejo AuNPs-Lyd3 en presencia de *S. pneumoniae* (R6) y diferentes bacterias relacionadas al cuadro de enfermedades de la bacteria blanco.** a) Análisis de absorbancia a 525nm del complejo AuNPs-Lyd3 contra *S. pneumoniae* (R6) (hexágono color rojo), *S. epidermidis* (triángulo arriba color amarillo), *H. influenzae* (triángulo abajo color turquesa), *K. pneumoniae* (cuadrado color verde), *S. aureus* (círculo color rosa), *S. mutans* (rombo color morado). b) Placa de 96 pozos con la reacción colorimétrica del análisis del apartado a), podemos observar una reacción colorimétrica del complejo AuNPs-Lyd3 únicamente para la bacteria blanco *S. pneumoniae* (R6).

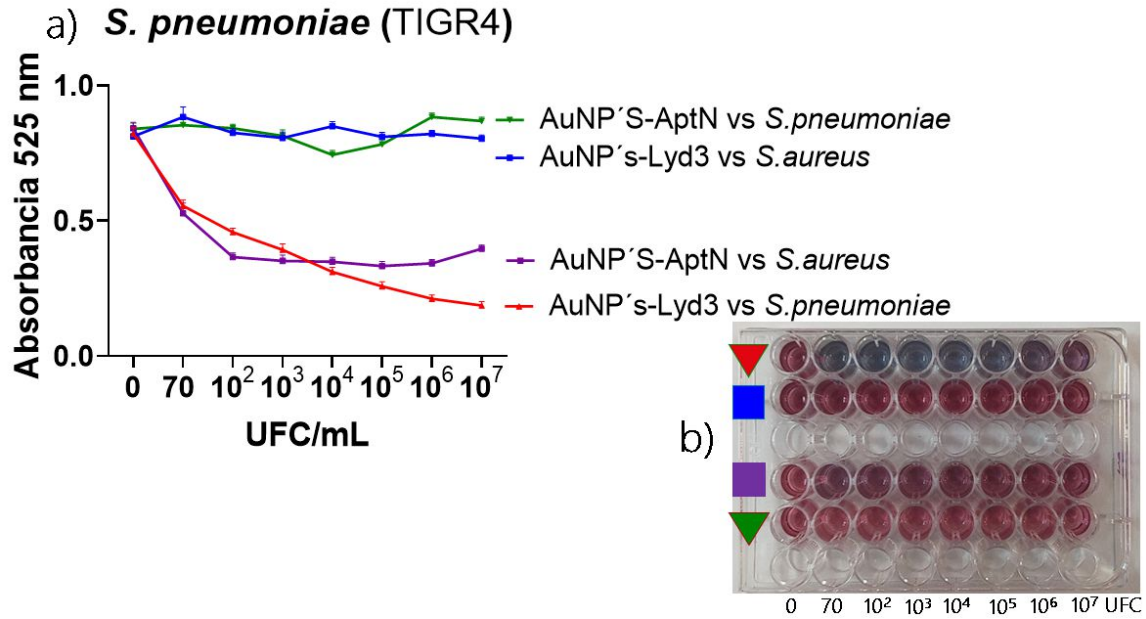
El bioreceptor AuNPs-Lyd3 fue capaz de identificar únicamente a *S. pneumoniae* en sus tres cepas, partiendo de un mínimo de 70 UFC/mL hasta  $10^7$  UFC/mL, a partir de ahí nuestro complejo presenta una saturación, comportamiento que es similar para las tres cepas diferentes de *S. pneumoniae*.

#### 14.12 Especificidad del aptámero Lyd-3 contra el aptámero DTMRSA1 (control negativo)

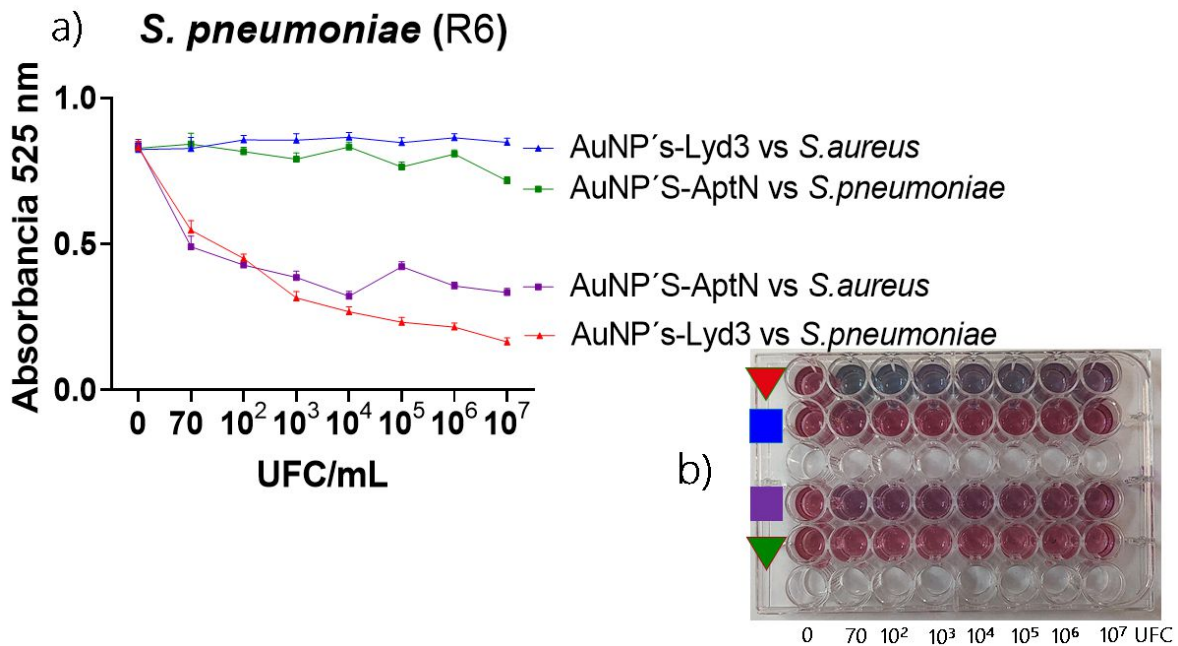
Con la finalidad de comprobar la especificidad del aptámero Lyd3, se probó el biosensor utilizando como control negativo un aptámero inespecífico (DTMRSA1, este reconoce a *S. aureus*). Este aptámero modificado, no reconoce a *S. pneumoniae*, solo a su blanco específico (*S. aureus*) (Figuras 32, 33 y 34).



**Figura 32. Especificidad del aptámero Lyd-3 contra el aptámero DTMRSA1 (control negativo) para *S. pneumoniae* (49619).** Se muestra la especificidad de los complejos formados por los aptámero Lyd-3 contra el aptámero DTMRSA1 (control negativo) para *S. pneumoniae* (49619). En la imagen a), se presenta el análisis de la absorbancia a 525 nm del complejo AuNPs-Lyd3 contra *S. pneumoniae* (triángulo, color rojo) y *S. aureus* (cuadrado, color azul), y el complejo AuNPs-AptN contra *S. pneumoniae* (triángulo, color verde) y *S. aureus* (cuadrado, color morado). En la imagen b) se muestra una placa de 96 pozos con la reacción colorimétrica del análisis presentado en la imagen a). Se observó que solo se produjo una reacción colorimétrica en los complejos con sus correspondientes blancos.



**Figura 33. Especificidad del aptámero Lyd-3 contra el aptámero DTMRSA1 (control negativo) para *S. pneumoniae* (TIGR4).** Se muestra la especificidad de los complejos formados por los aptámero Lyd-3 contra el aptámero DTMRSA1 (control negativo) para *S. pneumoniae* (TIGR4). En la imagen a), se presenta el análisis de la absorbancia a 525 nm del complejo AuNPs-Lyd3 contra *S. pneumoniae* (triángulo, color rojo) y *S. aureus* (cuadrado, color azul), y el complejo AuNPs-AptN contra *S. pneumoniae* (triángulo, color verde) y *S. aureus* (cuadrado, color morado). En la imagen b) se muestra una placa de 96 pozos con la reacción colorimétrica del análisis presentado en la imagen a). Se observó que solo se produjo una reacción colorimétrica en los complejos con sus correspondientes blancos.



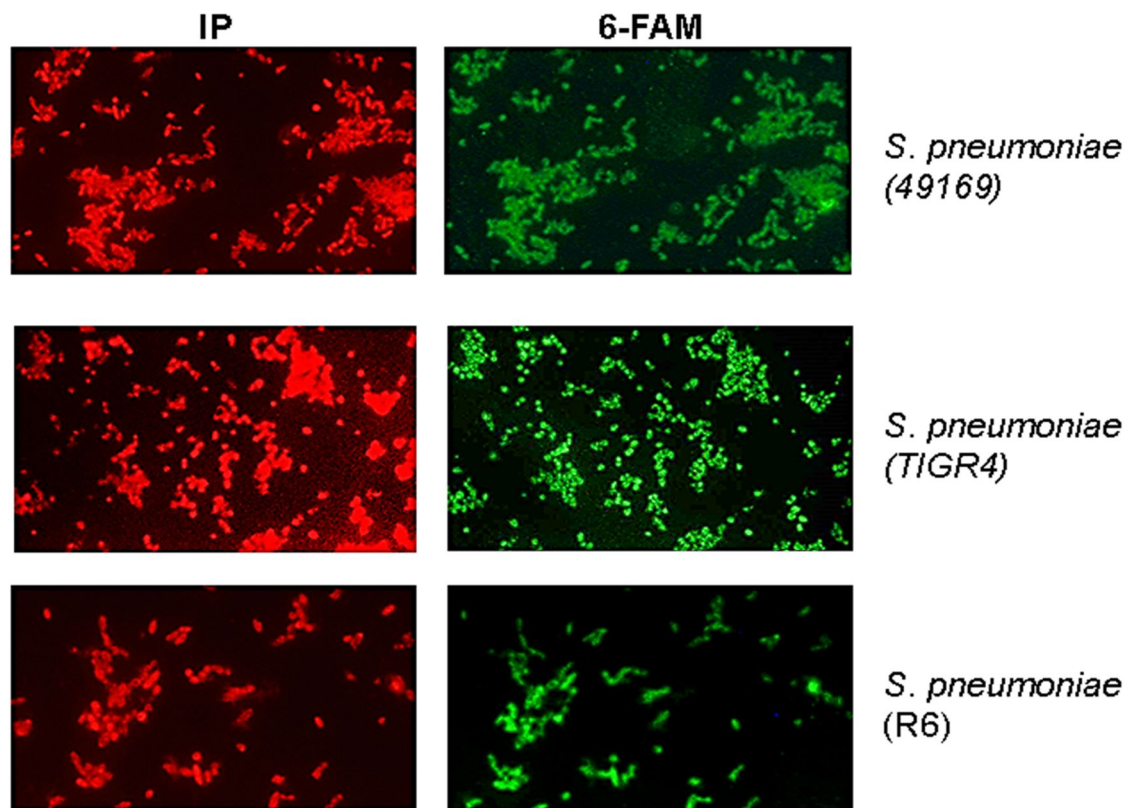
**Figura 34. Especificidad del aptámero Lyd-3 contra el aptámero DTMRSA1 (control negativo) para *S. pneumoniae* (R6).** Se muestra la especificidad de los complejos formados por los aptámero Lyd-3 contra el aptámero DTMRSA1 (control negativo) para *S. pneumoniae* (R6). En la imagen a),

se presenta el análisis de la absorbancia a 525 nm del complejo AuNPs-Lyd3 contra *S. pneumoniae* (triángulo, color rojo) y *S. aureus* (cuadrado, color azul), y el complejo AuNPs-AptN contra *S. pneumoniae* (triángulo, color verde) y *S. aureus* (cuadrado, color morado). En la imagen b) se muestra una placa de 96 pozos con la reacción colorimétrica del análisis presentado en la imagen a). Se observó que solo se produjo una reacción colorimétrica en los complejos con sus correspondientes blancos.

La especificidad del aptámero Lyd-3 fue confirmada mediante la prueba de un control negativo, el complejo AuNPs-DTMRSA1. Este complejo no mostró capacidad de unirse a *S. pneumoniae*, lo que demuestra que Lyd-3 se une de manera específica al neumococo.

#### 14.13 Microscopías de fluorescencia para *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619)

La interacción entre el bioreceptor y la superficie de la bacteria fue visualizada mediante microscopía de fluorescencia, para lo cual se utilizó el aptámero Lyd-3 con 6-FAM se prepararon laminillas con las tres cepas de *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619) y se le agregó el bioreceptor fluorescente, para poder observar en el microscopio (Zeiss Axio Imager Z2) (Figura 35).



**Figura 35. Detección de la interacción entre el bioreceptor fluorescente y las cepas de *S. pneumoniae*.** Se muestra la detección de la interacción entre el bioreceptor fluorescente y las tres cepas de *S. pneumoniae*. En el lado izquierdo se puede observar la tinción en rojo de las cepas con IP (~615 nm), que se utilizó como control de presencia, y en el lado derecho se muestra la fluorescencia en verde obtenida de 6-FAM (~517 nm). La imagen fue obtenida con un objetivo de 100x y un zoom digital de 2x.

Se observó una interacción positiva entre el bioreceptor fluorescente Lyd-3 y las tres cepas de *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619). Este resultado proporcionó una confirmación visual sobre la interacción de nuestro biosensor con la bacteria objetivo.

#### 14.14 Microscopias de fluorescencia usando bacterias inespecíficas (control negativo)

A través del uso de controles negativos, se corroboró la especificidad del bioreceptor Lyd-3, este fue retado contra: *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *H. influenzae* y *S. mutans*, utilizando como control de presencia de la bacteria IP (Figura 36).

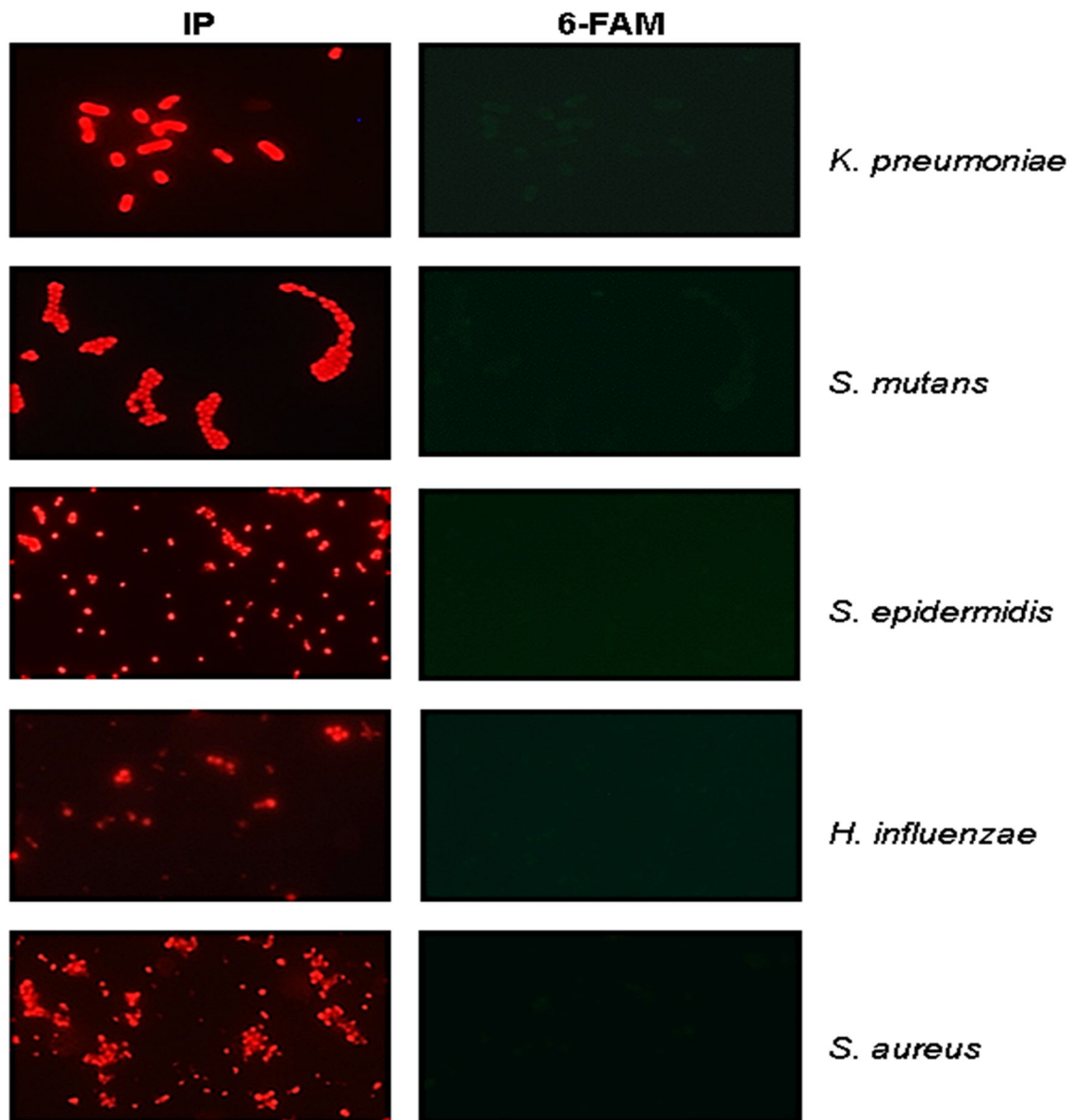


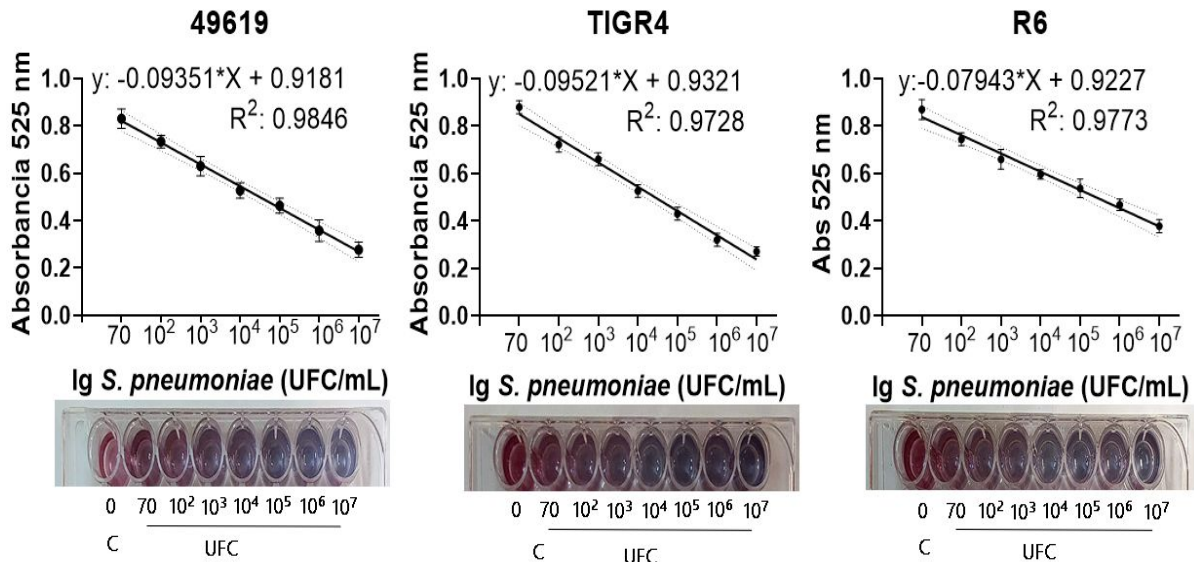
Figura 36. Detección de la interacción entre el bioreceptor fluorescente y bacterias no relacionadas (controles negativos). En la imagen del lado izquierdo, se puede ver la tinción en

rojo de las cepas con IP (~615 nm), que se utilizó como control de presencia, y la fluorescencia en verde obtenida de 6-FAM (~517 nm), que se muestra en el lado derecho. La imagen tiene un objetivo de 100x y un zoom digital de 2x.

El resultado obtenido confirmó la alta especificidad del bioreceptor Lyd-3 para *S. pneumoniae* de manera visual, ya que cuando se desafió al bioreceptor contra cepas no relacionadas, no se detectó fluorescencia en 6-FAM. Sin embargo, se confirmó la presencia de la bacteria mediante el uso de IP.

#### 14.15 Curva de correlación estándar entre la intensidad de la señal a 525 nm y la concentración de *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6)

Con la finalidad de obtener una relación entre las UFC y la OD, se realizó una cuantificación a 525 nm por espectrofotometría, de las cantidades de UFC para las tres cepas de *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619) en un rango de 70 a 10<sup>7</sup> UFC (Figura 38).

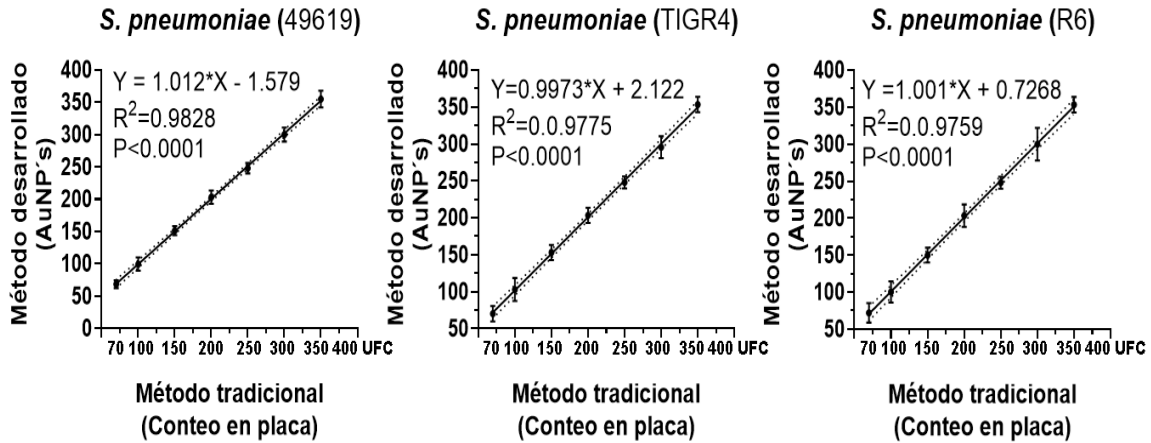


**Figura 37. Relación lineal de las UFC de *S. pneumoniae* (TIGR4, R6 y 49619), contra la absorbancia a 525 nm.** Se demostró la relación lineal entre la absorbancia a 525 nm y el número de UFC para cada cepa de *S. pneumoniae*, relación que nos proporcionó la ecuación de la recta y la R<sup>2</sup>, en la parte inferior se colocó una muestra visual del cambio colorimétrico de dicha relación para cada cepa de *S. pneumoniae*.

Los resultados mostraron una relación inversamente proporcional entre la cantidad de bacterias y la OD, ya que a medida que aumentó el número de UFC, disminuyó la OD. Este resultado obtuvo una R<sup>2</sup> de 0.9846 para la cepa 49619, una R<sup>2</sup> de 0.9728 para la cepa TIGR4 y, por último, una R<sup>2</sup> de 0.9773 para la cepa R6, lo que nos indicó un resultado significativo para las tres cepas de *S. pneumoniae*, ya que es mayor a 0.95, y el R<sup>2</sup> es significativo en estudios biológicos, ya que se trata de un coeficiente de determinación y los resultados obtenidos indican que hay un buen ajuste al modelo diseñado.

#### 14.16 Curva de correlación estándar entre el método de cuantificación clásico y el biosensor para detectar a *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6)

Los resultados estandarizados para determinar la cantidad de UFC por OD para *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6), fueron contrastados con la metodología de detección por UFC, donde analizó cada muestra por conteo en placa y mediante el biosensor (Figura 39).



**Figura 38. Relación entre el biosensor AuNPs-Lyd3 y el método de conteo en placa para la detección de *S. pneumoniae*.** Se comparó las UFC que contabilizó el biosensor propuesto contra las UFC que contabilizó la metodología tradicional de conteo en placa, relación que nos proporcionó la ecuación de la recta, la R<sup>2</sup> y la P, para cada cepa de *S. pneumoniae*.

Los resultados que fueron obtenidos nos indicaron una comparativa significativa para las tres cepas de *S. pneumoniae*, con una R<sup>2</sup> de 0.9828 para la cepa 49619, una R<sup>2</sup> de 0.9775 para la cepa TIGR4 y, por último, una R<sup>2</sup> de 0.9759 para la cepa R6. En las tres cepas, se obtuvo un resultado mayor a 0.95, que es significativo en estudios biológicos, ya que se trata de un coeficiente de determinación y los resultados obtenidos indican que hay un buen ajuste al modelo diseñado.

El último resultado indicó que, ya sea utilizando el biosensor o la técnica tradicional, se obtendrán los mismos resultados, con la única diferencia de que el proceso toma sólo 25 minutos para el biosensor en comparación con las 48 horas de rigor para el recuento en placa.

## 15. Discusión

En esta investigación, se abordó el diseño y el desarrollo de un biosensor, el cual es notable en su tipo, formando parte de la clasificación de aptásensores colorimétricos según la categorización que se describió en la literatura (Mendoza-Madrigal *et al.*, 2013; Mehrotra, 2016). Esta investigación permitió recopilar las más novedosas técnicas para el desarrollo de biosensores, como lo es el uso de las AuNPs y la interpretación de las marcas colorimétricas, lo cual nos proporcionó información visual, que se tradujo a un dato cuantificable, sin olvidar el efecto potenciador que las AuNPs ejercieron en la interpretación de los resultados (Jia *et al.*, 2016), dentro de este biosensor se usó un aptámero, que se considera la molécula más relevantes capaz de reemplazar a los anticuerpos desde el punto de vista de la especificidad y sensibilidad (Seok *et al.*, 2016; Gutiérrez-Santana *et al.*, 2020).

Se logró sintetizar AuNPs de 20 nm a través de la reacción de reducción de Turkevich (Dong *et al.*, 2020). Estas AuNPs fueron caracterizadas por espectrofotometría y el resultado que se obtuvo correspondió a 520 nm, lo cual es concordante con la literatura para las AuNPs de 20 nm (Grzelczak *et al.*, 2008), así mismo hay ejemplos que llevan a cabo la síntesis por reducción de AuNPs y que caracterizan las AuNPs por espectrofotometría los cuales obtiene un rango de resultados de 218 nm a 222 nm (Wang *et al.*, 2015; Gutiérrez-Santana *et al.*, 2020; Atapour *et al.*, 2022; Hegde *et al.*, 2022). Las AuNPs sintetizadas se preservaron a 4 °C, en un tiempo no mayor a una semana debido a que posterior a este periodo, se aglomeran y sedimentan (Xiao *et al.*, 2022), sin embargo, cuando estas se funcionalizan con el aptámero Lyd-3, el tiempo de preservación aumentaba a un mes (Alsager *et al.*, 2018).

Se utilizó el aptámero Lyd-3 (Bayraç and Donmez, 2018), con dos modificaciones adicionales (Tabla 5). La primera modificación fue el grupo thiol, ya que este permitió unir a Lyd-3 a la superficie de las AuNPs a través de un enlace sulfuro, lo que proporcionó estabilidad, pero la suficiente maleabilidad para la separación en presencia de *S. pneumoniae*, características del enlace sulfuro con los átomos de las AuNPs (García-Melo *et al.*, 2019). En la segunda modificación de Lyd-3 se le adiciona un grupo FAM-6 en el extremo 5', ya que este es un fluoróforo que permitió observar la unión del bioreceptor a *S. pneumoniae*. Para determinar la integridad de Lyd-3 con las modificaciones que fueron agregadas, realizamos una electroforesis con una concentración de agar al 3% (Figura 21), la cual permitió conocer que Lyd-3, se encontró íntegro, ya que las bandas corresponden a 80 b, característica descrita (Bayraç and Donmez, 2018).

Teniendo los dos elementos base del bioreceptor (AuNPs y Lyd-3), el siguiente paso fue unirlos. Para lo cual se usó un rango de tres temperaturas de incubación del aptámero Lyd-3 con las AuNPs (4 °C, 20 °C y 37°C) y además se utilizó otro rango

para el tiempo de exposición (18 h, 24 h, 30 h y 36 h) (Figura 22). Las características óptimas para la construcción del bioreceptor AuNPs-Lyd-3 fueron 37 °C, por un tiempo de 30 h. Cuando se utilizó un rango menor de temperatura, el aptámero no logró exponer el grupo tiol de manera eficiente (Figura 23), esto se interpretó ya que se realizó un análisis computacional a través del software UNAFold Web Server, el cual permitió predecir las estructuras secundarias del aptámero Lyd-3 para las diferentes temperaturas (4 °C, 20 °C y 37°C). Este resultado corroboró porque la temperatura óptima fue a 37 °C, mostrando que las estructuras formadas a esta temperatura permitieron que el grupo tiol sea expusiera en su totalidad, quedando libre para interactuar con las AuNPs; a diferencia de las otras temperaturas que encierran al grupo tiol, disminuyendo la exposición con las AuNPs, la formación de las estructuras secundarias, es independiente para cada aptámero ya que estas estructuras pueden ser determinadas por sus bases nitrogenadas y el orden en el que se presentan en la secuencia (Alsager *et al.*, 2018; Bosak *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021). Adicional a ello, el rango de tiempo que se utilizó permitió determinar que el óptimo corresponde a las 30 h, ya que antes de este se obtuvo un valor menor a 0.3 de OD, en un análisis por espectrofotometría a 525 nm y mayor a este tiempo se observó una saturación del complejo, este comportamiento es similar a los resultados que fueron presentados en la estandarización del aptásensor colorimétrico para T-2 (Zhang *et al.*, 2021), donde al estandarizar las condiciones de unión a la AuNPs por parte de su aptámero sufrieron de una saturación de esta unión, presentando resultados que no sobrepasan el 0.3 de OD (Kim *et al.*, 2011; Alsager *et al.*, 2018). Debido a la saturación de la unión de las AuNPs y Lyd-3 la OD más alta llegó a un rango de 0.3, esto es debido a que para la estandarización de estas variables se utilizó una concentración alta de aptámero Lyd-3 (100 nM), lo que permitió garantizar la unión (Figura 22). Sin embargo, una vez que tuvimos la certeza de las mejores condiciones se buscó optimizar la concentración de aptámero Lyd-3 para aumentar la formación de complejo AuNPs-Lyd-3, para ello se utilizaron las siguientes concentraciones 60 pM, 70 pM y 80 pM (Figura 24). Este resultado mostró la mejora en la obtención del producto total del complejo, ya que la OD aumentó a 0.7, duplicando la cantidad de bioreceptor obtenido manteniendo las condiciones óptimas preestablecidas, determinando que la mejor concentración correspondió a 70 pM, bajo una temperatura de 37 °C y un tiempo de incubación de 30 h. Estas condiciones son similares a bioreceptores que encontramos en la literatura, basados en AuNPs y aptámeros, donde hay variaciones que van desde los 4 °C a los 37°C, por tiempos desde las 20 h hasta las 48 h y concentraciones desde los 10 pM a los 200 nM (Yuan, Wu, *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021; Atapour *et al.*, 2022; Xiao *et al.*, 2022)

Para confirmar la unión de los dos elementos base, se caracterizó la formación del complejo a través de espectrofotometría de campo amplio, la cual permitió determinar la unión del grupo tiol de Lyd-3 a la superficie de las AuNPs (Figura 25), donde se observó el desplazamiento de la medición de las AuNPs, pasando de 520 nm a los 525 nm, este desplazamiento fue una particularidad de la unión de dos

elementos. El desplazamiento del pico de la gráfica, al modificar las AuNPs es un comportamiento registrado en la literatura, sean aptámeros, anticuerpos o algún compuesto que se una a la superficie de las AuNPs. Este rango de desplazamiento varió desde los 5 nm a los 50 nm (Perumal and Hashim, 2014; Yuan *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). La caracterización de la formación del complejo AuNPs-Lyd3 y sus elementos, nos permitió conocer Lyd-3 se unió con éxito a las AuNPs, lo que representó la base de la construcción del biosensor, ya que es el bioreceptor aquel que lleva a cabo el reconocimiento del analito con el blanco de interés (Mendoza-Madrigal *et al.*, 2013; Mehrotra, 2016).

Si bien recordamos que las AuNPs, actuaron como vehículo para Lyd-3 en la formación del complejo, también hay que mencionar que estas cumplieron un papel como reporteras colorimétricas, para observar un efecto visual sin la necesidad de algún equipo adicional. Existen diferentes metodologías que se han utilizado para emplear las AuNPs como un reportero colorimétrico. En algunas de estas las AuNPs pueden formar grandes complejos que inicialmente presentan una tonalidad azul de aproximadamente 80 nm. Estos complejos, al estar en presencia de su blanco, se separan y forman pequeños complejos menores a 30 nm que presentan una tonalidad roja (Kim *et al.*, 2011). Por otro lado, en otras metodologías, las pequeñas AuNPs pueden formar grandes complejos que cambian de color rojo a azul (Alsager *et al.*, 2018; Bosak *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

Con la finalidad de poder generar un cambio colorimétrico que nos pueda reportar la presencia de *S. pneumoniae*, se utilizó NaCl para aglomerar las AuNPs, hecho que les permitió cambiar el color a un tono azul, sin embargo, la proporción del cambio puede ser regulada de acuerdo con la cantidad de NaCl que fue utilizada, por lo que se expuso a las AuNPs a un rango de molaridades de NaCl y se obtuvo como mejores concentraciones 1.5 y 1.7 M (Figura 25), ya que estas no aglomeran la totalidad de AuNPs, lo que nos permitió mantener las propiedades transportadoras de las AuNPs. Además, se probó la cantidad 1.5 y 1.7 M de NaCl con el bioreceptor AuNPs-Lyd3 (Figura 26), obteniendo a 1.5 M de NaCl, como la única molaridad que actuó como intermediario para aglomerar las AuNPs solo si se llegara a desprender Lyd-3 por la presencia de su blanco, sin forzar el rompimiento del bioreceptor (Xiao *et al.*, 2022).

Teniendo el bioreceptor para interactuar con el blanco y el intermediario para permitimos el cambio colorimétrico, se decidió retar al bioreceptor AuNPs-Lyd3 con su blanco *S. pneumoniae*, para lo que se utilizó las cepas 49619, TIGR4 y R6, que determinaron la capacidad de detectar al blanco en un medio líquido (Figura 28), el resultado fue lograr identificar a este neumococo con un mínimo de detección de 70 UFC/m y con un límite máximo de detección de  $10^7$  UFC, esta sensibilidad es un rango muy similar al obtenido en un frotis bucal, que va de  $10^3$  a  $10^5$  UFC (Cacho *et al.*, 2007; Bou *et al.*, 2011). Además, biosensor obtuvo rangos de sensibilidad similares a prototipos que fueron diseñados para otras bacterias, por ejemplo: *S. aureus*, con un mínimo de 10 UFC/mL y un máximo  $10^6$  UFC/mL (Yuan, Wu, *et al.*,

2014), *S. typhimurium*, con un mínimo de 100 UFC/mL y un máximo 10<sup>9</sup> UFC/mL (Tao, et al., 2014) o *V. parahaemolyticus*, con un mínimo de 5 UFC/mL y un máximo 10<sup>3</sup> UFC/mL (Sadsri et al., 2020) .

Se buscó comprobar que la especificidad del bioreceptor fue dada por Lyd-3, para lo cual se sustituyó Lyd-3 por el aptámero DTMRSA1 descrito previamente en la literatura (Turek, 2013), diseñado para *S. aureus*, el cual fue modificado con un grupo tiol (Tabla 6), bajo las mismas características de Lyd-3 pero sin un grupo 6-FAM (Tabla 5). La finalidad fue formar un complejo distinto que actuó como control negativo, denominado AuNPs-AptN. Este complejo negativo, nos permitió establecer que la capacidad de AuNPs-Lyd3, para reconocer a *S. pneumoniae* fue enteramente una propiedad del complejo dada por Lyd-3. Ya que cada complejo fue retado contra *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6) y *S. aureus* (Figuras 32a, 33a y 34a), los complejos únicamente reaccionaron de manera positiva a su bacteria blanco, AuNPs-Lyd3 por *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6) y AuNPs-AptN por *S. aureus*, resultados que pudimos predecir sin la necesidad de espectrofotometría debido al nulo cambio de color de las AuNPs (Figuras 32b, 33b y 34b), resultado que fue ratificado al realizar la espectrofotometría. El planteamiento de este experimento se basó en la literatura (Ma et al., 2017; Sadsri et al., 2020), donde se buscó confirmar la afinidad de sus bioreceptores, sustituyendo su aptámero por otros que no fueran afines a la bacteria blanco, en todos los casos esta sustitución les permitió confirmar que la selectividad por la bacteria blanco es una propiedad que se asocia enteramente al aptámero (Wang et al., 2021).

Además, también se demostró la especificidad del bioreceptor, sometiéndolo a la identificación de varias cepas utilizadas como control negativo: *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *H. influenzae* y *S. mutans* (Figura 29a, 30a y 31a), para lo cual en ninguno de estos ensayos el bioreceptor AuNPs-Lyd3, proporcionó un resultado positivo. Estas cepas control negativo, fueron elegidas de acuerdo con las enfermedades que se relacionan con *S. pneumoniae* (Tabla 9) (Bou et al., 2011; Evans, 2022; Sotillo et al., 2014), regularmente estas bacterias suelen confundirse debido a su cuadro clínico similar, a excepción de *S. epidermidis*, la cual se seleccionó por no tiene relación. Los resultados colorimétricos obtenidos de la exposición a las cepas control negativo, no fueron significativos, lo que confirmó que nuestro bioreceptor tiene una alta afinidad por su blanco (Figura 29b, 30b y 31b), además estos resultados fueron similares a biosensores, que retan su bioreceptor a controles negativos, para los cuales en la mayoría se obtiene una mínima interacción, menor o igual a 0.1 de OD, valor que es considerado como no significativo (Kim et al., 2011; Yuan et al., 2014; Ma et al., 2017).

Una vez que fue demostrada la capacidad del biosensor para determinar la presencia de *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6), se buscó obtener una confirmación visual por espectroscopia de fluorescencia, donde fue utilizado el aptámero Lyd-3 con las modificaciones del fluoróforo FAM-6 (Tabla 5). Este se retó contra su bacteria blanco *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6) (Figura 35) y contra

las bacterias control negativo, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *H. influenzae* y *S. mutans* (Figuras 36). Los resultados de la exposición a la bacteria blanco, nos demostraron la capacidad de la unión de Lyd-3 a *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6) de manera visual, ya que hubo fluorescencia a ~517 nm en color verde (Figura 35), en comparación con los controles negativos (Figura 36), donde se observó el grupo FAM-6 no emitió ninguna señal debido a que este no se une a ninguna de las bacterias control negativo *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *H. influenzae* y *S. mutans*, sin embargo denotamos la presencia de estas bacterias en la muestra, gracias a que se utilizó IP como control de presencia y este fluoróforo si emitió al exponerse a ~615 nm, esto determinó de manera visual la selectividad de nuestro complejo AuNPs-Lyd3.

De las mayores ventajas que presentó el desarrollo este biosensor contra las técnicas microbiológicas tradicionales, es que AuNPs-Lyd3, es capaz de identificar a *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6) en un tiempo máximo de 25 min, este tiempo está en un rango similar a los biosensores para otras bacterias, por ejemplo: por ejemplo: *S. aureus*, 40 min (Yuan, Wu, *et al.*, 2014), *S. typhimurium*, 30 min (Tao, *et al.*, 2014) o *V. parahaemolyticus*, 20 min (Sadsri *et al.*, 2020). Mientras que, para la metodología tradicional de conteo en placa de UFC (Figura 37), es necesario un tiempo mínimo de 48h de rigor (Cacho *et al.*, 2007; Prado, 2010). El tiempo de 25 min obtenido con este biosensor, creemos que pudo ser mejorado, si se optimiza el proceso a una metodología en papel como se ha relatado en la literatura (Kim *et al.*, 2011; Kalra *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2022), para otros biosensores con capacidades similares.

Al reconocer que nuestro biosensor fue capaz de detectar *S. pneumoniae*, se buscó proporcionar un ambiente que generará resistencia a la detección del blanco, para lo cual se utilizó leche entera de vaca tratada, para simular las posibles dificultades que podríamos encontrar en muestras reales obtenidas de un frotis bucal, proceso que es un estándar en las metodologías para simular los fluidos biológicos (Yuan *et al.*, 2014); este ambiente simulado con la leche de vaca (Figura 38), no influyó con los resultados previamente obtenidos por el biosensor, lo que sugirió que este biosensor es capaz de cumplir su función en una muestra con saliva real (Dincer *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2022).

## 16. Conclusiones

Esta tesis confirmó la viabilidad y eficiencia de la construcción de un biosensor basado en las AuNPs y en el aptámero Lyd-3 con una alta sensibilidad y especificidad para la detección de *S. pneumoniae*, la cual es una bacteria de relevancia en la clínica. Las propiedades de la formación del bioreceptor AuNPs-Lyd3, nos permitieron desarrollar un biosensor que proporcionó información colorimétrica capaz de detectarse a simple vista y con la opción de cuantificar para obtener información con más precisión, hecho que fue posible gracias a las propiedades que aportaron las AuNPs. Este biosensor fue capaz de fortalecer sus ventajas gracias a la alta sensibilidad y selectividad que proporcionó el aptámero Lyd-3, que en conjunto nos dio un biosensor fácil de utilizar, que nos proporcionó resultados sin la necesidad de un cultivo celular, resultados en un tiempo de 25 min, lo que nos habla de su potencial significativo para el diagnóstico clínico temprano.

En comparación con lo reportado en la literatura se encontró que ya se utilizan aptámeros para la detección de patógenos, sin embargo, se empieza a explorar ampliamente la combinación de oligonucleótidos y AuNPs para el desarrollo biosensores. De acuerdo con la literatura el biosensor desarrollado se categorizó como un aptásensor colorimétrico, este tiene una respuesta sensible, específica y rápida, lo que nos permitiría sentar las bases para la adaptación al campo clínico, teniendo el potencial para entornos de atención hospitalaria, clínicos primarios y laboratorios de diagnósticos, aportando las bases para la construcción de muchos otros biosensores que apoyen a la salud pública.

No obstante, debido a la gran versatilidad y el avance que representa nuestro biosensor, es importante mencionar que parte de las perspectivas de esta tesis, podría incluir la validación del biosensor con muestras clínicas, así como la ratificación de las pruebas con pacientes para la confirmación de la eficiencia y la aplicación de este biosensor al campo clínico. Además, también se debe tener en cuenta aquellas cuestiones que tienen que ver con la estabilidad a largo plazo del complejo AuNPs-Lyd3 y la estandarización de los procesos a niveles industriales para su aplicación en el escenario clínico.

En sugerencia para investigaciones futuras, se podría incluir la optimización continua de esta tecnología, explorando posibles mejoras en la cinética de unión entre diferentes aptámeros y *S. pneumoniae* para lograr una detección aún más rápida. Además, la integración del biosensor en metodologías portátiles como un biosensor en papel podría ampliar su accesibilidad y utilidad en entornos no hospitalarios.

El desarrollo de este biosensor representa un paso significativo hacia adelante en la detección de *S. pneumoniae*. Aunque persisten desafíos y preguntas sin resolver, los resultados presentados sientan las bases para futuras investigaciones y,

potencialmente, para la aplicación práctica de esta tecnología en el diagnóstico de infecciones bacterianas, marcando así un precedente en la convergencia entre la nanotecnología y la biomedicina. A continuación, enlistamos las conclusiones a las que se llegó en este proyecto:

- Se estandarizó un protocolo para la formación del bioreceptor (AuNP's-Lyd3)
- La formación del bioreceptor AuNP's-Lyd3, protege a la AuNP's contra la aglomeración.
- El límite de detección del bioreceptor AuNP's-Lyd3 va desde 70 UFC hasta  $10 \times 10^7$  UFC para *S. pneumoniae* (49619, TIGR4 y R6).
- El bioreceptor AuNP's-Lyd3 es específico para *S. pneumoniae*, ya que no reconoce a las bacterias utilizadas como control negativo utilizadas en esta tesis.
- El tiempo mínimo de detección obtenido para este biosensor fue de 25 min.
- Los resultados de la prueba de oposición sugieren que este biosensor puede ser utilizado para la detección de *S. pneumoniae*, en fluidos humanos como la saliva.
- La curva de relación, entre la técnica de conteo en placa y el biosensor es estadísticamente significativa ya que se obtuvo una  $R^2 = 0.9828$  para la cepa 49619,  $R^2 = 0.9775$  en el caso de la cepa TIGR4 y por último una  $R^2 = 0.9759$  para la cepa R6.

En resumen, la hipótesis planteada en esta tesis, la cual propone que el aptámero Lyd-3 acoplado a AuNP's, permitió la detección de *S. pneumoniae* de manera rápida y con una alta especificidad, es correcta.

## 17. Bibliografía

- 1 Nieto, P., A. Riquelme, S., A. Riedel, C., M. Kalergis, A., & M. Bueno, S. (2013). Gene Elements that Regulate *Streptococcus pneumoniae* Virulence and Immunity Evasion. *Current Gene Therapy*, 13(1), 51–64. <https://doi.org/10.2174/156652313804806615>
- 2 Alghory, A., Alwani, A., Seida, R., Alrais, M., Alwani, A., & Mahroum, N. (2023). *Streptococcus pneumoniae* and Autoimmunity. In *Infection and Autoimmunity* (pp. 449–458). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99130-8.00050-7>
- 3 Alsager, O. A., Alotaibi, K. M., Alswieleh, A. M., & Alyamani, B. J. (2018). Colorimetric Aptasensor of Vitamin D3: A Novel Approach to Eliminate Residual Adhesion between Aptamers and Gold Nanoparticles. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31221-y>
- 4 Atapour, A., Khajehzadeh, H., Shafie, M., Abbasi, M., Mosleh-Shirazi, S., Kasaei, S. R., & Amani, A. M. (2022). Gold nanoparticle-based aptasensors: A promising perspective for early-stage detection of cancer biomarkers. In *Materials Today Communications* (Vol. 30). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103181>
- 5 Babaei, A., Pouremamali, A., Rafiee, N., Sohrabi, H., Mokhtarzadeh, A., & de la Guardia, M. (2022). Genosensors as an alternative diagnostic sensing approaches for specific detection of virus species: A review of common techniques and outcomes. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 155). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116686>
- 6 Bayraç, A. T., & Donmez, S. I. (2018). Selection of DNA aptamers to *Streptococcus pneumoniae* and fabrication of graphene oxide based fluorescent assay. *Analytical Biochemistry*, 556, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.06.024>
- 7 Bennett, J. E. (John E., Dolin, R., & Blaser, M. J. (n.d.). *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*.
- 8 Blaschke, A. J. (2011). Interpreting assays for the detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical Infectious Diseases*, 52(SUPPL. 4). <https://doi.org/10.1093/cid/cir048>
- 9 Bosak, A., Saraf, N., Willenberg, A., Kwan, M. W. C., Alto, B. W., Jackson, G. W., Batchelor, R. H., Nguyen-Huu, T. D., Sankarapani, V., Parks, G. D., Seal, S., & Willenberg, B. J. (2019). Aptamer-gold nanoparticle conjugates for the colorimetric detection of arboviruses and vector mosquito species. *RSC Advances*, 9(41), 23752–23763. <https://doi.org/10.1039/c9ra02089f>
- 10 Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 8, pp. 601–608). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- 11 Cacho, J. B., María, C., Meseguer, A., Antonio, P., Palomo, O., & Puig De La Bellacasa, J. (2007). *Procedimientos en Microbiología Clínica: Recomendaciones*

de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia25.pdf>

- 12 Cajigas, S., Soto, D., & Orozco, J. (2021). Biosensors: Biosensors With Signal Amplification. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822548-6.00058-3>
- 13 Das, R., Chatterjee, B., Kapil, A., & Sharma, T. K. (2020). Aptamer-NanoZyme mediated sensing platform for the rapid detection of Escherichia coli in fruit juice. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2019.100313>
- 14 Dincer, C., Bruch, R., Costa-Rama, E., Fernández-Abedul, M. T., Merkoçi, A., Manz, A., Urban, G. A., & Güder, F. (2019). Disposable Sensors in Diagnostics, Food, and Environmental Monitoring. In *Advanced Materials* (Vol. 31, Issue 30). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/adma.201806739>
- 15 Dockrell, D. H., & Brown, J. S. (2015). Streptococcus pneumoniae Interactions with Macrophages and Mechanisms of Immune Evasion. In *Streptococcus Pneumoniae: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions* (pp. 401–422). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410530-0.00021-1>
- 16 Dolin, R., Bennett, J. E., & Mandell, G. L. (2005). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (pp. 1727–3662).
- 17 Dong, J., Carpinone, P. L., Pyrgiotakis, G., Demokritou, P., & Moudgil, B. M. (2020). Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method. *KONA Powder and Particle Journal*, 37, 224–232. <https://doi.org/10.14356/kona.2020011>
- 18 Evans, T. J. (2022). Streptococcus pneumoniae. In *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (pp. 1–13). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102723-3.00249-3>
- 19 Fu, Z., & Xiang, J. (2020). Aptamers, the nucleic acid antibodies, in cancer therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21082793>
- 20 Garcia-Melo, L. F., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., Madrigal-Santillán, E. O., Morales-González, J. A., Pineda Cruces, R. N., Campoy Ramírez, J. A., Matsumura, P. D., Aguilar-Santamaría, M. de los A., & Batina, N. (2019). Construction of an electrochemical genosensor based on screen-printed gold electrodes (SPGE) for detection of a mutation in the adenomatous polyposis coli gene. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 840, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.03.048>
- 21 Garcia-Melo, L. F., Morales-Rodríguez, M., Madrigal-Bujaidar, E., Madrigal-Santillán, E. O., Morales-González, J. A., Pineda Cruces, R. N., Campoy Ramírez, J. A., Damian-Matsumura, P., Tellez-Plancarte, A., Batina, N., & Álvarez-González, I. (2022). Development of a Nanostructured Electrochemical

- Genosensor for the Detection of the K-ras Gene. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6575140>
- 22 Grzelczak, M., Pérez-Juste, J., Mulvaney, P., & Liz-Marzán, L. M. (2008). Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chemical Society Reviews*, 37(9), 1783–1791. <https://doi.org/10.1039/b711490g>
  - 23 Gutiérrez-Santana, J. C., Toscano-Garibay, J. D., López-López, M., & Coria-Jiménez, V. R. (2020). Aptamers coupled to nanoparticles in the diagnosis and treatment of microbial infections. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 38, Issue 7, pp. 331–337). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.12.004>
  - 24 Hamed, K.-K., Vahideh, R., Ali, E., & Fatemeh, S. (2020). DNA Biosensors Techniques and Their Applications in Food Safety, Environmental Protection and Biomedical Research: A mini review. *Journal of Cell and Developmental Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.36959/596/446>
  - 25 Hegde, M., Pai, P., Shetty, M. G., & Babitha, K. S. (2022). Gold nanoparticle-based biosensors for rapid pathogen detection: A review. In *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management* (Vol. 18). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100756>
  - 26 Hosseinzadeh, L., & Mazloun-Ardakani, M. (2020). Advances in aptasensor technology. In *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 99, pp. 237–279). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2020.02.010>
  - 27 Jia, X., Dong, S., & Wang, E. (2016). Engineering the bioelectrochemical interface using functional nanomaterials and microchip technique toward sensitive and portable electrochemical biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.037>
  - 28 Johnson, D. (2017). *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors*.
  - 29 Kadadou, D., Tizani, L., Wadi, V. S., Banat, F., Alsafar, H., Yousef, A. F., Barceló, D., & Hasan, S. W. (2022). Recent advances in the biosensor's application for the detection of bacteria and viruses in wastewater. In *Journal of Environmental Chemical Engineering* (Vol. 10, Issue 1). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.107070>
  - 30 Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C., & Andrew, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 6, Issue 4, pp. 288–301). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1871>
  - 31 Kalra, P., Dhiman, A., Cho, W. C., Bruno, J. G., & Sharma, T. K. (2018). Simple methods and rational design for enhancing aptamer sensitivity and specificity. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00041>
  - 32 Keefe, A. D., Pai, S., & Ellington, A. (2010). Aptamers as therapeutics. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 9, Issue 7, pp. 537–550). <https://doi.org/10.1038/nrd3141>

- 33 Khorshid, M., Varshosaz, J., Rostami, M., Haghirsadat, F., Akbari, V., & Khorshid, P. (2023). Anti HER-2 aptamer functionalized gold nanoparticles of dasatinib for targeted chemo-radiotherapy in breast cancer cells. *Biomaterials Advances*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213591>
- 34 Kim, Y. S., Kim, J. H., Kim, I. A., Lee, S. J., & Gu, M. B. (2011). The affinity ratio-Its pivotal role in gold nanoparticle-based competitive colorimetric aptasensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(10), 4058–4063. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.03.030>
- 35 Le, N. D., Ricci, S., Grandgirard, D., & Leib, S. L. (2023). Experimental meningitis by *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in rodents. In *Handbook of Animal Models in Neurological Disorders* (pp. 329–341). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-89833-1.00050-1>
- 36 Li, L., Ma, J., Yu, Z., Li, M., Zhang, W., & Sun, H. (2023). Epidemiological characteristics and antibiotic resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae*: An updated review. In *Microbiological Research* (Vol. 266). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127221>
- 37 Liu, S., Xu, Y., Jiang, X., Tan, H., & Ying, B. (2022). Translation of aptamers toward clinical diagnosis and commercialization. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 208). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114168>
- 38 Loughran, A. J., Orihuela, C. J., & Tuomanen, E. I. (2019). *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. *Microbiology Spectrum*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0004-2018>
- 39 Ma, X., Song, L., Zhou, N., Xia, Y., & Wang, Z. (2017). A novel aptasensor for the colorimetric detection of *S. typhimurium* based on gold nanoparticles. *International Journal of Food Microbiology*, 245, 1–5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.024>
- 40 Marrazza, G. (2017). Aptamer Sensors. In *Aptamer Sensors* (Vol. 7, Issue 1, pp. 5–7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bios7010005>
- 41 Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications - A review. In *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* (Vol. 6, Issue 2, pp. 153–159). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- 42 Mendoza-Madrigal A.C, & Chanona-Pérez J.J. (2013). Biosensores Mecánicos en el área biológica y alimentaria: una revisión. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12, 205–225.
- 43 Moraldo, C., Vuille-dit-Bille, E., Shkodra, B., Kloter, T., & Nakatsuka, N. (2022). Aptamer-modified biosensors to visualize neurotransmitter flux. In *Journal of Neuroscience Methods* (Vol. 365). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.109386>
- 44 Morimura, A., Hamaguchi, S., Akeda, Y., & Tomono, K. (2021). Mechanisms Underlying Pneumococcal Transmission and Factors Influencing Host-Pneumococcus Interaction: A Review. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.639450>

- 45 Naresh, V., & Lee, N. (2021). A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 21, Issue 4, pp. 1–35). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s21041109>
- 46 Ning, Y., Hu, J., & Lu, F. (2020). Aptamers used for biosensors and targeted therapy. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 132). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110902>
- 47 Ospina, J. D. (2020). Aptamers as a novel diagnostic and therapeutic tool and their potential use in parasitology. *Biomedical*, 40, 148–165. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4765>
- 48 Pablo Eduardo Cardoso Ávila. (2011). *Detección de anticuerpos mediante nanopartículas metálicas*.
- 49 Parhi, P., Mohanty, C., & Sahoo, S. K. (2012). Nanotechnology-based combinational drug delivery: An emerging approach for cancer therapy. In *Drug Discovery Today* (Vol. 17, Issues 17–18, pp. 1044–1052). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.05.010>
- 50 Perumal, V., & Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: Principle, architecture, and applications. In *Journal of Applied Biomedicine* (Vol. 12, Issue 1, pp. 1–15). University of South Bohemia. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>
- 51 Prado Valeria. (2001). Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. *Chil Infect*, 18, 6–9.
- 52 Ramirez, M., Carriço, J. A., van der Linden, M., & Melo-Cristino, J. (2015). Molecular Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. In *Streptococcus Pneumoniae: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions* (pp. 3–19). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410530-0.00001-6>
- 53 Ruvinsky, R. O. (2001). *Streptococcus pneumoniae: Epidemiología y resistencia a antimicrobianos de las enfermedades invasoras en Latinoamérica*.
- 54 Sadsri, V., Trakulsujaritchook, T., Tangwattanachuleeporn, M., Hoven, V. P., & Na Nongkhai, P. (2020). Simple Colorimetric Assay for *Vibrio parahaemolyticus* Detection Using Aptamer-Functionalized Nanoparticles. *ACS Omega*, 5(34), 21437–21442. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01795>
- 55 Seok Kim, Y., Ahmad Raston, N. H., & Bock Gu, M. (2016). Aptamer-based nanobiosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 2–19. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.040>
- 56 Sharma, A., & Ramena, G. (2021). Fluorescent aptamers for detection and treatment of pathogenic bacteria and cancer. In *Methods in Microbiology* (Vol. 48, pp. 135–177). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2020.11.002>
- 57 Short, K. R., & Diavatopoulos, D. A. (2015). Nasopharyngeal Colonization with *Streptococcus pneumoniae*. In *Streptococcus Pneumoniae: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions* (pp. 279–291). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410530-0.00015-6>
- 58 Silva-Costa, C., Melo-Cristino, J., & Ramirez, M. (2023). *Streptococcus pneumoniae*. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 1479–1490). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00095-2>

- 59 Sotillo, A., Pedrero, M., de Pablos, M., García, J. L., García, E., García, P., Pingarrón, J. M., Mingorance, J., & Campuzano, S. (2014). Clinical evaluation of a disposable amperometric magneto-genosensor for the detection and identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.04.014>
- 60 Turek, D. (2013). Molecular recognition of live methicillin-resistant staphylococcus aureus cells using DNA aptamers. *World Journal of Translational Medicine*, 2(3), 67. <https://doi.org/10.5528/wjtm.v2.i3.67>
- 61 Uhuo, O. V., Waryo, T. T., Douman, S. F., Januarie, K. C., Nwambaekwe, K. C., Ndipingwi, M. M., Ekwere, P., & Iwuoha, E. I. (2022). Bioanalytical methods encompassing label-free and labeled tuberculosis aptasensors: A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 1234). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340326>
- 62 Valeria Prado J. (2010). Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Chil Infect*, 18, 6–9.
- 63 Vila, J., Gómez, M. D., Salavert, M., & Bosch, J. (2017). Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.11.004>
- 64 Wang, M., Zeng, J., Wang, J., Wang, X., Wang, Y., & Gan, N. (2021). Dual-mode aptasensor for simultaneous detection of multiple food-borne pathogenic bacteria based on colorimetry and microfluidic chip using stir bar sorptive extraction. *Microchimica*, 188–244. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04902-1/Published>
- 65 Wang, P., Wang, X., Wang, L., Hou, X., Liu, W., & Chen, C. (2015). Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells. In *Science and Technology of Advanced Materials* (Vol. 16, Issue 3). Institute of Physics Publishing. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/3/034610>
- 66 Weiser, J. N., Ferreira, D. M., & Paton, J. C. (2018). *Streptococcus pneumoniae*: Transmission, colonization, and invasion. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 16, Issue 6, pp. 355–367). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8>
- 67 Wu, L., Zhang, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Zou, J., & Qiu, L. (2022). Aptamer-Based Cancer Cell Analysis and Treatment. In *ChemistryOpen* (Vol. 11, Issue 10). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/open.202200141>
- 68 Xiao, S., Lu, J., Sun, L., & An, S. (2022). A simple and sensitive AuNPs-based colorimetric aptasensor for specific detection of azlocillin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.120924>
- 69 Yuan, J., Tao, Z., Yu, Y., Ma, X., Xia, Y., Wang, L., & Wang, Z. (2014). A visual detection method for *Salmonella Typhimurium* based on aptamer recognition and nanogold labeling. *Food Control*, 37(1), 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.046>

- 70** Yuan, J., Wu, S., Duan, N., Ma, X., Xia, Y., Chen, J., Ding, Z., & Wang, Z. (2014). A sensitive gold nanoparticle-based colorimetric aptasensor for *Staphylococcus aureus*. *Talanta*, *127*, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.04.013>
- 71** Zhang, W., Wang, Y., Nan, M., Li, Y., Yun, J., Wang, Y., & Bi, Y. (2021). Novel colorimetric aptasensor based on unmodified gold nanoparticle and ssDNA for rapid and sensitive detection of T-2 toxin. *Food Chemistry*, *348*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129128>
- 72** Zhang, Y., Lai, B. S., & Juhas, M. (2019). Recent advances in aptamer discovery and applications. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24050941>

## 18. Anexos



"2022. Año del Quincentenario de la Fundación de Toluca de Lerdo, Capital del Estado de México"



### La División de Ingeniería en Nanotecnología de la Universidad Politécnica del Valle de México

Otorga la presente

#### CONSTANCIA

Al

**Bio. Exp. Jorge Alfredo Campoy Ramírez**

Por haber impartido la Conferencia

**"Desarrollo de un nuevo método de detección para  
Streptococcus pneumoniae basado en aptámeros y  
nanopartículas"**

a estudiantes del programa educativo de Ingeniería en Nanotecnología  
el 17 de marzo de 2022.

**Dr. Miguel Morales Rodríguez**  
Director de la División de Ingeniería en Nanotecnología

Tultitlán, Estado de México  
17 de marzo de 2022.

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN  
SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR Y NORMAL  
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL VALLE DE MÉXICO  
DIRECCIÓN DE DIVISIÓN DE INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA



La Universidad Autónoma Metropolitana a través  
de la Oficina de Enlaces y Eventos Universitarios  
otorgan la presente



# Constancia

al

**Bio. Jorge Alfredo Campoy Ramírez**

Por su participación en la plática "Una perspectiva al mundo de los biosensores"  
en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular (LNIM)  
dentro de las visitas guiadas para la Escuela Preparatoria Oficial Núm. 143,  
a las instalaciones de la UAM Unidad Iztapalapa,  
celebrada el 13 de octubre del 2023.

---

Lic. Doina Iliana García Melgarejo  
Oficina de Enlaces y Eventos Universitarios

# UNA VENTANA A LOS BIOSENSORES PARA LA DETECCIÓN Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES.

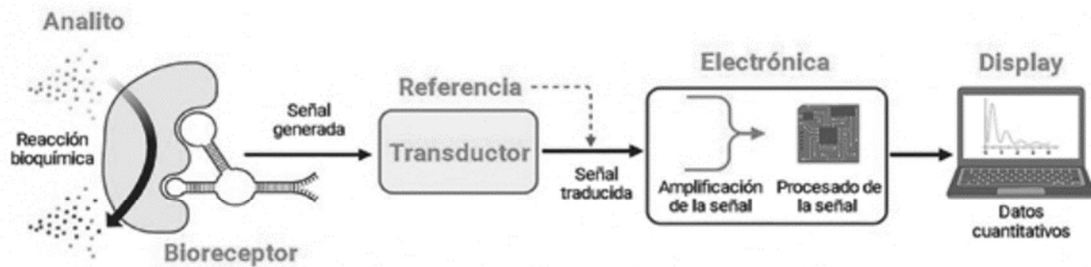
**Biól. Exp. Alfredo Campoy-Ramírez, Biól. Jacqueline Paola Martínez-Mares,  
Dr. José Olivares-Trejo**

Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México

\*Autor corresponsal: [jose.olivares@uacm.edu.mx](mailto:jose.olivares@uacm.edu.mx)

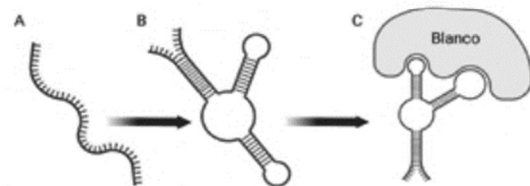
En la sociedad moderna requerimos de más dispositivos en nuestra vida cotidiana y esto nos lleva a buscar pruebas de determinación rápida, como el glucómetro, la prueba de embarazo, la prueba de detección de COVID-19, entre otros. De estos dispositivos se busca que sean económicos, portátiles y de fácil manipulación. Todo esto facilitará que los pacientes tengan mayor control de sus medicaciones o les facilitará el diagnóstico temprano de alguna enfermedad a la que estén propensos, lo cual nos permitirá anticiparnos al cuidado y control de la salud (García-Melo y col., 2019). Por todo esto, el diseño de dispositivos de diagnóstico se ha convertido en un área de investigación importante de la biología, así como de sus ramas, la genómica, la biología molecular y la biotecnología, las cuales nos permiten explorar muchas nuevas opciones para descubrir anomalías, como la detección de anticuerpos, proteínas y secuencias específicas de ADN ya sean humanos,

bacterianas o virales (Jia y col., 2016). El gran aumento de esta información sobre secuencias de ADN hace surgir nuevas formas de análisis para el estudio y desarrollo de dispositivos de detección, que como se planteó anteriormente, se busca sea un análisis rápido, barato y de alto rendimiento. Todas estas características son cumplidas por los biosensores, los cuales han acaparado la atención estos últimos años (Yau y col., 2005). Un biosensor es un dispositivo que integra un elemento biológico como una enzima, un anticuerpo o una sonda, debe incluir un componente reactivo para generar una señal medible. La señal se transmite a un display que evidencia la información sobre el cambio molecular o fisiológico. Un biosensor típico comprende un analito, un bioreceptor, un transductor (siendo su función convertir el evento de bioreconocimiento en una señal medible) y un medio de interpretación (Naresh y Lee, 2021) (Figura 1).



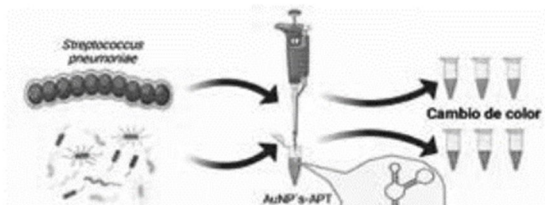
**Fig 1.** Componentes de un biosensor. Un biosensor se compone de un analito, el cual corresponde a aquel factor que se detectará e iniciará la reacción bioquímica al unirse al bioreceptor (ácido nucleico, proteína, etc.), generando una señal que se identifica por el transductor y se compara con la referencia que es el parámetro estandarizado para cuantificar la señal, para lo cual una vez traducida esta señal se pasa por la electrónica que amplifica la señal y la procesa convirtiendo la señal de forma analógica a digital para arrojar los datos en el display (puede ser numérica, gráfica, tubular e imágenes dependiendo de los requisitos de usuario). Imagen realizada en BioRender.

Dentro de los biosensores podemos encontrar aquellos basados en ácidos nucleicos llamados aptasensores, en donde se utiliza una hebra como sonda para la detección de blancos específicos. Los aptámeros son moléculas de ácidos nucleicos monocatenarios, tienen un tamaño de aproximadamente 80 nucleótidos que puede unirse de forma específica y eficaz a una variedad de biomoléculas. Los aptámeros son aislados *in vitro* a partir de una biblioteca de oligonucleótidos sintéticos utilizando una técnica llamada Cell-Selelex (selection evolution of ligands by exponential enrichment) (Marrazza, 2017). Cada aptámero posee una estructura tridimensional particular que le permite unirse con afinidad y especificidad alta a la molécula blanco (Fu y Xiang, 2020). Los aptámeros se han utilizado como parte de los biosensores, debido a sus ventajas en relación a los anticuerpos, a su alta estabilidad, baja dimensión y alta afinidad por moléculas pequeñas. Además, son fáciles de sintetizar *in vitro*, sencillos de modificar y flexibles de diseñar (Zhang et al., 2019)(Figura 2).



**Fig 2.** Configuración de un aptámero. A) Aptámero en su forma de cadena sencilla. B) El aptámero adquiere su forma tridimensional en medio acuoso. C) Aptámero en su forma tridimensional anclado a su blanco. Imagen realizada en BioRender.

*Streptococcus pneumoniae* basado en aptámeros y nanopartículas”, para lo cual se está diseñando un aptasensor basado en la detección colorimétrica de la bacteria *S. pneumoniae* que se ubica dentro de las principales prioridades como problema de salud pública tanto en los países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. Es responsable de una elevada tasa de morbilidad y mortalidad, ya que es el agente causal de una gran variedad de infecciones graves como la otitis media aguda, sinusitis o infecciones invasoras como neumonía, meningitis, septicemia, fiebre sin foco, entre otras (Blaschke, 2011). Por lo tanto, es imperativo el desarrollo de un aptasensor para la identificación de *S. pneumoniae* con el objetivo de obtener un dispositivo que detecte este patógeno, pero que además muestre un rendimiento analítico superior y una medición inmediata que disminuya el largo



**Fig 3.** Resumen gráfico del proyecto para la identificación de *S. pneumoniae* a través de un aptámero acoplado a nanopartículas de oro. Para la identificación de *S. pneumoniae* se diseñó un aptámero específico para la bacteria, el cual en presencia de ésta genera una afinidad a su blanco produciendo una reacción de conglomeración que se denota en el cambio colorimétrico en el medio acuoso de las nanopartículas. Imagen realizada en BioRender.

lapso entre la preparación y el análisis de la muestra (Bosak y col., 2019). Como consecuencia, este método de detección presentará grandes ventajas sobre los métodos convencionales como los bajos costos de desarrollo y producción (Bou-Torrent y col., 2011). Se espera obtener un aptasensor capaz de identificar a *S. pneumoniae* de forma inmediata, lo que nos permitirá ahorrarnos el recurso del tiempo. Proponemos que este dispositivo va a tener una alta sensibilidad de identificación. Este dispositivo debe ser usado sin requerimientos de personal de alta especialidad como lo piden los métodos moleculares. Sabiendo que los métodos moleculares representan un gran reto debido a su alta especificidad, se pretende obtener un aumento de la señal arrojada por el dispositivo al identificar a *S. pneumoniae* a través del uso de nanopartículas de oro (AuNP's) obteniendo nuestro complejo que llamamos AuNP's-aptámero, lo que nos permitirá establecer si el biosensor es capaz de desafiar a los métodos de identificación actuales (Figura 3).

### Referencias bibliográficas

Blaschke, A. J. (2011). Interpreting assays for the detection of streptococcus pneumoniae. *Clinical Infectious Diseases*, 52(SUPPL. 4). <https://doi.org/10.1093/cid/cir048>

Bosak, A., Saraf, N., Willenberg, A., Kwan, M. W. C., Alto, B. W., Jackson, G. W., Batchelor, R. H., Nguyen-Huu, T. D., Sankarapani, V., Parks, G. D., Seal, S., & Willenberg, B. J. (2019). Aptamer-gold nanoparticle conjugates for the colorimetric detection of arboviruses and vector mosquito species. *RSC Advances*, 9(41), 23752–23763. <https://doi.org/10.1039/c9ra02089f>

Bou-Torrent, J., Martínez-García, J. F., García-Martínez, J. L., & Prat, S. (2011). Gibberellin a 1 metabolism contributes to the control of photoperiod-mediated tuberization in potato. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024458>

Fu, Z., & Xiang, J. (2020). Aptamers, the nucleic acid antibodies, in cancer therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21082793>

Blaschke, A. J. (2011). Interpreting assays for the detection of streptococcus pneumoniae. *Clinical Infectious Diseases*, 52(SUPPL. 4). <https://doi.org/10.1093/cid/cir048>

Bosak, A., Saraf, N., Willenberg, A., Kwan, M. W. C., Alto, B. W., Jackson, G. W., Batchelor, R. H., Nguyen-Huu, T. D., Sankarapani, V., Parks, G. D., Seal, S., & Willenberg, B. J. (2019). Aptamer-gold nanoparticle conjugates for the colorimetric detection of arboviruses and vector mosquito species. *RSC Advances*, 9(41), 23752–23763. <https://doi.org/10.1039/c9ra02089f>

Bou-Torrent, J., Martínez-García, J. F., García-Martínez, J. L., & Prat, S. (2011). Gibberellin a 1 metabolism contributes to the control of photoperiod-mediated tuberization in potato. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024458>

Fu, Z., & Xiang, J. (2020). Aptamers, the nucleic acid antibodies, in cancer therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21082793>

García-Melo, L. F., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., Madrigal-Santillán, E. O., Morales-González, J. A., Pineda Cruces, R. N., Campoy Ramírez, J. A., Matsumura, P. D., Aguilar-Santamaría, M. de los A., & Batina, N. (2019). Construction of an electrochemical genosensor based on screen-printed gold electrodes (SPGE) for detection of a mutation in the adenomatous polyposis coli gene. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 840, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.03.048>

Jia, X., Dong, S., & Wang, E. (2016). Engineering the bioelectrochemical interface using functional nanomaterials and microchip technique toward sensitive and portable electrochemical biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.037>

Marrazza, G. (2017). Aptamer Sensors. In *Biosensors* (Vol. 7, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bios7010005>

Naresh, V., & Lee, N. (2021). A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 21, Issue 4, pp. 1–35). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s21041109>

Yau, H. C. M., Chan, H. L., & Yang, M. (2005). Electrochemical properties of DNA-intercalating doxorubicin and methylene blue on n-hexadecyl mercaptan-doped 57-thiol-labeled DNA-modified gold electrodes. [www.elsevier.com/locate/bios](http://www.elsevier.com/locate/bios)

Zhang, Y., Lai, B. S., & Juhas, M. (2019). Recent advances in aptamer discovery and applications. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24050941>



SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA

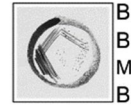


VII CONGRESO  
DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR DE BACTERIAS



**PROGRAM AND  
ABSTRACTS**

**8 al 12 de octubre 2023  
San Miguel de Allende, Guanajuato**



17:00 - 18:00	<p style="text-align: center;"><b>PLENARY LECTURE II</b></p> <p style="text-align: center;">I am me with some of my microbes.</p> <p style="text-align: center;"><i>Andrés Moya</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Instituto de Biología Integrativa de Sistemas. Universidad de Valencia, Esp.</i></p> <p style="text-align: center;">Chair: Luis D. Alcaraz. Facultad de Ciencias, UNAM</p>
18:00 – 20:00	<p><b>POSTER SESSION I</b> Odd Numbers.</p>

#### TUESDAY October 10

9:00 – 10:20	<p style="text-align: center;"><b>ORAL SESSION IV. HOST-MICROBE INTERACTIONS</b></p> <p>Enhanced beneficial <i>Trichoderma</i> – plant relationships with PGPB: a potential role of effector proteins. <i>Gustavo Santoyo. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. UMSNH.</i></p> <p style="text-align: center;">Chair: Ángel Andrade. Facultad de Medicina. UANL.</p> <p>Metagenomic analysis of plant growth promoting rhizobacteria communities from tomato grown in hydroponics. <i>Gerardo Mejía Vazquez. Facultad de Ciencias, UNAM.</i></p> <p>Genome mining of non-ribosomal peptide synthetases in plant associated bacteria. <i>Reynaldo Villanueva Enriquez. Instituto de Química, UNAM.</i></p> <p>Milpas as model agroecosystems to study plant-microbe interactions. <i>Gabriela Gastélum Urbina. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C</i></p> <p style="text-align: center;">Chair: Gustavo Santoyo. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. UMSNH.</p>
10:20 – 10:40	<p><b>FLASH TALKS FOR POSTERS ADVERTISING</b></p> <p>Characterization of biofilm-forming multidrug-resistant <i>Escherichia coli</i> isolated from vegetables and meat products. <i>Maria Guadalupe Balbuena Alonso. Centro de Investigaciones Microbiológicas, BUAP.</i></p> <p>Comparison of the pharynx and nose microbiome of persistent, intermittent, and non-carriers of <i>Staphylococcus aureus</i>. <i>Samuel González García. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.</i></p>

250.	<b>Isolation of metallotorellant bacteria for the development of a biofilter for wastewater treatment.</b> Kadiya Calderón, Jonathan Parades-Aguilar, Luis A. Medina Juárez, Ana Paola Martínez Almada and Diana B. Sandoval Robles. DICTUS, Universidad de Sonora
251.	<b>Development of a biosensor for the detection of <i>Streptococcus pneumoniae</i> based on the Lyd-3 aptamer and AuNPs.</b> Jorge Alfredo Campoy-Ramírez, Jacqueline Paola Martínez-Mares, Elizabeth Álvarez- Sánchez, Edgar Augusto Ortiz-Benítez, Elisa Irene Azuara-Liceaga y José de Jesús Olivares-Trejo. Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México
252.	<b>Patterns and dynamics generated across spatial scales for the assembly of a synthetic microbial community.</b> Haydee De Luna-Valenciano, Sofía Roque-Romero, Ayari Fuentes-Hernández. Synthetic Biology Program, Center for Genomic Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México
253.	<b>Diagnóstico molecular de hipoacusia no sindrómica mediante las técnicas de RFLP y AS-PCR.</b> Fabiola Gómez Ávila, Ana Elvia Sánchez Mendoza, Maritere Domínguez Rojas, José Francisco Montiel Sosa. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México
254.	<b>Development of a prototype for the detection of resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> based on Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) coupled to probe hybridization.</b> Daniel Alejandro Ferrusca Bernal, Angelina Rodríguez Torres, María Carlota García Gutiérrez, Juan Joel Mosqueda Gualito, José Antonio Enciso Moreno, Bertha Isabel Carvajal Gámez. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro
255.	<b>Study of the extracellular proteolytic activity in strains of <i>Streptomyces sp.</i> from the mining tailings of Guanajuato, Gto.</b> Ingrid Monserrat Gallegos Olmos y Juan Francisco Sánchez López Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato
256.	<b>Structural and functional studies of the first four-domain FABC cyclomaltodextrin glucanotransferase: insights into its role in an uncommon starch-converting pathway from pathogenic bacteria.</b> Gabriel Garcia-Laiton, Montserrat Romero-Jiménez, Sara Centeno-Leija and Hugo Serrano-Posada. Laboratorio de Biología Sintética, Estructural y Molecular – Universidad de Colima
257.	<b>Obtaining a biofertilizer based on autochthonous microalgae.</b> Paula Gómez, Vicente de Paul Álvarez, and Miguel Medrano. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna
258.	<b>Detection of anti-<i>Borrelia</i> spp. antibodies in bovine serum from multiple states of Mexico.</b> Sofía L. Luna-Rojas, Edwin Vázquez-Guerrero, José Luis Gutiérrez-Hernández, Efrén Díaz-Aparicio, Jose Alberto Hernández-Martínez, Job E. López, Rigoberto Hernández-Castro, J. Antonio Ibarra. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional
259.	<b>Design of a bacterial consortium of strains isolated from marine environments with the capacity to degrade hydrocarbons in coastal sands.</b> Karla Sofía Millán-López, Liliana Pardo. Instituto de Biotecnología. UNAM
260.	<b>Exploring marine plastispheres for the identification of plastic-degrading bacteria and enzymes.</b> Luis Felipe Muriel-Millán, Nallely Magaña-Montiel and Liliana Pardo López. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
261.	<b>Evaluation of BIOFLOC incorporation in the gastrointestinal microbiote of tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).</b> María-Elena Ochoa_Hernández, Luis R. Martínez-Córdova, Mauricio Coelho-Emerenciano, Edilmar Cortés, Emmanuel Villanueva and Kadiya Calderón. Universidad de Sonora
262.	<b>The role of microbiome taxonomic diversity on childhood.</b> Mishael Sánchez-Pérez and Cesaré Ovando-Vázquez. Centro Nacional de Supercomputo. División de Materiales Avanzados IPICYT
263.	<b>Production of pyocyanin and pyoverdine from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> using organic wastes.</b> Edgar Emmanuel Salazar Núñez, Denisse Cecilia Arreola Berumen, Mónica Andrea Valdez Solana, Miguel Aguilera Ortiz, Jorge Armando Meza Velázquez, Erick Sierra Campos. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango
264.	<b>Bacterial esterase with hydrolytic activity on commercial polyurethane resin: isolation from a metagenomic library of a polluted river.</b> Arianna Soto-Hernández, Luis Felipe Muriel-Millán, José Luis Rodríguez-Mejía, Fidel Alejandro Sánchez-Flores and Liliana Pardo-López. Instituto de Biotecnología, UNAM



## Development of a biosensor for the detection of *Streptococcus pneumoniae* based on the Lyd-3 aptamer and AuNPs.

<sup>1</sup>Jorge Alfredo Campoy-Ramírez, <sup>1</sup>Jacqueline Paola Martínez-Mares, <sup>1</sup>Elizabeth Álvarez- Sánchez, <sup>2</sup>Edgar Augusto Ortiz-Benítez, <sup>1</sup>Elisa Irene Azuara-Liceaga y <sup>1</sup>José de Jesús Olivares-Trejo.

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, San Lorenzo 290, Col. Del Valle, C.P. 03100, Ciudad de México. E-mail: olivarestrejo@yahoo.com, Tel: +525554886661 Ext. 15309.

<sup>2</sup>Lab-Tech Instrumentación, Yácatas 319, Narvarte Poniente, Benito Juárez, 03020, Ciudad de México, México.

*Streptococcus pneumoniae* is a bacterium considered a public health problem, it is the causative agent of infections such as otitis and sinusitis or more serious infections such as pneumonia or meningitis. This *pneumococcus* has a high rate of morbidity and mortality, attributed to a failure in diagnosis, being the time for diagnosis the most important factor to choose the best treatment. Therefore, it is very important to develop new identification methods that in a short time allow the generation of a more adequate treatment scheme. A good alternative for this purpose are the methods based on biosensors, which an accurate diagnosis can be given, fast at very low cost. The goal of this investigation is to develop a device that allows obtaining a result in almost immediate time. In the present work, an aptamer based colorimetric biosensor was analyzed for the specific detection of *S. pneumoniae*. The chosen aptamer was Lyd-3<sup>1</sup> as a recognition element and gold nanoparticles (AuNPs) was used as a colorimetric indicator. The binding of Lyd-3 to the AuNP's allowed to stabilize the AuNPs, keeping the solution red. When *S. pneumoniae* is present in solution, the Lyd-3 aptamer dissociates from the AuNPs, resulting in aggregation of AuNPs and a visual color change the solution from red to blue. And then, the color change it was quantified by spectrophotometry, which allowed us to obtain a relationship between the number of CFUs and the absorbance of the solution. When comparing this new method with the result obtained from the CFU count, and R<sup>2</sup>= 0.98831 was obtained, that is a significant relation that shows that the biosensor obtains the same results like the quantification by CFU, with the great advantage of performing in a fast, in 25 minutes without having to wait the 48 hours of rigor, for obtain the CFU.

1. Bayraç, Abdullah Tahir, and Sultan Ilayda Donmez. 2018. "Selection of DNA Aptamers to Streptococcus Pneumonia and Fabrication of Graphene Oxide Based Fluorescent Assay".



Imagen de microflora humana como la hubiera pintado Diego Rivera, generada con Dall-E de openAI

Se otorga la presente

**CONSTANCIA** a:

***Jorge Alfredo Campoy Ramírez***

Por su asistencia y presentación del trabajo titulado:

**Development of a biosensor for the detection of *Streptococcus pneumoniae*  
based on the Lyd-3 aptamer and AuNPs**

Por:

Jorge Alfredo Campoy Ramírez, Jacqueline Paola Martínez Mares, Elizabeth Álvarez Sánchez,  
Edgar Augusto Ortiz Benítez, Elisa Irene Azuara Liceaga y José de Jesús Olivares Trejo

En la modalidad de cartel en el VII Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias  
8 - 12 de octubre de 2023, San Miguel de Allende, Gto.

Atentamente

Por el Comité Organizador

Dra. Lourdes Girard





**Sociedad Química de México, A. C.**

otorga la presente

# CONSTANCIA

a

**Jorge Alfredo Campoy Ramírez, Rosa Natali Pineda Cruces, Jacqueline Paola Martínez Mares, Isela Álvarez González, Eduardo Madrigal Bujaidar, Nikola Batina, Luis Fernando García-Melo**

por su participación con el trabajo en Modalidad **Cartel Profesional** titulado

**Genosensor electroquímico para identificar la mutación 876 del gen APC**

presentado en el marco de las Actividades Académicas del  
**Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2023.**

*"La Química de México para el Mundo"*

**CISQM2023**

2 - 6 de octubre de 2023

San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

**Dr. David Quintanar Guerrero**  
Presidente Nacional Electo  
Presidente de Congresos  
Sociedad Química de México, A.C.

**Dra. Alma Gabriela Palestino Escobedo**  
Directora  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

**Dra. Denise Atenea de Loera Carrera**  
Presidenta del Comité Organizador Local CISQM 2023  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

**Dr. Alfonso Ramón García Márquez**  
Coordinador del CISQM 2023  
Tesorero, Comité Ejecutivo Nacional  
Sociedad Química de México, A.C.



Imagen de microorganismo humano, como lo hubiera pintado Diego Rivera, generada con Dall-E de OpenAI

Se otorga la presente

**CONSTANCIA** a:

***Jacqueline Paola Martínez Mares***

Por su asistencia y presentación del trabajo titulado:

**Selection of an aptamer for identification of capsulate and  
Non-Capsulated strains of *Streptococcus pneumoniae***

Por:

Jacqueline Paola Martínez Mares, Norma Velázquez Guadarrama,  
Jorge Alfredo Campoy-Ramírez, Laura I. Vázquez Carrillo, José de Jesús Olivares-Trejo

En la modalidad de cartel en el VII Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias  
8 - 12 de octubre de 2023, San Miguel de Allende, Gto.

Atentamente

Por el Comité Organizador

Dra. Lourdes Girard

