

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE ORO CON
PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS
DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: COMO
CONTRIBUCIÓN AL DISEÑO Y DESARROLLO DE UN
BIOSENSOR**

Q.F. JOHN ALEJANDRO LARA CARRILLO

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2019**

**FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE ORO CON
PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS
DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: COMO
CONTRIBUCIÓN AL DISEÑO Y DESARROLLO DE UN
BIOSENSOR**

Q.F. JOHN ALEJANDRO LARA CARRILLO

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Directoras:

Zuly Jenny Rivera Monroy PhD

Erika Bustos Bustos PhD

Grupo de Investigación: Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2019

“Aquel a quien los dioses aman muere joven”

- Menandro

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Colciencias por la financiación del proyecto: "Síntesis de aductos péptido- dendrímeros para el diseño y construcción de bio-sensores". Código del Proyecto: 1101 521 28336. Número del contrato: RC 449 2011

A la Universidad Nacional de Colombia, la Facultad de Ciencias, al Departamento Química y al programa de Doctorado en Ciencias Farmacéuticas del Departamento de Farmacia, por la financiación de mi plan de estudios dentro de la Beca Asistente Docente.

Al profesor Drochss Valencia por su contribución al desarrollo de este trabajo.

Al profesor Jaiver Eduardo Rosas Pérez por su colaboración en esta investigación y en especial por su valiosa amistad.

Al profesor Javier Eduardo García Castañeda, por contribuir con su conocimiento, dedicación y optimismo en la culminación de este trabajo y en especial por su valiosa amistad.

A la profesora Erika Bustos Bustos, por todas sus enseñanzas y por brindarme la oportunidad de hondar en otros campos de la investigación científica.

Le agradezco profundamente a la profesora Zuly Jenny Rivera Monroy, por creer siempre en mis capacidades, por sus consejos, enseñanzas y su apoyo incondicional que me llevaron a no desfallecer en este recorrido. Mi más sincera

admiración y gratitud por su entrega, pasión y vocación con la que se enfrenta día a día a la investigación y docencia universitaria.

Agradezco inmensamente a mi Familia porque con su apoyo y amor infinito llenan de alegría cada paso de mi vida.

Finalmente agradezco a mi ángel del cielo, porque cada logro de mi vida es el reflejo de su voluntad en la tierra...te amo Reina mía.

RESUMEN

Los biosensores son considerados herramientas valiosas para la detección de moléculas asociadas a patologías, cuya detección temprana puede ayudar a mejorar el tratamiento y control de enfermedades. Es importante diseñar y desarrollar nuevos métodos de diagnóstico, no invasivos, que puedan ser utilizados en grandes poblaciones, que sean de bajo costo y que tengan alta sensibilidad. En un biosensor, el componente encargado del reconocimiento del analito es el bioreceptor; siendo la interacción antígeno-anticuerpo la más empleada en los métodos de inmunodiagnóstico de enfermedades. Dentro de este contexto, los péptidos derivados de proteínas propias de patógenos de interés son herramientas importantes en el diseño de bioreceptores, ya que pueden ser reconocidos por anticuerpos generados en el paciente por la presencia del patógeno. En esta tesis se realizó la funcionalización química y física de superficies de oro, con péptidos sintéticos derivados de la proteína L1 del Virus del Papiloma Humano (VPH), logrando caracterizar mediante el uso de técnicas electroquímicas el reconocimiento de la secuencia peptídica SPINNTKPHEAR por anticuerpo policlonales en la superficie de electrodos de funcionalizadas, como contribución al desarrollo de un biosensor para la detección oportuna de la infección por VPH.

Palabras clave: Biosensores, bioreceptores, VPH, interacción antígeno-anticuerpo, péptidos sintéticos, ferroceno, funcionalización de electrodos.

ABSTRACT

Biosensors are considered valuable tools for the detection of molecules associated with pathologies, whose early detection can help to improve the treatment and control of diseases. It is important to design and develop new low cost and high sensitivity diagnostic methods, non-invasive, that can be used in large populations. In a biosensor, the bioreceptor is the component responsible for the analyte recognition. The antigen-antibody interaction is the most used in the methods of immunodiagnosis of diseases. Within this context, peptides derived from pathogen proteins are important tools in the design of bioreceptors, since they can be recognized by antibodies generated in the patient when the pathogen is present. In this thesis, the chemical and physical functionalization of gold surfaces was performed with synthetic peptides derived from the L1 protein of the Human Papilloma Virus (HPV), achieving characterize using electrochemical techniques the recognition of the peptide sequence SPINNTKPHEAR by polyclonal antibodies on surface of the modified electrodes, as a contribution to the development of a biosensor for the timely detection of HPV infection.

Keywords: Biosensors, bioreceptors, HPV, antigen-antibody interaction, synthetic peptides, ferrocene, electrode functionalization.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO CONCEPTUAL	15
1.1. Virus del Papiloma Humano (VPH).....	15
1.2. Métodos de Diagnóstico del VPH.....	17
1.3. Sensores electroquímicos biológicos o Bio-sensores	19
1.4. Sensores Potenciométricos, Amperométricos y Voltamperométricos	20
1.5. Sensores electroquímicos basados en impedancia	21
1.6. Formación de monocapas	22
2. JUSTIFICACION	24
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1. General.....	27
4.2. Específicos	27
5. METODOLOGÍA.....	28
5.1. Reactivos y materiales	29
5.2. Obtención de péptidos derivados de L1-VPH	29
5.2.1. Desprotección de los grupos alfa amino	31
5.2.2. Activación y acople de los Fmoc-aminoácidos	31
5.2.3. Monitoreo del acople y desprotección (test de Kaiser)	32
5.2.4. Desprotección de las cadenas laterales y separación del péptido de la resina	33
5.2.5. Obtención de péptidos poliméricos, diméricos y tetraméricos.....	33
5.3. Caracterización y purificación de los péptidos sintéticos.....	34
5.3.1. Análisis de los péptidos sintéticos por RP-HPLC.....	34
5.3.2. Purificación de péptidos por SPE.....	35
5.3.3. Análisis de péptidos por espectrometría de masas	35

5.4.	Obtención de Anticuerpos Policlonales.	36
5.4.1.	Ratones BALB/c	36
5.4.2.	Conejos Nueva Zelanda	36
5.5.	Reconocimiento de la interacción antígeno-anticuerpo (métodos inmunoquímicos)	37
5.5.1.	Dot Blot	37
5.6.	Evaluación del título de anticuerpos mediante ELISA (Enzyme-linked immusorbent assay).....	38
5.7.	Modificación de las superficies de electrodos.....	39
5.7.1.	Modificación química	39
5.7.2.	Modificación Física.....	40
5.8.	Medidas electroquímicas.....	41
5.8.1.	Caracterización por voltamperometría cíclica del electrodo desnudo y modificado.....	42
5.8.2.	Desorción química de tioles y determinación del factor de recubrimiento ...	42
5.8.3.	Determinación de la interacción antígeno-anticuerpo.....	43
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
6.1.	Síntesis, purificación y caracterización de péptidos derivados de la proteína L1 del Virus del Papiloma Humano (L1-VPH).	46
6.1.1.	Selección de las secuencias con mejor viabilidad sintética.....	46
6.1.2.	Obtención de péptidos para inducir anticuerpos policlonales	49
6.1.3.	Obtención de péptidos para modificar las superficies de oro.....	51
6.2.	Estudio de la interacción de antígeno-anticuerpo por ensayos inmunoquímicos	56
6.3.	Caracterización electroquímica de los electrodos modificados física y químicamente y evaluación de la interacción antígeno-anticuerpo en superficie	59
6.3.1.	Modificación Física.....	59
6.3.2.	Comportamiento electroquímico de la interacción antígeno-anticuerpo en la superficie del electrodo modificado físicamente	61
6.3.3.	Modificación Química	66
6.3.4.	Estudio de la interacción - antígeno anticuerpo en la superficie de electrodos modificados químicamente.....	76

7.	CONCLUSIONES.....	78
8.	PRODUCTOS ACADÉMICOS	79
9.	BIBLIOGRAFÍA	80
10.	ANEXOS.....	90

Lista de Figuras

Figura 5-1. Diagrama de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS-Fmoc/tBu).	30
Figura 5-2. Obtención de péptidos diméricos y tetraméricos.	34
Figura 5-3. Unión de los péptidos a los electrodos de oro.	39
Figura 6-1. Caracterización Péptido VPH 2.	47
Figura 6-2. Perfiles cromatográficos de los péptidos seleccionados.	49
Figura 6-3. Obtención del tetramero VPH 64. Monitoreo de la reacción por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC).	50
Figura 6-4. Caracterización por RP-HPLC (Panel A) y MALDI-TOF (Panel B) del Péptido VPH 3.3.	51
Figura 6-5. Péptidos obtenidos para la modificación química de electrodos de oro.	53
Figura 6-6. Estabilidad de los péptidos derivados de SPINNTKPHEAR.	55
Figura 6-7. Reconocimiento antígeno anticuerpo mediante Ensayo de ELISA.	57
Figura 6-8. Titulación de sueros post III inmunización.	58
Figura 6-9. Voltamperogramas cíclicos (2, 20 y 50 ciclos) realizados con el electrodo funcionalizado con el péptido VPH 3.3.	60
Figura 6-10. Imágenes de SEM para la superficie de oro desnudo (A) y luego de la modificación con el péptido VPH 3.3 (B).	61
Figura 6-11. Voltamogramas cíclicos obtenidos con el electrodo modificado con el péptido VPH 3.3.	62
Figura 6-12. Corrientes de pico normalizadas medidas con el electrodo modificado con el péptido VPH 3.3 en PBS 0,1 mol.L ⁻¹ (pH = 7,4), en diferentes diluciones de los sueros pre inmunes (control) y post-III inmunización del péptido VPH 3.1.	63
Figura 6-13. A) Respuestas amperométricas típicas para el electrodo en presencia de diferentes concentraciones de suero post-III en presencia de PBS 0,1mol.L ⁻¹ , pH 7,4, E = 0,55V. B) Curvas de calibración para suero post-III (negro) y pre inmune (rojo).	65

Figura 6-14. Esquema del electrodo de oro policristalino modificado con (A) péptido VPH 3.2, y (B) péptido dimérico VPH 62	66
Figura 6-15. Espectros FT-IR para los electrodos VPH 3.2 Au, VPH 62 Au y Au desnudo.	67
Figura 6-16. Determinación del área activa del electrodo desnudo..	71
Figura 6-17. Voltamperograma cíclico del electrodo de oro desnudo en H ₂ SO ₄ 0,50 M.	72
Figura 6-18. Voltamperogramas cíclicos para electrodos policristalinos de oro desnudo y modificado.....	73
Figura 6-19. Efecto del pH sobre la densidad de corriente.	76
Figura 6-20. Detección de anticuerpos policlonales anti-VPH 3..	77

Lista de Tablas

Tabla 6-1. Caracterización de los péptidos sintéticos derivados de la proteína L1-VPH. ..	48
Tabla 6-2. Péptidos derivados de L1-VPH seleccionados y su función según corresponda.	56
Tabla 6-3. Asignación de las señales de los espectros FT-IR para los electrodos de oro modificados VPH 3.2 Au y VPH 62 Au.	69
Tabla 6-4. Parámetros termodinámicos del proceso redox $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ usado para las mediciones de corriente en los electrodos de Au desnudo, VPH 3.2 Au y VPH 62 Au.	75

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Término	Abreviatura	Siglas
<i>6-Cl-HOBt</i>	1-Hidroxi-6-clorobenzotriazol	
<i>Ahx</i>	Ácido 6-aminohexanoico	X
<i>Ala</i>	Alanina	A
<i>Arg</i>	Arginina	R
<i>Asn</i>	Asparagina	N
<i>Asp</i>	Ácido Aspártico	D
<i>Boc</i>	t-butiloxicarbonilo	
<i>Cys</i>	Cisteína	C
<i>DCC</i>	Diciclohexilcarbodiimida	
<i>DCM</i>	Diclorometano	
<i>DMF</i>	N,N-Dimetilformamida	
<i>EDT</i>	Etanoditiol	
<i>ELISA</i>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	
<i>Fc</i>	Ferroceno	
<i>Glu</i>	Ácido glutámico	E
<i>His</i>	Histidina	H
<i>HPLC</i>	Cromatografía líquida de alta eficiencia	
<i>Ile</i>	Isoleucina	I
<i>IPA</i>	Isopropanol	
<i>Lys</i>	Lisina	K
<i>MALDI</i>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization	
<i>MeOH</i>	Metanol	
<i>Met</i>	Metionina	M
<i>MS</i>	Mass Spectroscopy	
<i>OtBu</i>	O-Terbutilo	
<i>Pap</i>	Prueba de papanicolaou	

<i>Pbf</i>	2,2,4,6,7-pentametildihidrodenzofuran-5-sulfonilo	
<i>Phe</i>	Fenilalanina	F
<i>Pro</i>	Prolina	P
<i>RP</i>	Fase reversa	
<i>SAMP</i>	Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas	
<i>SPE</i>	Solid Phase Extraction	
<i>SPPS</i>	Síntesis de péptidos en fase sólida	
<i>tBu</i>	Terbutilo	
<i>TFA</i>	Ácido trifluoroacético	
<i>Thr</i>	Treonina	T
<i>TIPS</i>	Triisopropilsilano	
<i>TMB</i>	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina	
<i>TOF</i>	Time of Flight	
<i>Trt</i>	Tritil	
<i>VPH</i>	Virus del Papiloma Humano	

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas se pueden originar en una región y propagarse rápidamente a otras partes del planeta debido a la constante movilidad del ser humano, pudiendo conducir a una pandemia. Una clave para la prevención y control de la propagación es el desarrollo de métodos de diagnósticos que identifiquen rápidamente el agente infeccioso y así tratar la infección adecuadamente, incluso de ser necesario aislar al paciente. Grandes avances se han desarrollado en la implementación de tecnologías de diagnóstico, pese a esto, para algunas enfermedades infecciosas el diagnóstico aún está basado en técnicas desarrolladas décadas atrás, siendo invasivas, están limitados por la velocidad de análisis, requieren personal altamente calificado y con limitaciones en el umbral de detección. En países en desarrollo la cobertura de los sistemas de salud para el diagnóstico y control de enfermedades está limitada por diferentes factores como: difícil acceso a regiones apartadas, factores culturales y religiosos, entre otros. Un factor que se debe resaltar es la aceptación del método de diagnóstico, ya que los métodos invasivos no son amigables con el paciente y hacen que este sea renuente a ser diagnosticado. En este contexto, el desarrollo de métodos de diagnóstico amigables, fáciles de realizar y que sean de bajo costo, facilitarían la cobertura y mayor control de la propagación.

Los inmunoensayos son métodos bioanalíticos donde la cuantificación del analito involucra la interacción antígeno-anticuerpo. Los inmunoensayos han sido ampliamente utilizados en áreas importantes del cuidado de la salud humana como; el diagnóstico de enfermedades, el control terapéutico de fármacos, el desarrollo de estudios de farmacocinética clínica y de bioequivalencia, en el descubrimiento de principios activos y en el desarrollo productos farmacéuticos. La importancia de los inmunoensayos se atribuye a su especificidad y su alta sensibilidad, que permite el análisis de una amplia gama de analitos en muestras biológicas.

Los biosensores, son dispositivos analíticos compuestos por un elemento de reconocimiento biológico (enzima, anticuerpo, receptor o microorganismos) acoplado a un transductor químico o físico (electroquímica, masa, óptico y térmico). La detección específica y sensible de la molécula blanco, hace de los biosensores un tópico científico y tecnológico de alta relevancia por su potencial aplicación en diferentes áreas como diagnóstico médico, análisis ambiental, seguridad alimentaria, etc. (1-3).

Las técnicas electroquímicas (como la voltametría cíclica, la cronoamperometría, voltamperometría diferencial de pulso e impedancia) en el diagnóstico clínico o química clínica presentan ventajas frente a otras técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o pruebas de ELISA, debido a su alta sensibilidad, requerimiento de poca muestra, bajo costo, simplicidad y rapidez de análisis. La sensibilidad y selectividad de las técnicas electroquímicas aumentan con la modificación de las superficies electródicas, por ejemplo, con moléculas específicas a un sustrato y/o analito, generando electrodos altamente bio-específicos permitiendo obtener respuestas del orden de partes por billón e incluso menores (2-7).

1. MARCO CONCEPTUAL

1.1. Virus del Papiloma Humano (VPH)

El virus del papiloma (VPH) pertenece a la familia papovaviridae, es un patógeno intracelular obligatorio que libera su genoma y proteínas accesorias en la célula hospedera haciendo uso de la maquinaria celular para la replicación viral. El VPH es un virus sin envoltura, con un diámetro de aproximadamente de 55um (8). El genoma del virus del VPH está formado por una doble cadena de ADN circular que contiene aproximadamente 7900 pares de bases. El genoma del virus consiste básicamente de tres regiones: una región no codificante y dos regiones que codifican los genes tempranos y tardíos. Los genes L1 y L2 codifican las proteínas mayor y menor de la cápside respectivamente. La cápside contiene 72 pentámeros de L1 y alrededor de 12 moléculas de L2 (9-10). La proteína L1 (proteína mayor de la cápside) es la principal responsable de la unión a la superficie celular, los 72 pentámeros de la cápside se asocian con $T = 7$ en simetría icosaédrica (11). La proteína L1 es altamente conservada y está involucrada en la protección del genoma, interacción con la proteína L2, estabilización de la cápside, escape endosomal de los viriones y en el transporte nuclear del genoma del VPH (8).

La presencia de verrugas en la piel y en los genitales es bien conocida desde las antiguas civilizaciones (Griegos y Romanos). Particularmente, las verrugas genitales fueron consideradas como resultado de promiscuidad sexual, por lo que se catalogaron como potencialmente infecciosas. A finales del siglo IX se hizo el primer reporte en el aumento del contagio con verrugas comunes. En los años siguientes se demostró la naturaleza infecciosa de las verrugas humanas como resultados de investigaciones en la trasmisión sobre células sanas, estableciendo la naturaleza viral del agente responsable. En la década de 1920 a 1930 se confirmó la

naturaleza infecciosa de las verrugas papilomatosas presentes en garganta y zona genital. Pese a los avances en la identificación del potencial carcinogénico del papiloma virus demostrado en conejos, se observó un bajo interés en el estudio del virus asociado a verrugas humanas en este periodo de tiempo (12). La primera visualización por electromicroscopía de las partículas del VPH en verrugas humanas fue reportada en 1949. El interés en las investigaciones aumentó para finales de los cincuenta, encontrándose la relación de tumores en la vejiga urinaria del ganado con la presencia del virus del papiloma bovino en fibropapilomas presentes en la piel (13). Para 1965 aparecieron los primeros reportes de la estructura de doble cadena del ADN circular de los virus del papiloma que afectan a los humanos. En la década de los setenta la diferenciación de los tipos del VPH se evidenció por las disparidades antigénicas entre las partículas del virus presente en verrugas cutáneas y genitales. Lo anterior se originó a partir de estudios de aglutinación de partículas analizados por microscopía electrónica. Los primeros estudios que buscaban establecer una relación entre la infección por VPH y el desarrollo de cáncer cervical se iniciaron en 1972. Estos se fundamentaron en reportes de literatura médica, los cuales mencionaban la conversión de verrugas genitales en carcinoma de células escamosas, por lo que se generó la hipótesis, que el cáncer cervical puede surgir de infecciones con el virus que se encuentra en los condilomas acuminados (12).

Finalmente, en la década de los ochenta el panorama cambió abruptamente, el aislamiento de los tipos 6 y 11 de verrugas genitales y los tipos VPH 16 y 18 de biopsias del cuello uterino, resultaron en una rápida expansión de trabajos experimentales y estudios epidemiológicos, que diez años después terminaría con la aceptación de la relación directa de la infección por VPH de ciertos tipos con el desarrollo de lesiones y cáncer cervical (13).

Hasta la fecha, se han descrito más de 100 tipos de VPH y solo quince han sido asociados con tipos de alto riesgo, siendo los más comunes los tipos 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52 y 58 que representan el 95% de las clases de VPH que inducen cáncer cervical (14). El tipo VPH 16 ha sido detectado en el 50% de los casos de cáncer cervical, mientras que el otro 50% de los casos están asociados con los otros tipos de alto riesgo, aproximadamente 500.000 nuevos casos son diagnosticados anualmente (15-16). La mayoría de las infecciones por VPH de alto riesgo presentan consecuencias clínicas benignas y son resueltas espontáneamente por el sistema inmune, sin embargo, el 3,5% de estas infecciones conllevan a cáncer cervical (17).

1.2. Métodos de Diagnóstico del VPH

La detección temprana del VPH es de gran importancia en la prevención del cáncer cervical. La prueba de Papanicolaou (Pap) es efectiva en la detección microscópica de anomalías en las células del epitelio cervical (18,10). Dada la moderada sensibilidad de la prueba de Papanicolaou (con rangos entre 51-90%), se presentan falsos positivos creando la necesidad de realizar nuevos exámenes que permitan confirmar el resultado. Cabe resaltar que la aplicación de este método de diagnóstico ha permitido la reducción del número de muertes en países desarrollados, pero ha sido insuficiente en países en desarrollo (19). En Colombia la aplicación de este método se ve limitada por ser un método invasivo, causa incomodidad para las pacientes, la cobertura es limitada y la prueba no se realiza periódicamente.

Los métodos basados en técnicas de biología molecular utilizados actualmente en la detección del ADN del VPH, en muestras obtenidas por frotis y biopsias vaginales, presentan mayor sensibilidad que la prueba de Papanicolaou. Estas técnicas están basadas en la hibridación de sondas marcadas a moléculas de ADN del virus, permitiendo la localización e incluso la geno-tipificación del virus (10). Para estos métodos la sensibilidad es limitada, necesitan procesos laboriosos y de elevado costo, haciéndolos no viables como herramienta de “screening” a gran escala. La detección sanguínea del ADN del VPH parece ser más un marcador de pronóstico que un marcador de diagnóstico, debido a que la presencia del virema del VPH ha sido detectada solo en estados avanzados de las transformaciones neoplásicas, con un intervalo de detección de los casos del 12 al 65%, dependiendo el método utilizado (15,20).

El desarrollo de biosensores como método de diagnóstico de la infección causada por el VPH es un área de investigación que se encuentra en una etapa inicial, algunas de las investigaciones recientemente reportadas se presentan a continuación; (i) estudios sobre detección electroquímica del ADN del VPH mediante hibridación de un gen derivado de la proteína L1, utilizando azul de metileno sobre un electrodo de grafito (21); (ii) diseño de un geno-sensor para la detección individual y simultánea de secuencias de ADN de alto riesgo (HPV16E7p y HPV45E6) sobre electrodos de oro modificado (22); (iii) Piro y colaboradores realizaron la síntesis electroquímica de un polímero de naftoquinona sobre la superficie de un electrodo de carbón vítreo, obteniendo un polímero transductor que a su vez permitió el anclaje del péptido NLASSNYFPTPSGSM derivado de la cápside del VPH-16, en este trabajo se

demonstró la presencia del complejo antígeno-anticuerpo sobre el electrodo modificado usando sueros de pacientes infectados con VPH-16 (23). Pese a los alcances logrados en estos trabajos, hasta el momento no se ha desarrollado un sistema que permita ser considerado como una solución a la problemática del diagnóstico temprano de la infección causada por VPH, asociada al desarrollo de lesiones y cáncer de cérvix.

Es importante resaltar que la proteína L1 del VPH es considerada de gran interés para el desarrollo de métodos de diagnósticos de la infección causada por el VPH, debido a que es la más abundante del virus (10) y es altamente conservada entre los diferentes serotipos de VPH, con homologías en la secuencia de aminoácidos cercanas al 80% (8, 22, 24, 25). Las secuencias peptídicas seleccionadas como modelo experimental, para el desarrollo del presente trabajo, pertenecen a la proteína L1 del VPH y corresponden a secuencias reportadas como altamente antigénicas y/o inmunogénicas, lo que las hace promisorias como herramientas en el desarrollo de un bio receptor, basado en la interacción antígeno-anticuerpo.

1.3. Sensores electroquímicos biológicos o Bio-sensores

Estos sensores tienen la capacidad de traducir una señal proveniente de un evento biológico en una propiedad medible y cuantificable, como cambios de corriente, potencial e impedancia. El gran auge de esta clase de sensores se dio con el desarrollo del sensor para la determinación de glucosa en 1962 por Clark y Lyon, en donde técnicas electroanalíticas fueron utilizadas para la determinación cuantitativa y específica de glucosa, usando un elemento de reconocimiento biológico (glucosa oxidasa) sobre la superficie de un electrodo. Este biosensor

permitía relacionar directamente la concentración de glucosa con la disminución de la concentración de oxígeno medido a través del biosensor (26). Estos resultados fueron tan importantes que impulsaron el desarrollo de muchos otros biosensores con diversas aplicaciones, como la detección amperométrica de pequeños analitos como urea, lactato y peróxido de hidrógeno. Los resultados iniciales de Clark y Lyon y los avances posteriores, muestran la importancia de dos elementos en la construcción del biosensor, el primero el elemento transductor (tratamiento de la señal medida), junto con el elemento de reconocimiento, esto ha llevado a que actualmente existan biosensores en donde se combinan transductores electroquímicos con un componente biológico (enzimas, ácidos nucleicos, receptores celulares, anticuerpos, antígenos y células intactas) para la resolución de diversos problemas en el análisis químico, de alimentos, medio ambiente, análisis clínico, bioseguridad, entre otras áreas (27).

1.4. Sensores Potenciométricos, Amperométricos y Voltamperométricos

Las respuestas electroquímicas pueden ser medidas de diferentes maneras, la primera como el cambio de potencial con el tiempo a una densidad de corriente dada (sensores potenciométricos), la segunda como cambios de corriente a una diferencia de potencial establecida (sensores amperométricos), y por último la evaluación del cambio de corriente cuando hacemos barridos de potencial (sensores voltamperométricos). El interés por usar cada tipo de sensor varía según el requerimiento. Específicamente, con los sensores potenciométricos y voltamperométricos, se adquiere conocimiento acerca del mecanismo de transferencia de carga y método de ensado, siendo información que permite establecer las mejores condiciones de trabajo, mientras que con los sensores amperométricos se tiene mayor sensibilidad en las medidas. Sensores

amperométricos han sido aplicados con éxito para detectar el ADN de virus como; Epstein-Barr, citomegalovirus, virus del herpes simple y virus de la hepatitis B (28). Los biosensores amperométricos pueden utilizar electrodos serigrafados (screen-printed) de carbón como elemento sensor, por su estabilidad, bajo costo, son fácilmente descartables y requieren volúmenes pequeños (100 - 300 μ L) de muestra. Sin embargo, un problema que puede presentar esta clase de sensores es la inmovilización del bio-receptor, sin la desnaturalización del mismo y con una orientación definida. Así mismo, tintas a base de grafito pueden imprimirse sobre una superficie de poliestireno para ser utilizada como material de electrodo, permitiendo la adsorción o ensamblaje pasivo de anticuerpos. Otros sensores amperométricos utilizan superficies de oro para la inmovilización del elemento de reconocimiento ya que permiten la formación de monocapas auto-ensambladas (SAMs) de moléculas tioladas, una vez estas capas son formadas, el electrodo puede ser usado con una lectura amperométrica (27).

1.5. Sensores electroquímicos basados en impedancia

Biosensores e inmunosensores de impedancia electroquímica, típicamente se construyen por formación de una monocapa auto-ensamblada o una capa de polímero conductor sobre el electrodo. Después de la hibridación o interacción entre el bioreceptor y el antígeno viral, hay una respuesta medible de la conductividad a través de la superficie del inmunosensor, que se traduce en un cambio en la resistencia y/o la capacitancia de la doble capa. La detección del cambio en la capacitancia es más fácil de medir, ya que no requiere electrodo de referencia, por lo tanto, es más duradera. Sin embargo, esta técnica puede ser menos sensible y la unión no específica puede conducir a falsos positivos en la detección. Esto puede ser evitado por el 'bloqueo' a los sitios de unión no específicos de la superficie con una proteína, tal como la albúmina sérica bovina

(BSA). Un anticuerpo secundario conjugado o nano partículas de oro también se puede utilizar para amplificar la respuesta del evento de unión. La espectroscopía de impedancia electroquímica se ha aplicado para detectar una serie de virus, incluyendo el virus de la gripe, virus del herpes, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del dengue, virus de la rabia y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Es de resaltar, el uso de espectroscopia de impedancia electroquímica farádica para detectar los mecanismos y la cinética de unión de antígenos inmovilizados de VIH por anticuerpos contra el VIH (27).

1.6. Formación de monocapas

Compuestos que contengan grupos disulfuros y tioles se coordinan fuertemente con una variedad de metales, como oro, plata, platino o cobre. La estructura de una monocapa auto-ensamblada depende de la morfología del metal. El Au (III) es ampliamente usado para la formación de monocapas. Películas de oro adoptan esta forma cristalográfica, predominantemente cuando se depositan sobre vidrio pulido, silicio o mica recién escindida, además este metal es el preferido ya que es un elemento bastante inerte. Los tioles o disulfuros se adsorben directamente empleando soluciones de estos compuestos en disolventes apropiados de alta pureza (comúnmente etanol para moléculas no polares o agua para alcanotioles polares sustituidos) (29). Estudios voltamperométricos indican que los grupos tiol son desprotonados en la adsorción. La reacción de formación del enlace oro-tiolato es: $RS\text{H} + \text{Au} \leftrightarrow \text{RS} - \text{Au} + e^- + \text{H}^+$. La electrodeposición de una monocapa puede lograrse rápidamente, adicional a esto la monocapa puede ser reversiblemente adsorbida y desorbida por medios electroquímicos, mediante la siguiente reacción: $\text{Au} - \text{RS} + e^- \leftrightarrow \text{Au} + \text{RS}^-$ (30). Los alcanotioles en solución diluida, forman una monocapa densa en menos de una hora. El tiempo de adsorción parece ser independiente de la longitud de la cadena y se ha observado que

concentraciones altas conducen a tiempos más cortos de adsorción. La relación molar de una mezcla de tioles en solución resulta en la misma relación de la mezcla en la monocapa auto-ensamblada. Los dos componentes de la fase no se organizan en islas, esta característica puede ser utilizada para inmovilizar biomoléculas en una manera uniforme sobre la superficie de tal manera que se evite el impedimento estérico entre estas macromoléculas. Aunque las monocapas densas se ensamblan rápidamente, el ordenamiento puede tardar días para formarse. Para los alcanotioles ($n > 5$), la adsorción se detiene en el nivel de monocapa, no se forma una multicapa estable. Sin embargo, la formación de multicapas de un alcanotiol se observa después de 6 días de inmersión, la cinética de ensamblaje de una monocapa es de característica bifásica (29).

2. JUSTIFICACION

El cáncer cervical es la segunda causa de muerte de mujeres en edad reproductiva en el mundo, registrando 311.000 muertes en el año 2018. Las infecciones causadas por el VPH tipos 16 y 18 (VPH-16 y VPH-18) son las responsables del 70% de los casos de cáncer de cuello uterino y de las lesiones precancerosas del cuello del útero. (31). Evidencia científica proveniente de estudios virológicos, de biología molecular, estudios clínicos e epidemiológicos han identificado al VPH como el primer agente etiológico en cáncer cervical, por lo que la infección causada por VPH es considerada como el primer paso para el desarrollo de cáncer cervical (8, 14). El método general para el diagnóstico de la infección es la citología, que ha permitido el decrecimiento de la mortalidad en países desarrollados, mientras que en países en desarrollo los estudios de prevalencia no son representativos ya que esta metodología no se aplica en forma periódica y solo cubre una pequeña parte de la población, por lo que la muerte por cáncer cervical asociado a VPH es alta (15). Aunque ya existe una vacuna para prevenir la infección de VPH, en nuestra región hay una gran población especialmente jóvenes que tiene la infección y que puede en un futuro desarrollar cáncer cervical.

Es necesario desarrollar métodos de diagnóstico que posean óptima sensibilidad y especificidad para lograr una detección efectiva de la infección permitiendo discriminar de manera temprana pacientes de alto y bajo riesgo de padecer cáncer cervical, de tal forma que se pueda tratar de manera oportuna la infección (32-33). Los métodos de inmunodiagnóstico representan hoy en día una herramienta valiosa para prevención y tratamiento de enfermedades de alto impacto. El

desarrollo de métodos electroquímicos para detectar y cuantificar moléculas biomarcadoras de enfermedades (o condiciones anormales de un sistema biológico) es un área de gran interés debido a su alta especificidad y límites de detección, más sensibles en comparación a otras técnicas. Estudios recientes han mostrado la aplicabilidad de los electrodos funcionalizados con moléculas, como biosensores para la detección y cuantificación de analitos de interés (34).

Para este trabajo de investigación se seleccionó como modelo experimental la infección causada por VPH, proponiéndose secuencias derivadas de la proteína L1 del VPH en la evaluación de la interacción antígeno anticuerpo utilizando medidas electroquímicas. Esta investigación contribuye al desarrollo de bio-sensores electroquímicos basados en péptidos sintéticos que pueden ser utilizados para la detección de moléculas de interés biológico, lo que proporciona una herramienta con innumerables aplicaciones.

3. HIPÓTESIS

Antígenos sintéticos ensamblados sobre superficies de oro permiten que el reconocimiento específico antígeno-anticuerpo sea monitoreado electroquímicamente, brindando una herramienta de gran potencial en el diseño de biosensores.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Diseñar, sintetizar y caracterizar péptidos derivados de la proteína L1 del Virus del Papiloma Humano (VPH) y evaluar su utilidad en la funcionalización de superficies de oro, como primera aproximación en el desarrollo de un biosensor como método de diagnóstico para la detección temprana de la infección causada por el VPH.

4.2. Específicos

- Determinar los puntos críticos de la síntesis en fase sólida, por la estrategia Fmoc/tBu, de las secuencias peptídicas derivadas de la proteína L1 del VPH seleccionadas.
- Sintetizar y purificar péptidos análogos de las secuencias seleccionadas que puedan ser ensamblados sobre superficies de oro. Estos análogos contendrán un grupo-tiol (cisteína) en el extremo N o C terminal.
- Sintetizar polímeros de las secuencias peptídicas que hayan presentado los mejores resultados. Estos polímeros serán empleados para la inducción de anticuerpos (antipéptido) en ratones BALB/c.
- Construir monocapas auto-ensambladas sobre superficies de oro utilizando los péptidos que contienen el grupo tiol.
- Caracterizar las superficies funcionalizadas y evaluar el comportamiento electroquímico generado por la funcionalización y la posterior interacción antígeno-anticuerpo.

5. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de esta investigación se seleccionaron seis secuencias derivadas a la proteína L1 del VPH: IHSMNSTIL, MKIPNNKLFLPV, SPINNTKPHEAR, NVPDDLVIKSGSTA, AGTVGETVPDDLVIKSGST, y YIK. Esta proteína es considerada de gran interés para el desarrollo de métodos diagnósticos de la infección causada por el VPH, debido a que es la más abundante del virus y es altamente conservada entre los diferentes serotipos de VPH (25, 8). Para alcanzar los objetivos planteados en esta investigación se utilizó un diseño experimental que contempló: (i) la obtención de péptidos derivados de las secuencias seleccionadas, los cuales se emplearían para dos propósitos, (a) inducir anticuerpos policlonales y (b) modificar las superficies de electrodos de oro. (ii) Inducción de anticuerpos policlonales (anti-péptido) en dos modelos animales, ratones BALB/c y conejos Nueva Zelanda, estos anticuerpos fueron evaluados por métodos inmunoquímicos (ELISA y/o Dot Blot). (iii) Modificación física o química, de los electrodos de oro, con péptidos derivados de la proteína L1-VPH, estas superficies fueron caracterizadas por métodos electroquímicos. Finalmente, se evaluó la interacción antígeno-anticuerpo utilizando los electrodos modificados y los sueros de los ratones o conejos inmunizados. A continuación, se describen las metodologías empleadas en cada una de las etapas del desarrollo de esta investigación.

5.1. Reactivos y materiales

Los reactivos, resina Rink amida, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-6-aminohexanoico, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Ácido ferrocencarboxílico, TBTU, diciclohexilcarbodiimida, 1-Hidroxi-6-clorobenzotriazol fueron adquiridos de AAPPTec (Louisville, KY, USA). Los reactivos acetonitrilo, ácido trifluoroacético, diclorometano, diisopropiletilamina, N,N-dimetilformamida, etanoditiol, isopropanol, metanol, anhídrido acético, piridina, y triisopropilsilano fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Germany). KOH, KCl, Ru(NH₃)₆Cl₃, K₃Fe(CN)₆, y H₂SO₄ fueron adquiridos de J.T. Baker. El ferroceno, KCN, ninhidrina, adyuvante completo e incompleto de Freund y las columnas SPE Supelclean™ LC-18 fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los electrodos de oro fueron adquiridos a BASi (Lafayette, USA). Las soluciones acuosas fueron preparadas con agua desionizada ($\rho \geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$), todos los reactivos fueron empleados directamente sin purificaciones posteriores.

5.2. Obtención de péptidos derivados de L1-VPH

Los péptidos derivados de la proteína L1-VPH fueron sintetizados mediante SPPS, empleando la estrategia Fmoc/tBu (35), esta síntesis se desarrolló según el protocolo establecido en el grupo SAMP, para la obtención manual de péptidos, los mecanismos de las reacciones involucradas en esta síntesis están reportados en el

Anexo F(36,37). La SPPS-Fmoc/tBu involucra reacciones de desprotección, acople y monitoreo que se repiten hasta obtener la secuencia deseada. Los Fmoc-aminoácidos son unidos al soporte sólido y se van incorporando secuencialmente del extremo C-terminal al N-terminal (**Figura 5-1**).

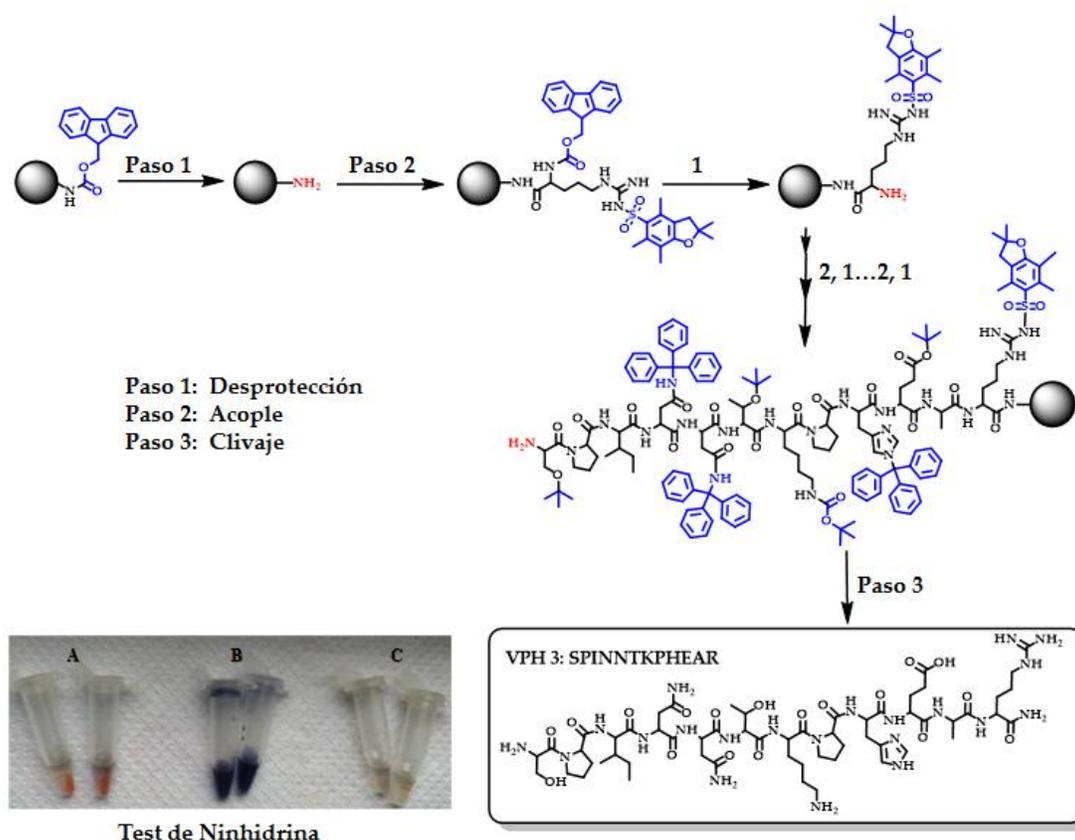


Figura 5-1. Diagrama de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS-Fmoc/tBu). Test de Kaiser (ninhidrina): Color característico para amina secundaria (A), amina primaria (B) y ausencia de grupos amino-Prueba negativa (C).

La resina empleada fue la Rink amida (100 mg, 0,46 meq/g) la cual permite obtener péptidos con terminación amida (C-terminal), esta resina fue sometida a un proceso de hinchamiento con Diclorometano (DCM), previo al proceso de síntesis. En la **Figura 5-1** se muestra el diagrama del proceso de síntesis; el Paso 1 corresponde a la reacción de remoción del grupo Fmoc (desprotección), el Paso 2 es

la reacción de formación del enlace peptídico (acople) entre los aminoácidos de la secuencia y el Paso 3 involucra las reacciones de desprotección de las cadenas laterales y la separación del péptido de la resina (Clivaje). En la desprotección y el acople se emplea como reacción de monitoreo el test de Kaiser (38), que permite determinar la presencia de grupos amino libres. El péptido crudo fue analizado mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), y purificado por extracción en fase sólida (RP-SPE) con elución por gradiente. El producto purificado se caracterizó por RP-HPLC y por espectrometría de masas MALDI-TOF.

5.2.1. Desprotección de los grupos alfa amino

Los aminoácidos empleados en la SPPS/Fmoc-tBu presentan una protección ortogonal. El grupo funcional alfa-amino (α -NH₂) está protegido con el grupo Fmoc y las cadenas laterales de los aminoácidos presentan grupos protectores que son lábiles al tratamiento con ácido trifluoroacético (grupos tritilo o terbutilo, entre otros). La remoción del grupo Fmoc se realizó por tratamiento con una base débil mediante una reacción de β -eliminación. Se utilizó como solución de desprotección piperidina 25%, tritón 1%, en DMF (%v/v). Finalmente, la resina se lavó con DMF (4 × 1 minuto), IPA (4 × 1 minuto) y DCM (4 × 1 minuto) y la desprotección se monitoreó mediante la prueba de Kaiser. La remoción del grupo ivDde fue llevada a cabo por tratamiento de la resina-péptido con una solución de hidracina al 2% en DMF por 3 minutos por tres veces.

5.2.2. Activación y acople de los Fmoc-aminoácidos

Para activar los Fmoc aminoácidos se empleó uno de los tres protocolos, que se describen a continuación, según la dificultad sintética presentada se seleccionó el

método a usar. *Formación de éster modificado*: Se disuelve el aminoácido (AA), dicitclohexilcarbodiimida (DCC), 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol (6-Cl-HOBt) (1:1:1; 5 excesos respecto a los mEq de resina) en N,N-dimetilformaamida (DMF), y se agita por 15 minutos a TA. *Formación de éster simple*: se disuelve AA, DCC, (1:1; 5 excesos) en DMF, 15 minutos a TA. *Uso de Sales de uronio*: se disuelve en DMF una mezcla que contiene 5 excesos, respecto a la resina, de AA y O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) (1:1), luego se adicionan 3 excesos molares de diisopropiletilamina (DIPEA) respecto al TBTU, la mezcla se agita por 5 minutos a TA. El aminoácido activado se adicionó a la resina lavada y desprotegida, una vez transcurrido el tiempo de acople (~1 h), la solución se retiró mediante filtración y se realizaron lavados con DMF (2 × 1 minuto), IPA (2 × 1 minuto) y DCM (2 × 1 minuto).

5.2.3. Monitoreo del acople y desprotección (test de Kaiser)

Para realizar la prueba de Kaiser (38) se prepararon tres soluciones: (i) 40 g de fenol disuelto en 10 mL de etanol absoluto; (ii) 65 mg de cianuro de potasio (KCN), 1,0 mL de agua y 49,0 mL de piridina, las soluciones (i) y (ii) son mezcladas y almacenadas (solución A). La solución B, (iii) contiene 1.25 g de ninhídrina en 25 mL de etanol absoluto (se debe almacenar en la oscuridad). Para realizar la prueba se tomó una fracción de la resina-péptido seca (~1 mg), y se le adicionaron 100 µL de la solución A y 50 µL de solución B (2:1; v/v). Una vez la mezcla es homogenizada se somete a calentamiento a 105 °C durante 6-7 minutos, y se observa el color generado por la reacción. Una coloración azul oscuro para la solución indica prueba positiva para la presencia de grupos aminos libres y coloración amarilla, prueba negativa. Para grupos amino-secundarios (Prolina), la

prueba se considera positiva cuando la resina se torna roja por la formación de una sal de iminio mientras que la solución permanece amarilla (**Figura 5-1, A-C**).

5.2.4. Desprotección de las cadenas laterales y separación del péptido de la resina

La resina-péptido desprotegida y seca, es pesada y se le adiciona una solución de desprotección y separación (Clivaje) en relación 1g resina/25 mL de solución. La mezcla de clivaje contiene ácido trifluoroacético (TFA)/agua/etanoditiol (EDT)/trisisopropilsilano (TIPS) (92.5/2.5/2.5/2.5% v/v). La reacción se mantiene en agitación constante durante 4-6 horas a TA, posteriormente la solución es filtrada y el péptido precipitado por tratamiento con éter etílico a -20 °C. La solución se centrifuga a 2500 rpm por 10 min y el sobrenadante se desecha, luego se realizan 5 lavados al precipitado obtenido, con éter etílico frío.

5.2.5. Obtención de péptidos poliméricos, diméricos y tetraméricos

Los péptidos poliméricos fueron obtenidos a partir de un péptido precursor al que se le introdujo un residuo de cisteína tanto en el extremo N como en el C terminal, (VPH 1.1, VPH 2.1 y VPH 3.1). Los péptidos fueron purificados y luego disueltos en agua desionizada (4 mg/mL) posteriormente el pH fue ajustado a 8,0 con bicarbonato de amonio, la solución se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente, hasta que desapareció la especie de partida. Las reacciones fueron monitoreadas por RP-HPLC y test de Ellman (25 µL de la solución de péptido, 100 µL de PBS pH = 7,4 y 25 µL de reactivo de Ellman fueron mezclados en intervalos de 1h (39). El desarrollo de una coloración amarilla indica la presencia de grupos tiol libres), finalmente el producto oxidado fue desalinizado y liofilizado.

El dímero (VPH 6₂) fue obtenido por SPPS, siguiendo la metodología de MAP (multiple antigen peptide) (40). Brevemente, se construyó una secuencia núcleo (core) que contenía un residuo de cisteína, uno de aminohexanoico y una Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, la cual al ser desprotegida permite posteriormente la síntesis simultánea de dos cadenas de la secuencia deseada (**Figura 5-2**). El dímero fue clivado, caracterizado por RP-HPLC y MALDI-TOF y purificado. A partir de este dímero se obtuvo la molécula tetramérica por oxidación (41).

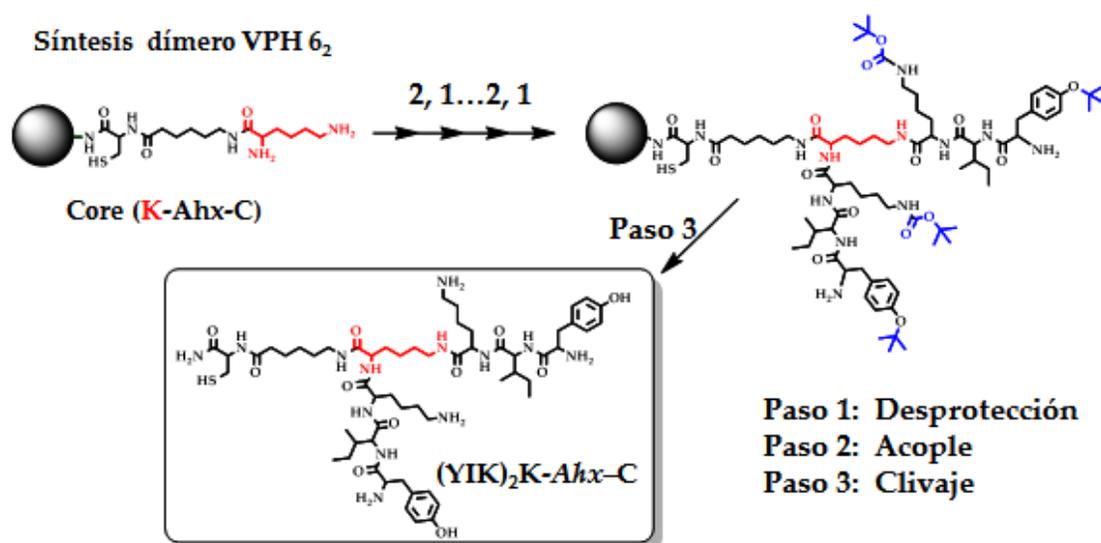


Figura 5-2. Obtención de péptidos diméricos y tetraméricos. En rojo se muestra a lisina que permite la construcción simultánea de dos cadenas con la secuencia YIK.

5.3. Caracterización y purificación de los péptidos sintéticos

5.3.1. Análisis de los péptidos sintéticos por RP-HPLC

De cada péptido crudo, o purificado, se preparó una solución de 1 mg/mL en Solvente A (TFA 0,05% v/v en agua), esta solución fue filtrada y 10 µL analizados

en una columna Eclipse XDB-C18 (3.5 μ m 4.6 \times 150 mm, Agilent) empleando un gradiente de elución de 5 a 70% de Solvente B (TFA 0,05% v/v en acetonitrilo) en 45 minutos a un flujo de 1 mL/min. Para algunos análisis fue empleada una columna C18 Merck Chromolith® C18 (50 \times 4.6 mm) empleando un gradiente de elución del 5 al 70 % de Solvente B en 11.5 minutos, a un flujo de 2 mL/min. Para ambos casos la detección fue a una longitud de onda de 210 nm en un cromatógrafo HPLC Agilent series 1260.

5.3.2. Purificación de péptidos por SPE

Con base en los resultados obtenidos de la cromatografía RP-HPLC analítica, (tiempo de retención, t_R) se diseñó un sistema de purificación. Se empleó una columna Supelclean LC-18 SPE (5 g). Brevemente, la columna fue activada con 12 mL de metanol (3 \times), luego fue lavada con 12 mL de Solvente A (3 \times), 12 mL de Solvente B (3 \times) y finalmente con 12 mL del Solvente A (3 \times). El péptido fue disuelto en el Solvente A (100 mg/2 mL) y la solución fue filtrada por una membrana de 0,44 μ m. Para cada péptido se diseñó un programa de elución y se adicionaron 12 mL de las diferentes soluciones que contenían cantidades crecientes de Solvente B. Las fracciones se recolectaron y algunas (donde se esperaba la elución del péptido) fueron evaluadas por RP-HPLC, las fracciones que contenían la especie de interés fueron reunidas y liofilizadas.

5.3.3. Análisis de péptidos por espectrometría de masas

El control de calidad en proceso, del producto crudo y producto terminado se realizó por espectrometría de masas. La relación masa/carga de los péptidos se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser

Desorption Ionization -Time of Flight) utilizando un equipo Bruker Daltonics Microflex. El péptido (1 mg/mL) fue mezclado con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (1 mg/mL) en una relación 18:2. La mezcla fue aplicada sobre la placa porta muestra y secada para su lectura. La potencia del láser fue ajustada entre 2700 y 3000V y se hicieron de 100 a 250 disparos.

5.4. Obtención de Anticuerpos Policlonales.

5.4.1. Ratones BALB/c

200 μ L de péptido de concentración (1 mg/mL) polimérico o tetramérico, fueron mezclados con 200 μ L de adyuvante completo de Freund (primera inmunización) y adyuvante incompleto de Freund para la segunda y tercera inmunización. Los ratones BALB/c fueron inmunizados vía subcutánea en la zona del lomo con 200 μ L de la mezcla emulsionada en los días 1, 20 y 40. Se realizaron sangrías los días 0 (PI), 39 (P-II) y 59 (P-III), los sueros fueron centrifugados 5 minutos a 2000 r.p.m. y almacenados a -20°C.

5.4.2. Conejos Nueva Zelanda

250 μ L de una solución de péptido (2 mg/mL) polimérico o tetramérico fueron mezclados con 250 μ L de adyuvante completo de Freund (primera inmunización) y con adyuvante incompleto de Freund para la segunda y tercera inmunización. Los conejos Nueva Zelanda fueron inmunizados intraperitonealmente en la zona inguinal con 200 μ L de la mezcla emulsionada en los días 1, 20 y 40. Se realizaron sangrías los días 0 (PI), 39 (P-II) y 59 (P-III), los sueros fueron centrifugados 5 minutos a 2000 r.p.m. y almacenados a -20°C.

5.5. Reconocimiento de la interacción antígeno-anticuerpo (métodos inmunoquímicos)

5.5.1. Dot Blot

La metodología general de evaluación del reconocimiento antígeno-anticuerpo por Dot Blot, se describe a continuación; (i) Activación de las membranas de nitrocelulosa: 3,0 mL agua Milli-Q fueron adicionados a las membranas por 3 minutos, seguido a esto se sumergieron en 3,0 mL de Buffer de transferencia 1x (300 mL solución stock de transferencia 5 x [Tris base 15 g, Glicina 72 g en 1,0 L de agua Milli-Q], 150 mL de metanol, volumen final de 1,5L completados con agua Milli-Q) por 3 minutos, el exceso de Buffer se retiró por absorción sobre papel filtro. (ii) Adsorción de los péptidos; 2,5 μ L de Albumina Sérica Bovina (BSA, 20 ng/ μ L) como control negativo, 2,5 μ L anticuerpo secundario (α Mouse-HRP, 1:2000) como control positivo y 2,5 μ L de solución de péptido en buffer TBS (Tris 20 mM/HCl pH 7,5, NaCl 150 Mm en agua Milli-Q) de diferente concentración fueron adicionados sobre la membrana hasta adsorción total. (iii) Bloqueo de sitios no específicos: Se sumergieron las membranas en solución de bloqueo (leche descremada al 5% en buffer TBS) y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas una vez con buffer TBS. (iv) Luego se sumergieron las membranas en 400 μ L de las diferentes diluciones de las muestras de suero (pre inmune y PIII 1:100, en canales individuales según corresponda) y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante. Las cajas fueron lavadas 3 veces por 10 minutos con solución de bloqueo y una vez en buffer TBS por 1 minuto. (v) 4,0 mL de anticuerpo secundario dilución 1:2000 en

buffer TBS, fueron adicionados a las membranas e incubados por 2 horas a temperatura ambiente y luego fueron lavadas 3 veces por 10 minutos con solución de bloqueo y una vez con buffer TBS por 1 minuto. (vi) Revelado: Las membranas fueron sumergidas en solución de revelado (TBS 5 mL, 4-Cloronaftol 1 mL [60 mg en 20 mL de metanol frio] y 6 μ L de Peróxido de Hidrogeno al 30%), la reacción se detuvo sumergiendo las membranas en agua Milli-Q.

5.6. Evaluación del título de anticuerpos mediante ELISA (Enzyme-linked immusorbent assay).

La evaluación del reconocimiento antígeno-anticuerpo, se realizó bajo los siguientes lineamientos; 100 μ L de péptido de concentración 10 μ g/mL fueron adsorbidos en una caja de 96 pozos (F16 Maxisorp loose Nunc-immuno module, Thermo Scientific) a 37° centígrados por 1 hora, seguido a esto se dejaron toda la noche a 4° centígrados, finalizando con 1 hora a 37° centígrados. Luego las cajas se lavaron 5 veces con solución de lavado (Tween-20 al 0.1% en buffer de fosfatos, pH = 7,4), y 2 veces con agua destilada. Se adicionó 100 μ L de solución de bloqueo (leche al 5% en PBS) y se incubó una hora a 37° centígrados. Las cajas fueron lavadas 5 veces con solución de lavado y dos veces con agua destilada. Luego se adicionó 100 μ L de cada una de las diluciones de las muestras de suero (preimmune y PIII) y se incubó por una hora a 37° centígrados. Las cajas se lavaron y 100 μ L de anticuerpo secundario (conjugado anti-IgG de ratón o conejo según corresponda, acoplado a peroxidasa en dilución 1:5000) fueron adicionados y las cajas se incubaron una hora a 37° centígrados y se lavaron 5 veces con solución de lavado y dos veces con agua destilada. Se adicionaron 100 μ L de solución de revelado (TMB y H₂O₂ en dilución 1:1) y la absorbancia se leyó a 620 nm.

5.7. Modificación de las superficies de electrodos

Los electrodos de oro fueron modificados con los péptidos derivados de la proteína L1 del VPH mediante dos técnicas, (i) adsorción física y (ii) unión química a través del grupo tiol de la cisteína.

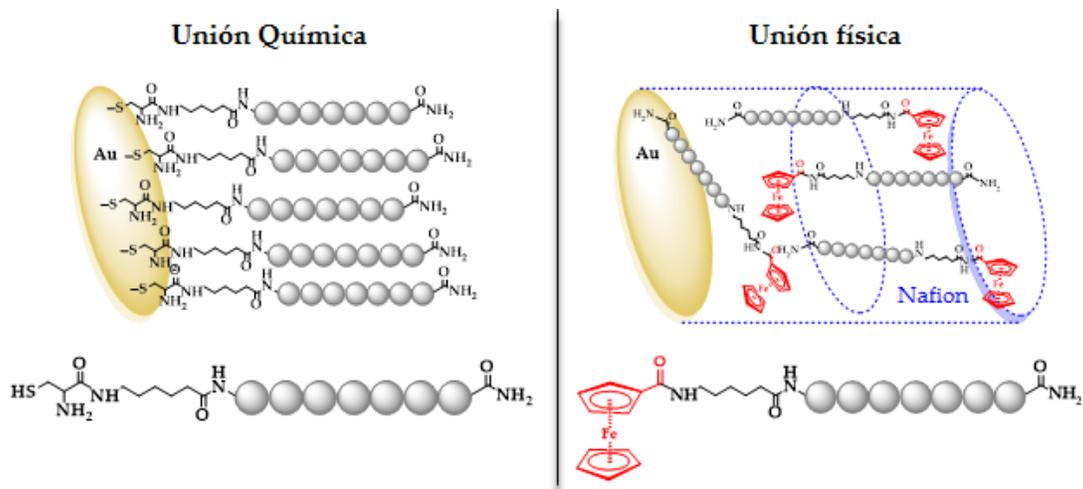


Figura 5-3. Unión de los péptidos a los electrodos de oro. Unión química a través del grupo tiol de la cisteína. Unión física: el péptido organometálico es embebido en el polímero (recuadro azul). Para las estructuras, el ferroceno (en rojo), las esferas grises representan los aminoácidos de las secuencias seleccionadas. En la parte inferior se muestran los péptidos usados en cada modificación.

5.7.1. Modificación química

Pre-tratamiento del electrodo de trabajo. El electrodo policristalino de oro fue sometido a un tratamiento físico, mediante pulido mecánico con suspensiones de alúmina de diferente tamaño de partícula (1,0 μm , 0,3 μm y 0,05 μm) sobre paños de microfibras (Buehler, USA) hasta alcanzar un brillo en la superficie tipo espejo. El exceso de alúmina sobre la superficie del electrodo se retiró por lavado y se complementó la limpieza de la superficie del electrodo con sonicación en agua desionizada y etanol durante 10 minutos. La limpieza de la superficie de oro, se complementó con un tratamiento electroquímico de la superficie, aplicando 20 ciclos por

cronoamperometría de doble pulso entre ± 1.0 V vs Ag/AgCl/KCl 3 M, en una solución H_2SO_4 0,5 M (42). Mediante el análisis del último voltamperograma, se pudo calcular el área real del electrodo y la carga requerida para la formación de una monocapa de AuO(43–47).

Modificación de la superficie del electrodo de trabajo. El auto-ensamblaje de los péptidos sobre las superficies de oro se llevó a cabo por inmersión de los electrodos de trabajo en solución de péptido 1 mM en metanol, por 24 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo los electrodos modificados se lavaron cuidadosamente con metanol y agua desionizada para remover el material adsorbido físicamente (48). Esto permitió la modificación química de la superficie de oro, por adsorción de los péptidos los cuales contienen un grupo tiol en el extremo C terminal.

5.7.2. Modificación Física

5 mg del péptido organometálico (**Figura 5-3**) se mezcló con 0,25 mL de Nafion/DMF (1:1), la solución se sometió a ultrasonicación y agitación en un vortex por 30 minutos hasta obtener una solución amarilla uniforme. Antes de la modificación la superficie de oro, esta fue pulida con una lija de 0,3 y 0,05 μm de alumina y lavada con agua desionizada y etanol varias veces. Para modificar el electrodo se empleó el método de goteo "drop-casting". Brevemente; 4,5 μL ($3 \times 1,5$ μL) de la solución del péptido se adicionó a la superficie de oro, posteriormente el solvente fue evaporado bajo un flujo de aire caliente (10 minutos). Luego de lograr la evaporación total del solvente en la superficie del electrodo modificado, este se almacenó en desecador por 24 horas previo a su uso (49).

5.8. Medidas electroquímicas

Las medidas de voltamperometría cíclica y amperometría se realizaron utilizando un Analizador Voltamétrico BAS CV-50W en el Laboratorio de Electroquímica del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, un potencióstato/galvanostato EC ELIPSON en el Laboratorio de Sensores Electroquímicos del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S. C. (CIDETEQ) Querétaro - México y un potencióstato AUTOLAB PGSTAT128N (Metrohm Siam Company Ltda.) controlado mediante software NOVA en el Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo - Brasil. Un sistema convencional de tres electrodos fue utilizado en los ensayos electroquímicos, el cual contaba con un electrodo de referencia de Ag/AgCl 3 M KCl, un alambre de platino como electrodo auxiliar y un electrodo de oro policristalino desnudo y/o modificado como electrodo de trabajo, inmersos en una celda de 10 mL. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada ($\rho \geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$), las medidas se realizaron a temperatura ambiente y con soluciones desoxigenadas por flujo de argón o nitrógeno UAP. Las condiciones del electrolito soporte y la selección de las moléculas sondas redox se determinaron según la conveniencia en la medida. Estas medidas electroquímicas se realizaron para caracterizar las superficies de los electrodos de oro modificados con péptidos y para evaluar el reconocimiento antígeno-anticuerpo sobre la superficie del electrodo.

5.8.1. Caracterización por voltamperometría cíclica del electrodo desnudo y modificado.

Se caracterizó electroquímicamente el electrodo antes de la modificación obtenida, mediante voltamperometría cíclica, como se describe a continuación: El sistema convencional de tres electrodos, descrito en el numeral anterior, se utilizó para determinar el efecto de la modificación sobre el electrodo de trabajo, en el comportamiento electroquímico de una solución 1mM de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_3\text{Cl}$ (molécula sonda), en cloruro de potasio (KCl) 0,5 M como electrolito soporte, las medidas se realizaron entre el potencial de circuito abierto a corriente nula y $-0,4 \text{ V}$ vs Ag/AgCl 3 M KCl. Del análisis de los voltamperogramas obtenidos a diferentes velocidades de barrido, se extrajeron los parámetros termodinámicos asociados al proceso, también se calculó el área electro activa del electrodo desnudo (50). Este estudio se realizó para caracterizar el comportamiento de la modificación de las superficies de oro y para determinar las condiciones apropiadas para los ensayos de reconocimiento antígeno – anticuerpo sobre la superficie de los electrodos modificados.

5.8.2. Desorción química de tioles y determinación del factor de recubrimiento

La desorción reductiva del grupo tiol presente en los péptidos se realizó por voltamperometría cíclica entre el potencial a corriente nula y $-0,4 \text{ V}$ vs Ag/AgCl 3 M KCl en KOH 0,5 M. A partir de la carga asociada al proceso, se pudo determinar el factor de recubrimiento Γ en los electrodos modificados por cada péptido (51). Este parámetro permite determinar el número de moléculas adsorbidas sobre la superficie, así mismo evaluar el tipo del auto-ensamble por formación de monocapas o sub-monocapas.

5.8.3. Determinación de la interacción antígeno-anticuerpo

Las soluciones de suero pre inmune y post tercera tanto de ratones BALB/c como de conejos Nueva Zelanda se prepararon en PBS 0,1 mol/L de acuerdo la dilución requerida para cada ensayo. Antes de la inmersión de los electrodos modificados química o físicamente, o de la adición de la dilución de suero en la celda electroquímica, las soluciones fueron homogenizadas en vortex y se llevaron a ultrasonido por 10 minutos. Previo a la lectura por cualquier método electroquímico las soluciones en las celdas fueron burbujeadas con N₂ retirando el oxígeno de la solución.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se exploró la viabilidad de obtener superficies de oro funcionalizadas con péptidos y su uso en la determinación electroquímica del reconocimiento antígeno-anticuerpo. Como modelo de estudio se escogió el VPH, se seleccionaron seis secuencias derivadas de la proteína L1 de la cápside del VPH (L1-VPH), las cuales son promisorias como herramientas en el desarrollo de un método diagnóstico, debido a que han sido reportadas como altamente antigénicas; a continuación, se describen brevemente estos reportes. (i) *Rocha-Zabaleta* y colaboradores reportaron en 2004 que anticuerpos que reconocen la secuencia IHSMNSTIL (péptido VPH 1) pueden ser encontrados en sueros de pacientes con lesiones intraepiteliales de bajo grado, infectadas con VPH's de alto riesgo asociados al desarrollo de cáncer cervical. Este péptido no presenta reacción frente a anticuerpos de pacientes con lesiones intraepiteliales de bajo grado infectadas con serotipos de VPH's considerados de bajo riesgo, esta secuencia permite la discriminación de pacientes infectados con VPH's de alto riesgo (9). (ii) Las secuencias MKIPNNKLFLPV (péptido VPH 2) y SPINNTKPHEAR (péptido VPH 3) expresadas en clones de fagos, son reconocidas por anticuerpos de pacientes infectadas por VPH con lesiones presentes en el cérvix (52). (iii) La obtención de anticuerpos monoclonales de fragmentos recombinantes de la proteína L1 de VPH-16 ha permitido reconocer la secuencia NVPDDLVIKGGSTA (péptido VPH 4) como una región antigénica importante (25). (iv) Así mismo la secuencia AGTVGETVPDDLVIKGGST (péptido VPH 5) es reconocida por

anticuerpos de ratones inmunizados con una secuencia análoga, presentándose como útil en la obtención de anticuerpos anti-péptido (53). (v) Se describió que anticuerpos monoclonales 8C4, 3D1, 1D6, 5A4 reconocen antígenos virales del VPH-16, como también reconocen específicamente en ensayos de inmunoblots regiones de VPH-16 L1 (residuos 172 – 375 y 1-505). Se determinó que estos anticuerpos monoclonales se unen específicamente a la secuencia YIK (péptido VPH 6) (25).

Una vez seleccionadas las secuencias para este estudio, se planteó un diseño experimental que involucró tres etapas, las cuales se describen a continuación. Posteriormente, se mostrarán los resultados obtenidos en cada etapa y la discusión de estos.

ETAPA 1. Síntesis, purificación y caracterización de péptidos derivados de la proteína L1-VPH: (i) Determinación de la viabilidad sintética de las secuencias seleccionadas. (ii) Diseño y obtención de péptidos para inducir anticuerpos policlonales. (iii) Diseño y obtención de péptidos para modificar química o físicamente las superficies de oro.

ETAPA 2. Inducción de anticuerpos anti-péptido, en (i) ratones BALB/c y en (ii) Conejos Nueva Zelanda, usando polímeros y tetrámeros derivados de los péptidos seleccionados según su viabilidad sintética

ETAPA 3. Funcionalización de electrodos de oro con péptidos derivados de L1-VPH: (i) adsorción física de un péptido organometálico derivado de L1-VPH, (ii) modificación química. Caracterización de las superficies modificadas y evaluación de la interacción antígeno-anticuerpo, utilizando los electrodos funcionalizados y los sueros de los conejos inmunizados.

6.1. Síntesis, purificación y caracterización de péptidos derivados de la proteína L1 del Virus del Papiloma Humano (L1-VPH).

6.1.1. Selección de las secuencias con mejor viabilidad sintética

Se sintetizaron los péptidos lineales seleccionados, VPH 1, VPH 2, VPH 3, VPH 4 y VPH 5. Para el caso de la secuencia YIK se planteó el diseño de un péptido dimérico, (YIK)₂K-*Ahx*-C (VPH 6₂), el cual contiene una cisteína en el extremo N-terminal y un residuo del ácido 6-aminohexanoico como espaciador.

El péptido VPH 1: ¹IHSMNSTIL⁹ no presentó dificultad en su síntesis, para la mayoría de los residuos se realizaron dos ciclos de acople, a excepción del residuo ¹Ile en el cual se hicieron cuatro ciclos. El péptido VPH 2: ¹MKIPNNKLFLPV¹², presentó dificultad en la incorporación de la ²Lys (tres ciclos). Para el péptido VPH 3: ¹SPINNTKPHEAR¹² se tuvo dificultad en la incorporación del residuo ⁴Asn (cuatro ciclos), ver **Anexo A**. Todos los aminoácidos del péptido VPH 6₂: (YIK)₂K-*Ahx*-C fueron incorporados fácilmente (un ciclo). Los péptidos VPH 4 y VPH 5, presentaron alta dificultad.

Los productos de síntesis obtenidos fueron caracterizados por RP-HPLC, el perfil cromatográfico permitió diseñar, para cada molécula, un programa de purificación usando columnas RP-SPE y elución con gradiente. Una vez purificados, los péptidos fueron analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF. A manera de ejemplo se muestran los resultados del péptido VPH 2 (**Figura 6-1**), el perfil cromatográfico del producto crudo muestra una especie principal en un tiempo de retención (*t_R*) de 22,20 minutos y especies de subproductos apolares (**Figura 6-1B**). Después de la purificación, el producto presenta una pureza cromatográfica del

Tabla 6-1. Caracterización de los péptidos sintéticos derivados de la proteína L1-VPH.

Código	Secuencia	t_R	Masa	$[M+H]^+$
		(minutos)	teórica	m/z
VPH 1	IHSMNSTIL	17,97	1013,5	1014,8
VPH 1.1	CGIHSMNSTILGC	20,15	1333,6	1335,1
VPH 2	MKIPNNKLFPLV	22,20	1411,8	1413,9
VPH 2.1	CGMKIPNNKLFPLVGC	22,60	1731,9	1733,2
VPH 3	SPINNTKPHEAR	11,40	1361,7	1363,1
VPH 3.1	CGSPINNTKPHEARGC	12,90	1681,8	1682,7
VPH 3.2	C-Ahx-SPINNTKPHEAR	13,62	1577,8	1579,9
VPH 3.3	Fc-Ahx-SPINNTKPHEAR	17,60	1684,8	1687,8
VPH 3.4	Ac-C-Ahx-(Fc)KSPINNTKPHEAR	19,10	1957,9	1960,7 ^a
VPH 3.5	Ac-C-Ahx-SPINNTKPHEAR(Fc)K	18,40	1957,9	1960,5 ^a
VPH 4	NVPDDLYIKGSGSTA	18,50	-	-
VPH 5	AGTVGETVPDDLYIKGSGST	19,50	-	-
VPH 6 ₂	(YIK) ₂ K-Ahx-C	14,78	1169,70	1171,1

Ahx: residuo del ácido 6-aminohexanoico. Fc: residuo de ferroceno. En negrilla la secuencia antigénica derivada de L1-VPH. ^aEl dato corresponde a **M** calculado, de m/z correspondiente a $[M+2H]^{2+}$ y $[M+3H]^{3+}$

Para los péptidos VPH 1, VPH 2, VPH 3 y VPH 6₂ fue posible obtener una molécula con una pureza cromatográfica superior al 80%, como se puede observar en la **Figura 6-2A**; para estos péptidos, los espectros de masas mostraron señales en m/z correspondientes a la especie $[M+H]^+$, (**Tabla 6-1**). Por otro lado, los péptidos VPH 4 y VPH 5, muestran perfiles cromatográficos complejos y no fue posible purificar los productos de interés (**Figura 6-2B**).

De esta primera parte del trabajo, acorde con los resultados de síntesis se seleccionaron cuatro secuencias: VPH 1, VPH 2, VPH 3 y VPH 6₂

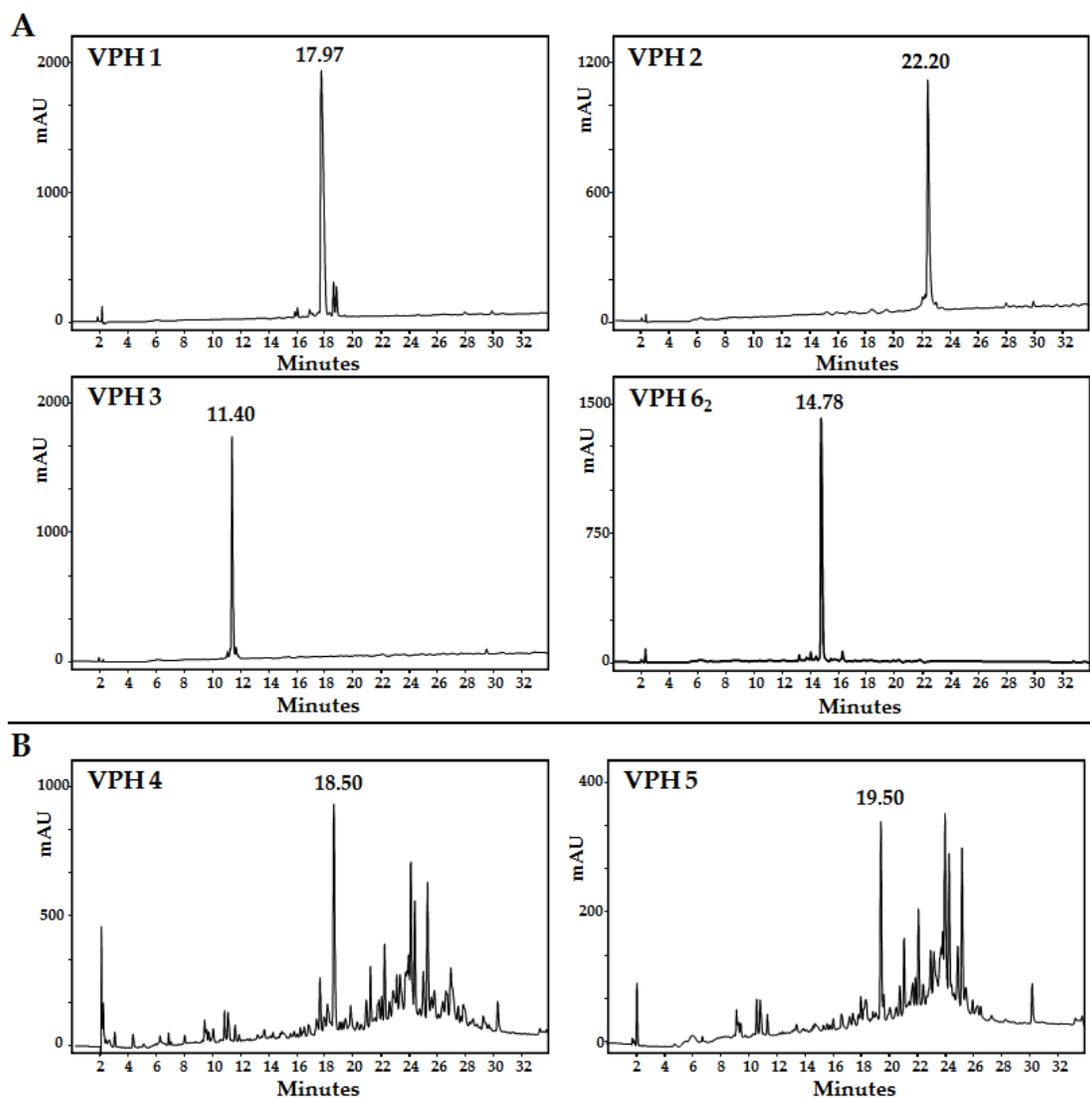


Figura 6-2. Perfiles cromatográficos de los péptidos seleccionados. Para VPH 1, VPH 2, VPH 3 y VPH 6₂ se muestran los perfiles de los productos obtenidos después del proceso de purificación (Panel A). Para VPH 4 y VPH 5 se muestran los perfiles de los productos crudos (Panel B).

6.1.2. Obtención de péptidos para inducir anticuerpos policlonales

A partir de las secuencias seleccionadas, VPH 1, VPH 2 y VPH 3, se diseñaron y sintetizaron péptidos que contenían un residuo de cisteína tanto en el extremo N

como en el C terminal, adicionalmente, se introdujo un residuo de glicina como espaciador. Estos péptidos corresponden a las secuencias VPH 1.1, VPH 2.1 y VPH 3.1 (Tabla 6-1). Los productos de síntesis fueron caracterizados por RP-HPLC, luego purificados y analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF (Anexo 2, Tabla 1). El péptido VPH 3.1 fue oxidado generándose el correspondiente polímero $\{CGSPINNTKPHEARGC\}_n$: (VPH 3.1) $_n$, el cual fue soluble. Los polímeros obtenidos a partir de la oxidación de VPH 1.1 y VPH 2.1 fueron insolubles y por este motivo estas secuencias fueron descartadas del estudio. Por otro lado, la oxidación del dímero VPH 6₂ permitió generar el tetrámero VPH 6₄. Todas las reacciones de oxidación fueron monitoreadas por test de Ellman y por RP-HPLC, a manera de ejemplo, se muestra la oxidación del dímero VPH 6₂ (Figura 6-3).

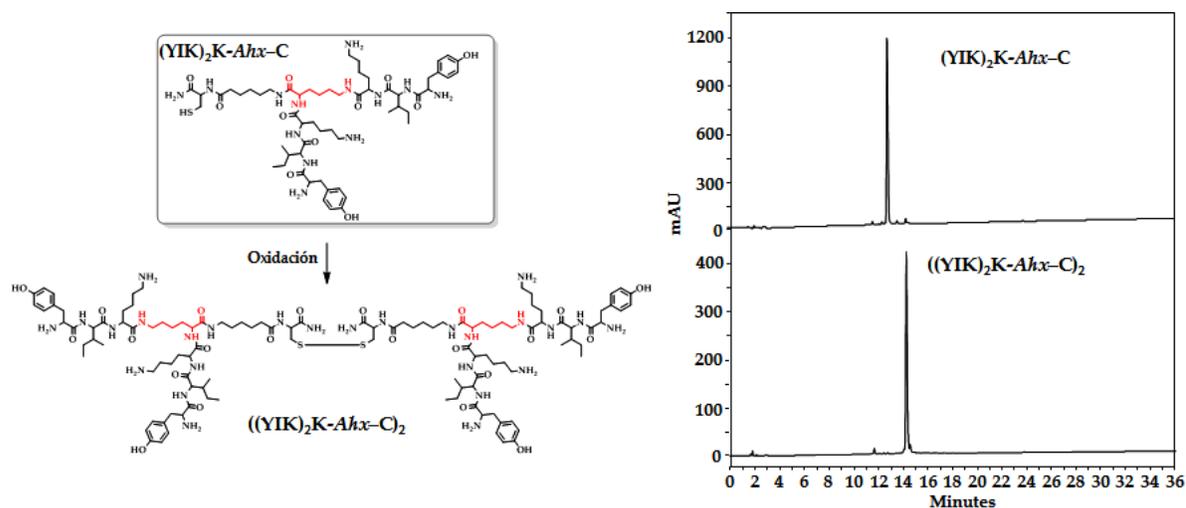


Figura 6-3. Obtención del tetrámero VPH 6₄. Monitoreo de la reacción por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC).

El polímero (VPH 3.1) $_n$ y el tetrámero VPH 6₄ fueron seleccionados para inmunizar animales (ratones y conejos) y así obtener anticuerpos policlonales *anti*-SPINNTKPHEAR y *anti*-YIK, respectivamente.

6.1.3. Obtención de péptidos para modificar las superficies de oro.

Los péptidos pueden ser adsorbidos físicamente (electrostaticamente, a través de interacciones hidrófobas, atrapados en membranas, etc.) en diferentes superficies de electrodos. En este contexto, se diseñó el péptido Fc-*Ahx*-SPINNTKPHEAR (VPH 3.3), para ser inmovilizado sobre un electrodo de oro por adsorción, a esta molécula se le incorporó un residuo de ferroceno (Fc), que permitiera lecturas electroquímicas directas y un espaciador (*Ahx*) que separa al ferroceno de la secuencia antigénica. La molécula fue sintetizada, purificada y caracterizada, en la **Figura 6-4** se muestra el perfil cromatográfico y el espectro de masas MALDI-TOF del producto después de purificarlo.

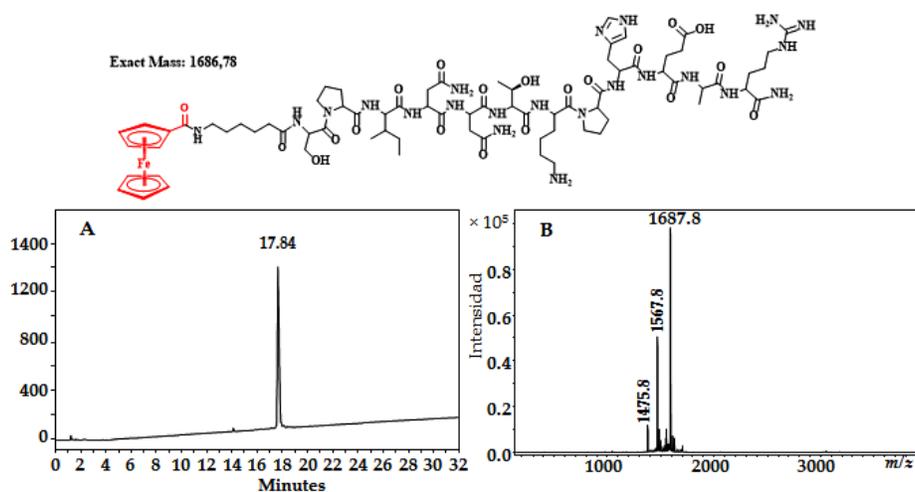


Figura 6-4. Caracterización por RP-HPLC (Panel A) y MALDI-TOF (Panel B) del Péptido VPH 3.3.

En el cromatograma, **Figura 6-4A**, se observa una especie principal en t_R 17,84 minutos, y el espectro de masas presenta una señal en m/z 1687,8 correspondiente a la especie $[M+H]^+$. También se observa (i) una señal en m/z 1567,8 que corresponde al producto sin un anillo de ciclopentadienilo y el átomo de Fe, y (ii) en m/z 1475,8 que corresponde al péptido sin ferroceno. Sin embargo, en el perfil cromatográfico

solo se observa una señal, y no se ven picos que puedan ser estos productos; la co-elución tampoco es factible ya que la hidrofobicidad de la especie con y sin ferroceno es diferente.

Por otro lado, para unir químicamente los péptidos a los electrodos de oro, se diseñaron las siguientes moléculas: (i) péptido VPH 3.2: C-*Ahx*-SPINNTKPHEAR, al cual se le incorporó el residuo de *Ahx*, que separa la secuencia antigénica de un residuo de Cys, en el extremo N-terminal, este aminoácido se incorporó ya que es bien sabido que los compuestos que contienen grupos tiol se unen fuertemente a una gran variedad de metales, incluidos el oro, la plata, el platino y el cobre. La estructura de una monocapa autoensamblada depende principalmente de la morfología del metal, el oro es ampliamente utilizado para la formación de monocapas(29,54–59). (ii) El péptido dimérico VPH 62 se seleccionó para unirlo químicamente al electrodo ya que contiene un residuo de Cys. Cabe resaltar que al unir el VPH 3.2 o VPH 62 a una superficie electródica, se hace necesario el uso de una sonda redox externa para hacer lecturas electroquímicas, por ejemplo, el par redox $Ru(NH_3)_6^{3+}/Ru(NH_3)_6^{2+}$. Adicionalmente, (iii) se diseñaron dos péptidos que se pudieran unir al electrodo de oro y que tuvieran en su estructura una sonda redox como el ferroceno: VPH 3.4 (Ac-C-*Ahx*-(Fc)KSPINNTKPHEAR) y VPH 3.5 (Ac-C-*Ahx*-SPINNTKPHEAR(Fc)K). Como se observa, específicamente estas moléculas contienen en su estructura, la secuencia antigénica, un residuo de cisteína, en el extremo C terminal; un espaciador (*Ahx*) y finalmente, un residuo de lisina, que permite unir el ácido ferrocencarboxílico (Fc) al grupo amino de la cadena lateral (ϵNH_2), **Figura 6-5**, estructuras **C-D**.

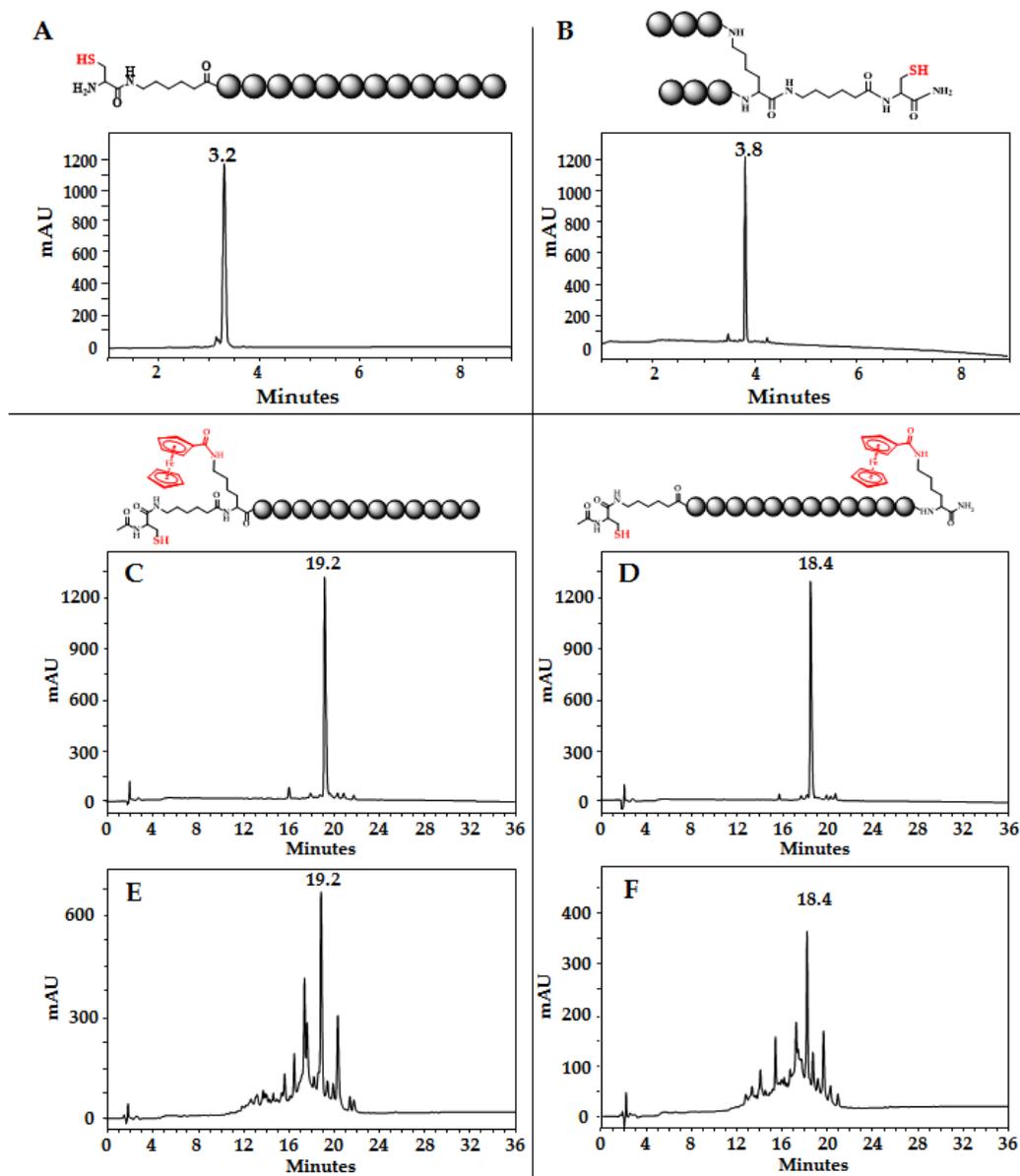


Figura 6-5. Péptidos obtenidos para la modificación química de electrodos de oro. Análisis RP-HPLC de los péptidos: VPH 3.2 (A), VPH 62 (B), los péptidos VPH 3.4 y VPH 3.5 se analizaron antes (C y D, respectivamente) y después del proceso de liofilización (E y F, respectivamente). Para A y B se usó la columna Chromolith y para C-F la Eclipse.

Las moléculas diseñadas para modificar los electrodos, químicamente, se obtuvieron mediante SPPS, se purificaron por RP-SPE y se caracterizaron mediante RP-HPLC y ESI MS o MALDI-TOF MS. En la **Figura 6-5 (A-D)** se presentan los perfiles cromatográficos de los productos puros obtenidos, en todos los casos se tiene una especie principal con pureza superior al (80%), la caracterización por espectrometría de masas mostró para VPH 3.2 y VPH 6₂ una señal correspondiente a la especie $[M+H]^+$ y para los péptidos VPH 3.4 y VPH 3.5 se encontraron señales correspondientes a las especies $[M+2H]^{2+}$ y $[M+3H]^{3+}$, (**Tabla 6-1**).

Después del proceso de liofilización de los péptidos purificados VPH 3.4, VPH 3.5 el perfil cromatográfico cambió, mostrando varios picos (**Figura 6-5 E-F**), este resultado sugiere que estos péptidos no son estables. Tratando de entender que causaba la inestabilidad de estas moléculas se preparó una solución 0,5 mM del péptido VPH 3.3 (que contiene ferroceno) puro y se mezcló con cisteína 0,5 mM (1: 1 v/v) y luego la mezcla se liofilizó. El perfil cromatográfico del péptido VPH 3.3 liofilizado y almacenado por seis meses muestra una especie principal, en t_R 18,9 minutos, al mezclarlo con la cisteína y liofilizar aparecieron especies entre 15 y 17 minutos. lo que sugiere una degradación del VPH 3.3 causada por la presencia de la Cys (**Figura 6-6 A, B**).

Adicionalmente se estudió la estabilidad del péptido VPH 3.2 (que contiene Cys) en presencia de ácido ferrocencarboxílico, para esto se prepararon soluciones 0.5 mM de ambos reactivos y se mezclaron 1:1, la reacción se monitoreo por RP-HPLC (**Figura 7-6 C-D**). En los perfiles cromatográficos se observa la especie correspondiente a VPH 3.2 en t_R 3,2 minutos y el ácido ferrocencarboxílico en t_R 5.5 minutos. La degradación del péptido VPH 3,2 se evidenció ya que, en el perfil cromatográfico de la reacción después de 24 horas, aparecen nuevas señales entre

3,2 y 4,5 minutos y la intensidad de la señal en 3,2 min disminuye. Estos resultados sugieren que los péptidos derivados de la secuencia SPINNTKPHEAR que contienen residuos de ferroceno y cisteína no son estables.

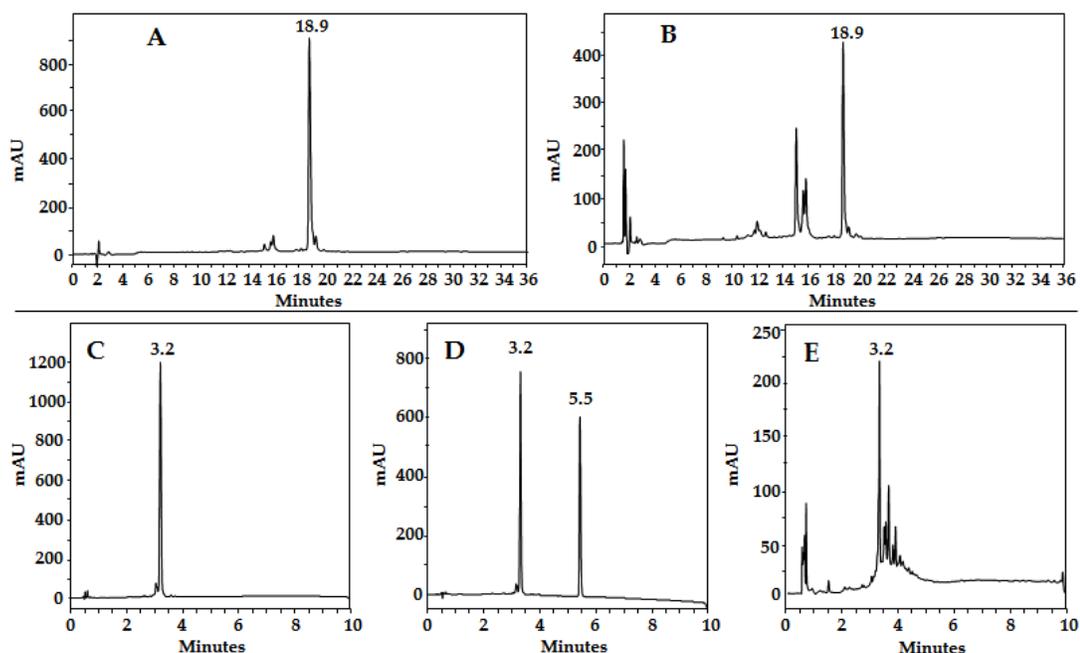


Figura 6-6. Estabilidad de los péptidos derivados de SPINNTKPHEAR. Perfil cromatográfico del péptido: VPH 3.3 (A, tR: 18,9 minutos.), VPH 3.3 mezclado con solución de cisteína y liofilizado (B). Reacción entre el péptido VPH 3.2 (C, tR: 3,2 minutos) y el ácido ferrocenocarboxílico libre (tR: 5,5 minutos), tiempo de reacción 0 horas (D) y 24 horas (E).

En esta etapa del trabajo, por viabilidad sintética, solubilidad y estabilidad se seleccionaron: (i) dos familias de péptidos, (ii) dos péptidos para inmunizar ratones BALB/c y Conejos Nueva Zelanda y generar anticuerpos policlonales anti-péptido y (iii) tres moléculas para modificar los electrodos de oro: una por modificación física, a la que se le incorporó un ferroceno y dos para modificación química. En la **Tabla 6-2** se describe en detalle las moléculas seleccionadas.

Tabla 6-2. Péptidos derivados de L1-VPH seleccionados y su función según corresponda.

Familia	Código	Secuencia	Uso
VPH 3	(VPH 3.1) _n	(CGSPINNTKPHEARGC) _n	Generar anticuerpos policlonales
	VPH 3.2	C-Ahx-SPINNTKPHEAR	Modificación química
	VPH 3.3	Fc-Ahx-SPINNTKPHEAR	Modificación física
VPH 6	VPH 6 ₂	(YIK) ₂ K-Ahx-C	Modificación química
	VPH 6 ₄	((YIK) ₂ K-Ahx-C) ₂	Generar anticuerpos policlonales

6.2. Estudio de la interacción de antígeno-anticuerpo por ensayos inmunoquímicos

Con el objetivo de generar anticuerpos policlonales contra las secuencias SPINNTKPHEAR y YIK se inmunizaron ratones BALB/c con el polímero (VPH 3.1)_n y con el tetrámero VPH 6₄, según el esquema detallado en la metodología.

En la **Figura 6-7A** se muestra la absorbancia a 620 nm obtenida en el ensayo de ELISA con los sueros post III inmunización de tres ratones (por péptido) en contraste con los sueros PI (preinmune). Si bien se observa una mayor absorbancia para los sueros post III para los ratones 1 y 3 inmunizados con el péptido (VPH 3.1)_n, la señal de fondo generada por los sueros pre inmunes es hasta tres veces mayor a la presentada por el control negativo (pozo bloqueado con solución de leche descremada al 5% en PBS 0,1 M, pH 7,4), por lo cual el reconocimiento específico de los anticuerpos policlonales no se puede asegurar, en especial para los ratones inmunizado con el péptido VPH 6₄.

Con la intención de confirmar la antigenicidad de los péptidos (VPH 3.1)_n y VPH 6₄ se realizó la evaluación del reconocimiento mediante la técnica Dot-Blot. En la **Figura 6-7B** se presentan las membranas de nitro celulosa reveladas con 4-CN en H₂O₂. En cada grupo de membranas se sembró el péptido correspondiente en concentraciones accedentes 1,0, 0,5, 0,25 y 0,15 ng para el caso del péptido (VPH 3.1)_n y en concentraciones descendentes para el péptido VPH 6₄. En el ensayo se evidencia el reconocimiento de ambos antígenos inmunizados por parte de los anticuerpos policlonales presentes en lo sueros post III inmunización. Es importante mencionar, que en este ensayo no se presentó interferencia por la matriz de los sueros en las membranas evaluadas con sueros preinmunes, ya que no se evidencia el precipitado color púrpura por oxidación del 4-CN.

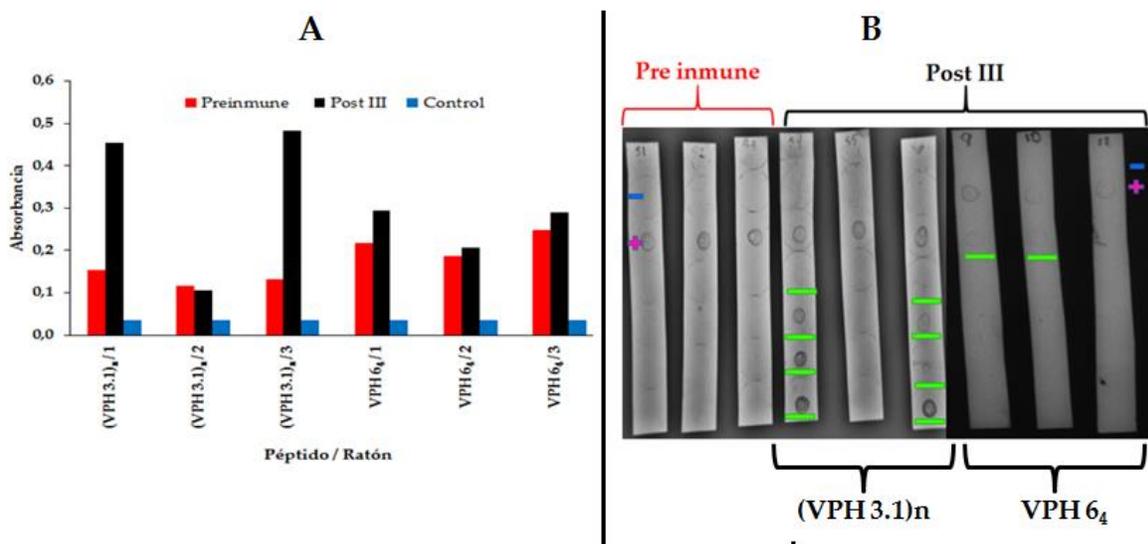


Figura 6-7. Reconocimiento antígeno anticuerpo mediante Ensayo de ELISA (A). Solución de péptido para siembra 10 µg/mL (100 µL), dilución de los sueros pre inmune y post III 1:100, dilución 1:5000 del anticuerpo secundario Anti-Mouse IgG (Sigma A4416), revelador TMB. Ensayo de reconocimiento antígeno anticuerpo por Dot Blot (B).

Los sueros de los ratones BALB/c inmunizados con el péptido (VPH 3.1)_n a los cuales se les confirmó la presencia de anticuerpos policlonales, se utilizaron

posteriormente para la evaluación de la interacción antígeno-anticuerpo sobre la superficie de los electrodos modificados físicamente con el péptido VPH 3.3.

Con el objetivo de reducir el efecto de la matriz de los sueros obtenidos de la inmunización en ratones BALB/c, unido a la necesidad de obtener mayor cantidad de suero para poder realizar las determinaciones posteriores y en aras de facilitar el manejo del modelo animal, se decidió realizar la inmunización de conejos hembra Nueva Zelanda con los péptidos (VPH 3.1)_n y VPH 6₄. Los títulos de anticuerpos policlonales obtenidos para cada péptido se obtuvieron por diluciones seriadas como se observa en la **Figura 6-8**. Para el caso del péptido (VPH 3.1)_n se obtuvo título de 1:25600, mientras que para el péptido VPH 6₄ su valor corresponde a 1:6400. Adicionalmente, se determinó el título del péptido lineal VPH 3.2 el cual fue usado posteriormente para la modificación química de los electrodos de oro, presentado el mismo título (1:26500) que su análogo (VPH 3.1)_n.

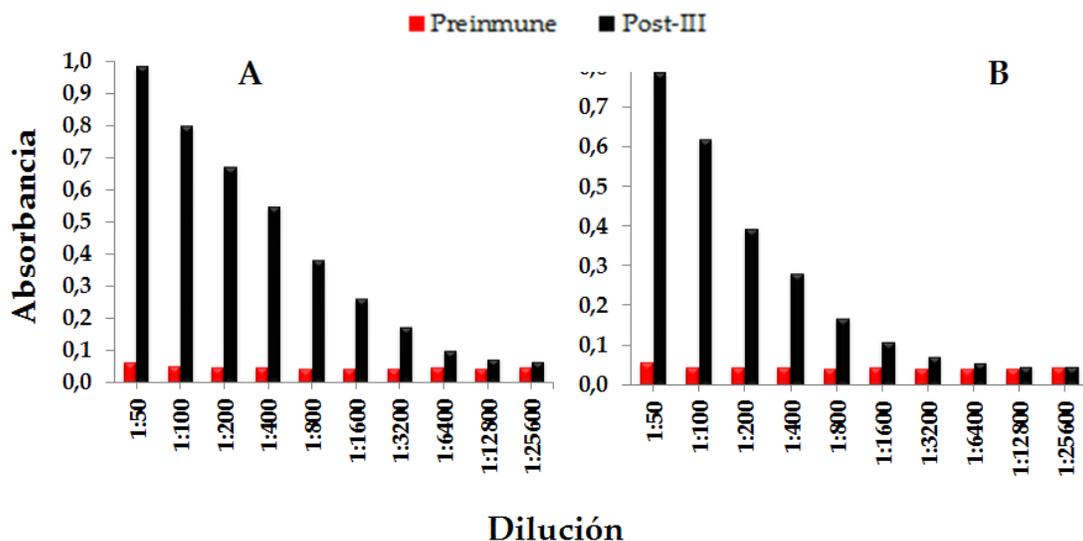


Figura 6-8. Titulación de sueros post III inmunización. VPH 3.1 (A), VPH 6₄ (B).

6.3. Caracterización electroquímica de los electrodos modificados física y químicamente y evaluación de la interacción antígeno-anticuerpo en superficie

6.3.1. Modificación Física

La caracterización del electrodo de oro modificado con el péptido VPH 3.3 se realizó en colaboración con el Dr. Drochss Valencia en el Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo, Brasil.

El comportamiento electroquímico del electrodo funcionalizado fue estudiado en PBS 0,1 M, pH = 7,4. La **Figura 6-9** muestra los voltamperogramas (Ciclos 2, 20 y 50) usando un barrido de potencial de $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, siendo claramente observables dos picos correspondientes al comportamiento redox del grupo ferrocianil, presente en el péptido. Los potenciales de pico anódico (E_{pa}) y pico catódico (E_{pc}) son localizados a 0,35 y 0,24 V, respectivamente. En los primeros ciclos los valores de pico de corriente presentan un incremento entre cada voltamperograma, lo cual puede ser atribuible a la transferencia electrónica entre el péptido y la superficie del electrodo de oro, esto puede ser entendido como un posible mecanismo de transferencia de carga en el polímero de Nafion y la difusión física del péptido en la matriz de este polímero (60).

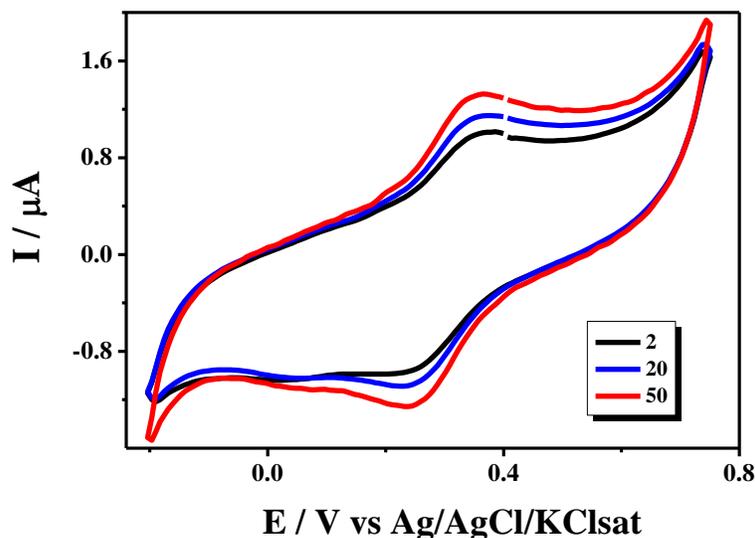


Figura 6-9. Voltamperogramas cíclicos (2, 20 y 50 ciclos) realizados con el electrodo funcionalizado con el péptido VPH 3.3 en PBS 0,1 mol.L⁻¹, pH= 7,4, potencial de barrido de 0,10 V.s⁻¹.

La estabilidad de la modificación obtenida con el péptido VPH 3.3, fue evaluada almacenando el electrodo en un desecador al vacío a 25° centígrados. Diariamente se realizaron mediciones del mismo electrodo por voltamperometría cíclica en las que se evidenció un decrecimiento en las corrientes de pico entre cada lectura, pese a esto, al cabo de 12 días, el electrodo mantenía un 72% de la respuesta inicial, lo cual indica que la modificación es estable al almacenamiento.

Mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) se realizó la comparación entre la superficie del electrodo de oro antes y después de la modificación. La **Figura 6-10** muestra como la estructura de superficie cambia de hebras alineadas (**Figura 6-10A**) a presentar agregados ordenados luego de la modificación (**Figura 6-10B**). Las estructuras esféricas corresponden al péptido VPH 3.3 en la superficie.

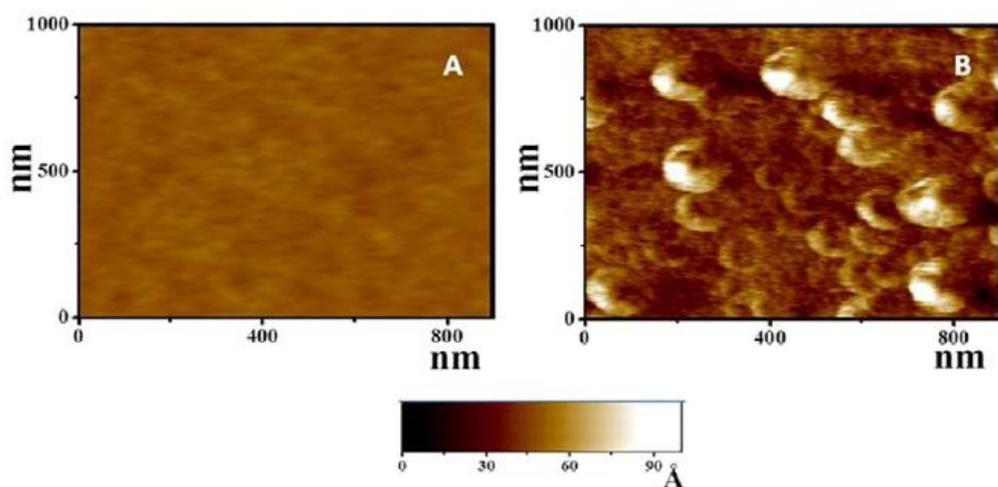


Figura 6-10. Imágenes de SEM para la superficie de oro desnudo (A) y luego de la modificación con el péptido VPH 3.3 (B).

6.3.2. Comportamiento electroquímico de la interacción antígeno-anticuerpo en la superficie del electrodo modificado físicamente

Para evaluar la interacción antígeno – anticuerpo en la superficie del electrodo modificado con el péptido VPH 3.3, el electrodo fue sumergido en una solución de suero preinmune de ratones BALB/c durante 30 minutos, la respuesta electroquímica presentada por electrodo en estas condiciones se utilizaría como control del ensayo. Es importante aclarar en este punto que debido a la alta estabilidad del conjugado antígeno-péptido, se utilizó una modificación nueva en cada ensayo. Con el propósito minimizar los problemas que surgen de las diferentes respuestas que pueda presentar el electrodo modificado frente a la complejidad de las muestras de suero, las medidas se normalizaron utilizando la expresión I/I_p , donde I corresponde a la corriente de pico máxima (a 0,35 V) en las soluciones de suero evaluado, e I_p es la corriente de pico en obtenida en PBS después de 50 ciclos de voltamperometría para el electrodo modificado con el

péptido VPH 3.3. La **Figura 6-11** muestra una gráfica normalizada (I/I_p) en función del potencial aplicado para diferentes diluciones del suero preinmune, la línea roja corresponde al comportamiento electroquímico del electrodo modificado sin interactuar con el suero preinmune. Como se puede observar, la respuesta de la modificación en presencia del suero pre inmune a concentraciones elevadas causa una disminución en el valor de I/I_p hasta la una dilución 1:2000. Es importante mencionar que no se observó una reducción adicional en el valor de I/I_p , al ensayar soluciones más concentradas del suero preinmune.

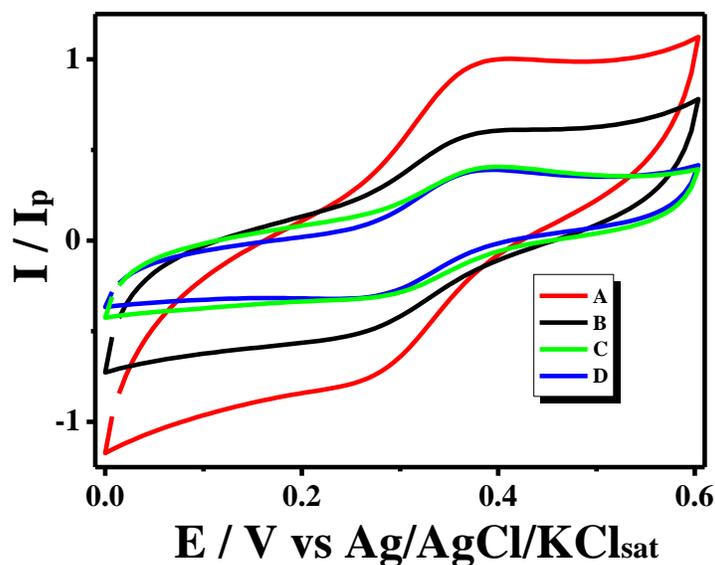


Figura 6-11. Voltamogramas cíclicos obtenidos con el electrodo modificado con el péptido VPH 3.3 en PBS 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,4, antes (A) y después de la adición de suero pre inmune en las diluciones finales siguientes; 1:10000 (B), 1:2000 (C) y 1:1000 (D), velocidad de barrido: 0.10 V.s⁻¹.

Para evaluar el efecto de la concentración del suero en la respuesta electroquímica del electrodo modificado, se graficó la corriente de pico normalizada en función de la concentración de suero preinmune (**Figura 6-12**) a partir de los voltamperogramas cíclicos obtenidos. Los puntos negros en la **Figura 6-12** se refieren a los valores obtenidos con diferentes diluciones del suero preinmune. En

la gráfica se evidencia que hay una influencia significativa y diferenciable de los constituyentes del suero en la respuesta del electrodo modificado con el péptido VPH 3.3. A partir de diluciones por encima de 1:5000 se reduce la inespecificidad en la superficie del electrodo. Así mismo, se observa un valor constante de I/I_p para diluciones inferiores a 1:2000, lo cual indica que el sistema está trabajando en condiciones de saturación y la matriz alcanza su máximo efecto.

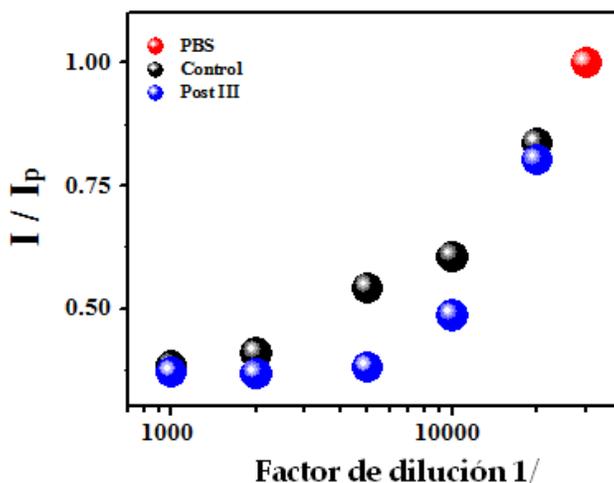


Figura 6-12. Corrientes de pico normalizadas medidas con el electrodo modificado con el péptido VPH 3.3 en PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH = 7,4), en diferentes diluciones de los sueros pre inmunes (control) y post-III inmunización del péptido VPH 3.1.

Con la intención de estudiar la especificidad en la respuesta del electrodo modificado con el péptido VPH 3.3, se evaluó su comportamiento frente a muestras de suero de ratones BALB/c post-III inmunización con (VPH 3.1)n. No se presentaron cambios significativos en la forma de los voltamperogramas en presencia de cada dilución de suero, pero si se evidenció una disminución significativa en el valor de I/I_p (puntos azules en la **Figura 6-12**) en comparación con los valores del control (suero preinmune). La curva no se observa lineal, en concordancia con los resultados comúnmente reportados para inmunoensayo (61).

Una tendencia similar se notó en los ensayos con suero preinmune, en los que la influencia de la matriz es más significativa en un cierto rango de dilución, al igual que lo observado para muestras de suero post-III más concentradas. No obstante, el cambio inequívoco en los valores de I/I_P para diluciones entre 1:5000 y 1:10000 confirman la respuesta específica del electrodo modificado con respecto a otros anticuerpos o proteínas que pueden interferir con la detección superficial.

En un subsiguiente experimento, se usó la amperometría como técnica para evaluar la interacción antígeno – anticuerpo sobre la superficie de los electrodos modificados con el péptido VPH 3.3. Se definió usar una relación de peso a volumen de los sueros a ensayar, partiendo de una solución madre de 10 $\mu\text{g/mL}$, en PBS 0,1 mol.L^{-1} , $\text{pH} = 7,4$. La **figura 6-13A** muestra un ensayo tipo amperométrico realizado en condiciones óptimas, destacando la corriente inicial (I_i) la cual corresponde a la respuesta constante para el proceso de transferencia electrónica del grupo ferrocianil, medida a un potencial de trabajo de 0,55 V. El valor I_i fue reproducible con un error relativo del 9%, cuando la solución solo contenía PBS 0,1 mol.L^{-1} . Luego de la adición a la celda electroquímica de las diferentes cantidades de suero post III inmunización, se presenta un cambio rápido en la corriente hasta alcanzar un estado estable (I_f). La señal decrece conforme al aumento de la cantidad de suero post-III, representando el efecto de inhibición causado por el reconocimiento del antígeno en la superficie. La relación lineal entre la diferencia de la corriente ($I_f - I_i$) y la concentración de la muestra de suero post-III en un rango de 0,010 a 0,020 $\mu\text{g.L}^{-1}$, se muestra en la **Figura 6-13B**.

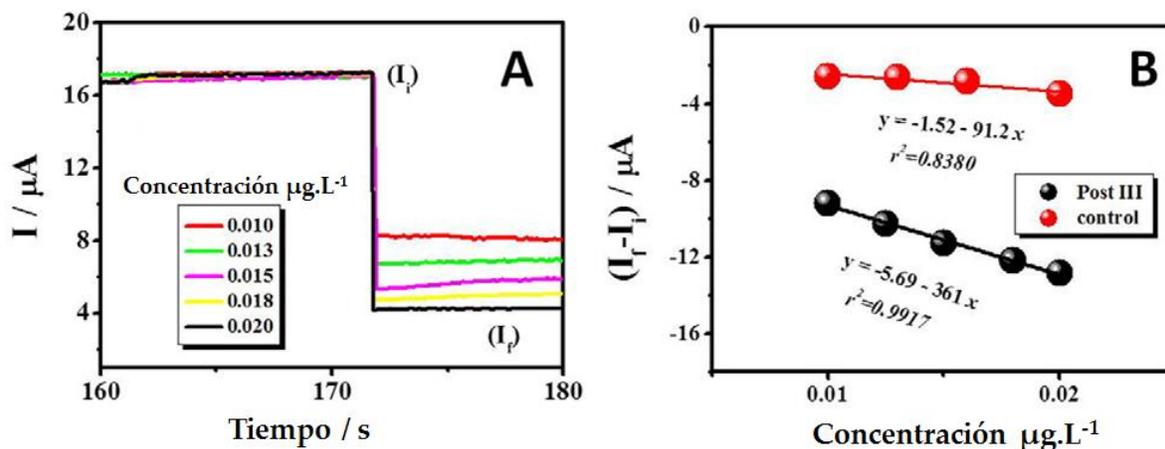


Figura 6-13. A) Respuestas amperométricas típicas para el electrodo en presencia de diferentes concentraciones de suero post-III en presencia de PBS 0,1mol.L⁻¹, pH 7,4, E = 0,55V. B) Curvas de calibración para suero post-III (negro) y pre inmune (rojo).

La selectividad del reconocimiento sobre la superficie del electrodo modificado, se evaluó, haciendo mediciones amperométricas de las diferentes concentraciones de suero preinmune para posteriormente ser comparadas con la respuesta a la interacción con los sueros post-III (61,62). Analizando los valores de las pendientes para las curvas de calibración presentadas en la en la **Figura 6-13B**, se visualiza que la respuesta de inhibición de la corriente generada por el reconocimiento del péptido VPH 3.3 por los anticuerpos presentes en el suero post-III, es casi cuatro veces mayor que las presentada por las muestras control, por lo tanto, la selectividad del electrodo modificado puede considerarse satisfactoria.

6.3.3. Modificación Química

6.3.3.1. Caracterización de las superficies de oro modificadas con péptidos

La formación de mono/sub-capas auto-ensambladas permite obtener estructuras organizadas y con estabilidad química en la superficie de electrodos de oro (63). Según el sustrato utilizado para la funcionalización, la superficie podría ser utilizada como sensor electroquímico para el reconocimiento de eventos a nivel molecular(51,64).

Es así como electrodos de oro policristalino luego de ser pulidos tipo espejo se modificaron por inmersión (24 horas, a temperatura ambiente) en soluciones metanólicas libres de oxígeno, de los péptidos VPH 3.2 y VPH 62.

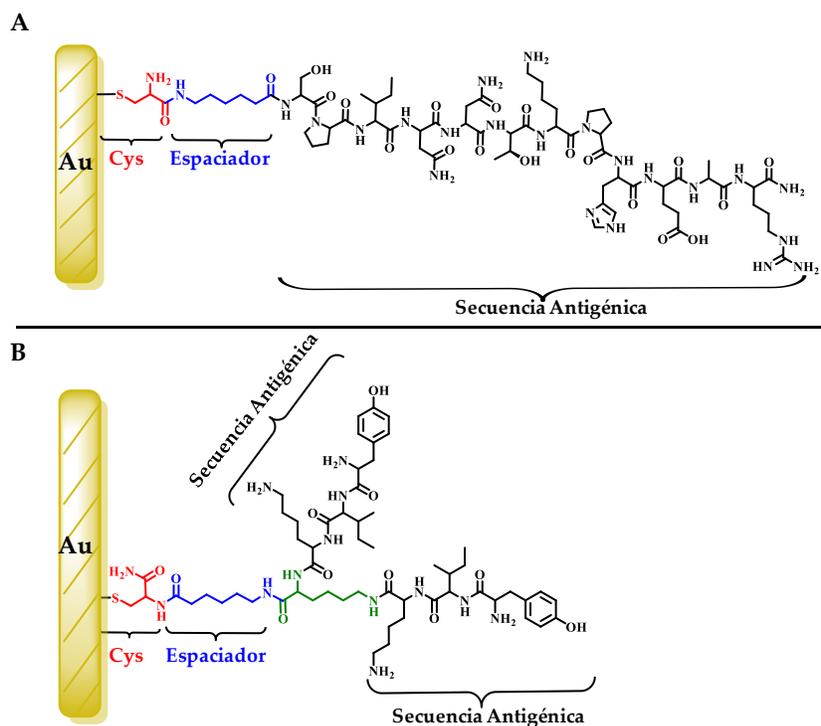


Figura 6-14. Esquema del electrodo de oro policristalino modificado con (A) péptido VPH 3.2, y (B) péptido dimérico VPH 62

Permitido el autoensamblaje, se retiraron las moléculas adsorbidas sobre la superficie de los electrodos y la solución en exceso por enjuague con metanol. Los electrodos funcionalizados se caracterizaron mediante Espectrometría Infrarroja por Transformadas de Fourier (FT-IR) utilizando la técnica de reflectancia externa con ángulos de incidencia de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 ° (**Figura 7-15**).

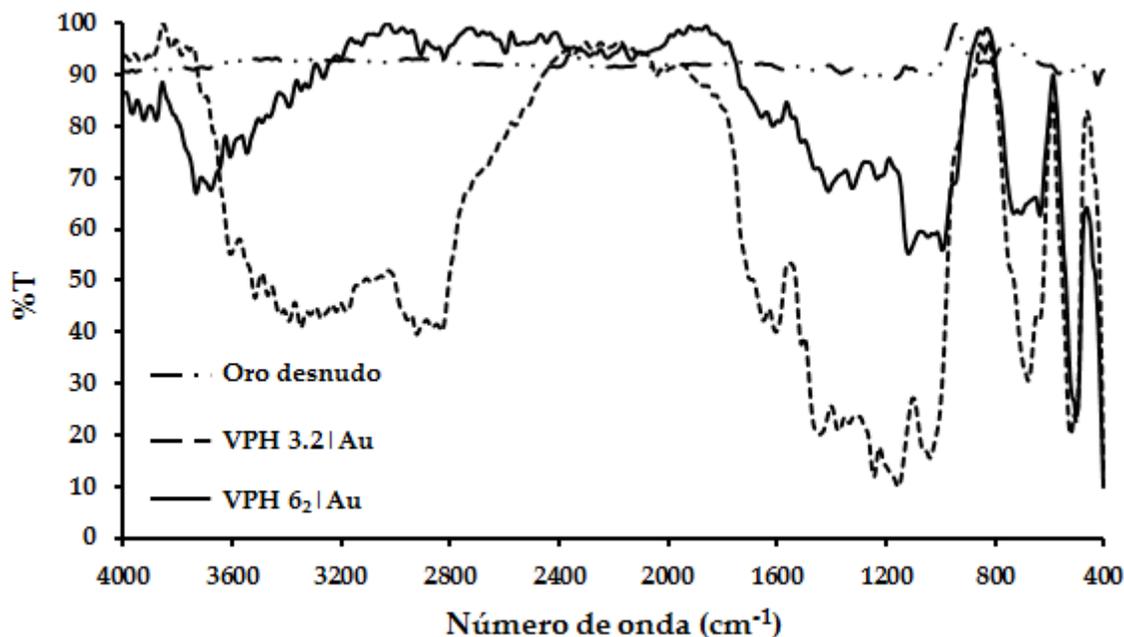


Figura 6-15. Espectros FT-IR para los electrodos VPH 3.2|Au, VPH 6₂|Au y Au desnudo. Angulo de incidencia 60°.

Los espectros de FT-IR a 60° muestran las bandas asociadas al grupo amida y los grupos funcionales de la cadena lateral de aminoácidos, lo cual confirma la presencia de los péptidos auto ensamblados sobre los electrodos de oro (**Figura 6-15**). Las bandas en la región 3500 – 3100cm⁻¹ corresponden al estiramiento N-H en amidas secundarias. La frecuencia de estiramiento para el grupo C=O presente en las amidas I aparece en el rango de 1630-1510cm⁻¹(65). Es importante señalar que las bandas de amida I y amida II han sido las más utilizadas en la confirmación de la unión de péptidos a electrodos (66). Para el péptido VPH 6₂, estas bandas

aparecen en el ángulo del rayo incidente de 90° . Las bandas en el rango de $1560\text{--}1510\text{cm}^{-1}$ se asignan a la flexión N-H y el estiramiento simétrico N-C=O en la amida II, para las superficies analizadas, estas bandas aparecen en el ángulo incidencia de 10° .

Para el péptido VPH 3.2, los espectros en los ángulos incidentes más bajos (10 y 20°) no muestran bandas en la región $4000\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$, y en los ángulos incidentes grandes (80 y 90°), el ruido es mayor. Esto podría atribuirse a la inclinación que toman las moléculas peptídicas cuando se han organizado sobre la superficie de oro. Bajo estos resultados la determinación de las bandas principales del péptido y sus cadenas laterales se centra en ángulos incidentes intermedios. A su vez sugiere, que el péptido VPH 6₂ cubre una mayor área de la superficie del electrodo de oro en comparación con el péptido VPH 3.2.

Las vibraciones de flexión de los estiramientos de N-H y C-N en la amida III aparecen a 1244 y 1232 cm^{-1} , respectivamente (66,67). Las frecuencias de estiramiento asimétricas para los grupos $\text{-CH}_2\text{-}$ que están presentes en la cadena lateral del residuo 6-aminohexanoico y en la estructura central del péptido aparecen en la región de $2922\text{--}2833\text{cm}^{-1}$. En el péptido VPH 3.2, la banda de estiramiento C-N de las aminas alifáticas primarias, secundarias y terciarias se observa a 1037cm^{-1} . Para el péptido VPH 6₂, el estiramiento $(\text{COO-})_{\text{sy}}$ y $\nu(\text{C-C})$ presentes en el grupo carboxilato y en la cadena alifática, se asignan en las bandas 1411 y 992 cm^{-1} respectivamente.

Finalmente, la presencia de la banda de estiramiento C-S se confirma en la región de $630\text{--}730\text{cm}^{-1}$, junto con la usencia de una señal de frecuencia de estiramiento S-H a $2550\text{--}2600\text{cm}^{-1}$, indican que las moléculas peptídicas se auto ensamblaron en

la superficie de oro a través de la formación de enlaces oro - azufre. La asignación de señales para cada péptido se resume en la **Tabla 6-3**.

Tabla 6-3. Asignación de las señales de los espectros FT-IR para los electrodos de oro modificados VPH 3.2|Au y VPH 6₂|Au.

Asignación	Péptido Auto ensamblado	
	VPH 3.2 (cm ⁻¹)	VPH 6 ₂ (cm ⁻¹)
Amida A-B $\nu(\text{N-H})$	3392-3347	3392-3265
Amida I $\nu(\text{C=O})$	1648	1646
Amida II $\delta(\text{N-H}), \nu(\text{N-C=O})$ simétrico	1540	1539
Amida III $\nu(\text{C-N}), \delta(\text{N-H})$	1244	1232
$\delta(\text{NH}_3^+)$ asimétrico	2043	2222-2134
$\nu(\text{C-H})$, cadena alquílica (C-H, -CH ₂ -)	2922-2832	2822
Tirosina $\nu(\text{O-H})$	-----	3732-3680
Tirosina $\tau(\text{O-H})$	-----	635
Vibraciones del anillo simétrico de la		
Tirosina	-----	1614
Treonina $\nu(\text{O-H})$	3606	-----
Histidina $\nu(\text{N-H})$ heterociclo	3272	-----
Asparagina $\nu(\text{C=O})$	1604	-----
Ácido Glutámico $\nu(\text{COO}^-)$ SIM	1442	-----
Isoleucina $\delta(\text{CH}_3)$ SIM	1373	-----
Isoleucina ω ó $\tau(\text{CH}_3)$	-----	1323
Serina $\delta(\text{O-H})$	1244	-----
Lisina $\rho(\text{NH}_3^+)$	1155	1116
Lisina $\tau(\text{NH}_3^+)$	521	500

6.3.3.2. Estudio electroquímico de los electrodos modificados

Los electrodos policristalinos de oro fueron caracterizados electroquímicamente por voltamperometría cíclica antes de su modificación. El área activa del electrodo desnudo se estimó utilizando la ecuación de Randles-Sevcik (50):

$$i_p = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} D A^{1/2} C v^{1/2}$$

Donde I_p es la corriente máxima, n corresponde al número de electrones involucrados en la reacción, C es la concentración de la molécula sonda redox en el seno de la solución, D es el coeficiente de difusión de la sonda en el medio ($5,5 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), $v^{1/2}$ es la raíz cuadrada de la velocidad de barridos y A es el área electroactiva (A_{act}). A partir de los voltameperogramas obtenidos en un rango de velocidades de barrido entre 10 y 100 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, se consideró graficar el logaritmo natural de la corriente de pico catódico respecto al logaritmo natural de la velocidad, con el fin de tener una ecuación lineal:

$$\ln I_{pc} = \frac{1}{2} \ln v + \ln [2,69 \times 10^5 n^{3/2} D^{1/2} AC]$$

A partir de esta se obtuvo el antilogaritmo de la ordena al origen logrando determinar el área activa (A_{act}), que para este caso fue de $0,0240 \text{cm}^2$.

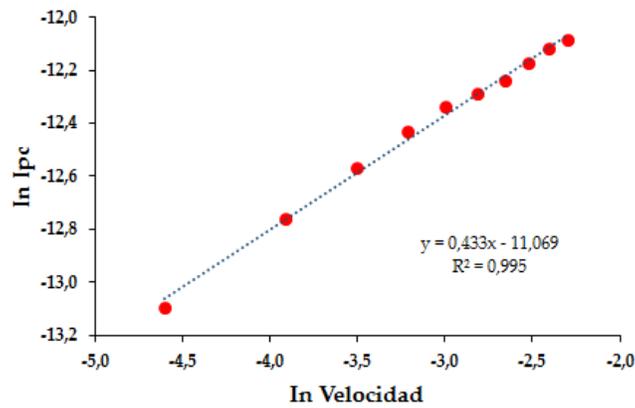


Figura 6-16. Determinación del área activa del electrodo desnudo. $\ln I_{pc}$ respecto $\ln v$ del $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 1 Mm en solución de KCl 0,5 M.

Para la determinación del área real (A_{real}) se utilizó la siguiente ecuación:

$$A_{\text{real}} = Q_{\text{AuO}}(\mu\text{C})/200(\mu\text{C}/\text{cm}^2)$$

En la que la carga asociada a la formación de una monocapa de AuO cuando el electrodo es oxidado a potenciales $>0,9\text{V}$ en ácido sulfúrico corresponde a $200 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ (43). Integrando el área bajo la curva (**Figura 6-17**) para la formación del primer óxido de oro es posible determinar la carga asociada a este proceso, por consiguiente, el área de real (A_{real}) del electrodo desnudo correspondió a $0,0257\text{cm}^2$. La relación entre A_{real} y A_{act} , corresponde al factor de rugosidad de la superficie oro, que para este caso se obtuvo un valor de 1,07, indicando que el electrodo de Au es idealmente liso(68).

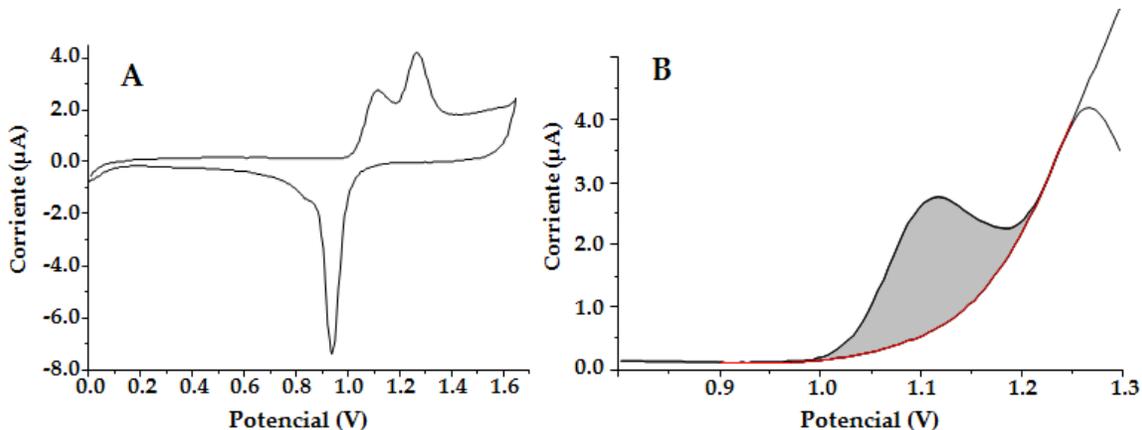


Figura 6-17. Voltamperograma cíclico del electrodo de oro desnudo en H_2SO_4 0,50 M (A). La limpieza electroquímica se realizó aplicando 20 ciclos entre 0 y +1,65 V en relación con el electrodo de Ag/AgCl. Para integrar el área bajo la curva, se utilizó la ampliación mostrada en (B).

La voltamperometría cíclica de los electrodos modificados muestra densidades de corriente catódica y anódica reducidas en comparación con electrodo desnudo (**Figura 6-18**, curvas b y c), lo cual es atribuible a la presencia de los péptidos VPH 3.2 y VPH 6₂ anclados a la superficie del electrodo de trabajo. La molécula sonda utilizada presentó un comportamiento irreversible al evaluar el efecto de la funcionalización del electrodo de trabajo con el péptido VPH 6₂ ($\Delta E = |E_{pa} - E_{pc}| = 130 \text{ mV}$ y $|I_{pa}/I_{pc}| = 1.8$), mientras que el electrodo modificado con el péptido VPH 3.2 exhibió un ΔE de 69 mV y $|I_{pa}/I_{pc}| = 1.6$, similar al comportamiento presentado por un proceso reversible. Los valores de E_{pc} y E_{pa} son independientes de la velocidad de barrido para la modificación con el péptido VPH 3.2 (**Figura 6-18B**); por lo tanto, el sistema puede considerarse como reversible [28]. Los parámetros termodinámicos obtenidos de los voltamperogramas (**Figura 6-18**) se muestran en la **Tabla 6-4**.

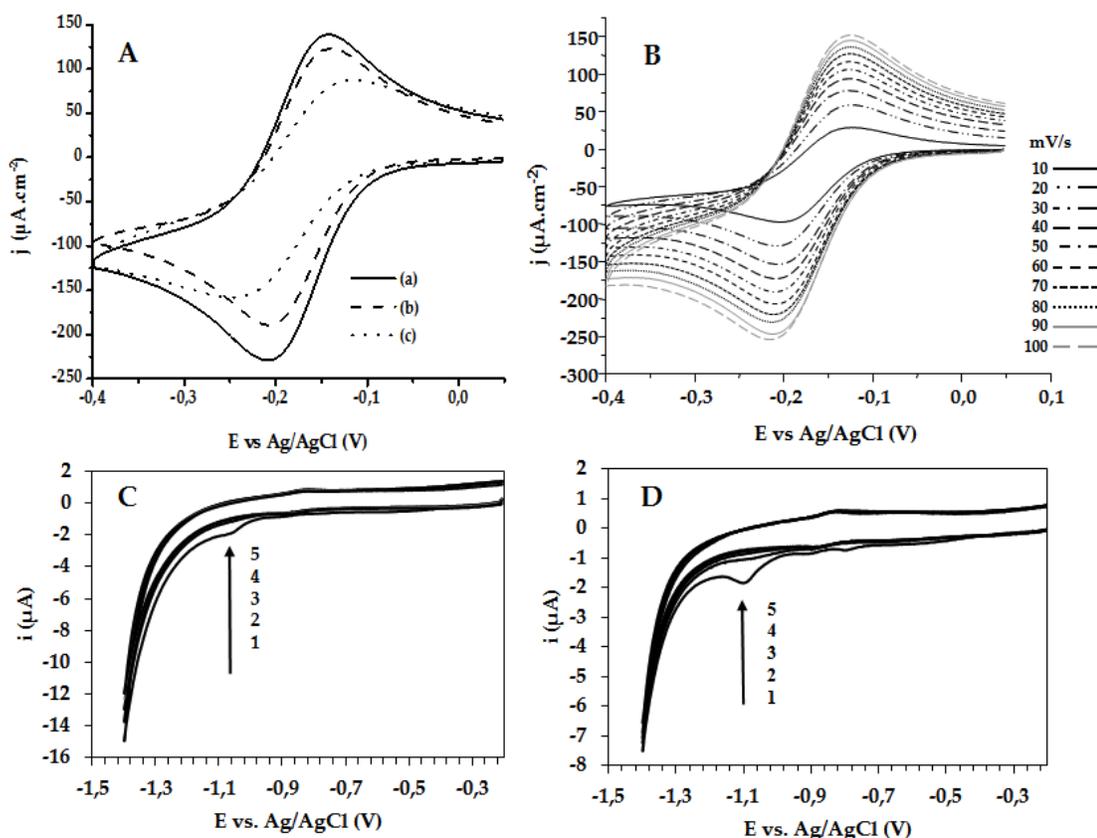


Figura 6-18. Voltamperogramas cíclicos para electrodos policristalinos de oro, velocidad de barrido de 80 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (Panel A): Au desnudo (curva a), VPH 3.2|Au (curva b) y VPH 62|Au (curva c). Voltamperogramas cíclicos el electrodo HPV 3.2|Au a diferentes velocidades de barrido (Panel B). Toda las mediciones fueron realizadas en $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 1 mM en KCl 0,50 M a temperatura ambiente. Desorción electroquímica de los péptidos VPH 3.2 (Panel C) y VPH 62 (Panel D) usando 1, 2, 3, 4, 5, y 6 ciclos de voltamperometría cíclica en KOH (0.5 M) con velocidad de barrido de $20\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Las moléculas tioladas adsorbidas químicamente en las superficies de oro se desorben reductivamente en un medio básico. El potencial de desorción depende tanto de la resistencia del enlace azufre-oro como de las interacciones moleculares entre las especies adsorbidas. El proceso de desorción se puede describir mediante la siguiente ecuación: $\text{AuRS} + e^- \rightleftharpoons \text{Au} + \text{RS}^-$ (reacción redox) (30,51,65). La desorción electroquímica reductiva de los péptidos auto ensamblados VPH 3.2 y

VPH 6₂ se logró mediante voltamperometría cíclica en KOH 0,5 M, en un rango de potencial desde el potencial corriente potencial nula ($E_i = 0$) hasta -1,4 V frente al electrodo Ag/AgCl. En el primer ciclo para ambas modificaciones, se observó una señal de desorción reductiva. Para el péptido VPH 3.2, el potencial de reducción fue de -1,06 V frente a Ag/AgCl, y para el péptido VPH 6₂ fue de -1,10 V vs. Ag/AgCl. Estas señales de reducción del recubrimiento desaparecen en el segundo ciclo, lo que indica que los péptidos se adsorbieron en la superficie de oro a través de un enlace covalente Au-S (**Figura 6-18C-D**). En el caso de la desorción del péptido VPH 6₂, se pueden ver dos señales electroquímicas adicionales, a -0,9 y -0,8 V vs. Ag/AgCl, lo cual indica tres configuraciones moleculares diferentes sobre el electrodo de oro. Esto se puede atribuir a la interacción de los grupos amino libres de la secuencia peptídica con la superficie de oro, como se muestra en la **Figura 6-18D**.

El factor de recubrimiento asociado con cada péptido se calculó usando la siguiente ecuación: $\Gamma = Q/nFA$, donde Q es la carga para la desorción reductiva (0,29 y 1,2 μC para los péptidos VPH 3.2 y VPH 6₂, respectivamente), n es el número de electrones transferidos por mol, F es la constante de Faraday (96,485 C.mol⁻¹) y A es el área del electrodo [29]. Como se muestra en la **Tabla 6-4**, el factor de recubrimiento del péptido VPH 3.2 ($9,6 \times 10^{-11}$ mol.cm⁻²) fue menor que el determinado para el péptido VPH 6₂ (40×10^{-11} mol.cm⁻²). Esto podría ser causado por un impedimento estérico, ya que el VPH 3.2 es más voluminoso estructuralmente en comparación con el péptido VPH 6₂, obstruyendo la adsorción y la organización de más moléculas peptídicas sobre la superficie del electrodo de trabajo (**Figura 6-14**). En contraste, los valores de densidad de corriente son menores para el electrodo VPH 6₂|Au que para el electrodo de VPH 3.2|Au, lo

cual indica que se cuenta con menor área disponible para el proceso de transferencia electrónica en la superficie del electrodo de oro modificado con el péptido VPH 62, causada por un recubrimiento mayor de la superficie (**Tabla 6-4**).

Tabla 6-4. Parámetros termodinámicos del proceso redox $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ usado para las mediciones de corriente en los electrodos de Au denudo, VPH 3.2|Au y VPH 62|Au.

Electrodo	Γ (mol.cm ⁻²)	I_{pc} (μA)	I_{pa} (μA)	I_{pc}/I_{pa}	E_{pc} (mV)	E_{pa} (mV)	ΔE (mV)
Au denudo	0	-5.145	4.212	1.2	-205	-141	64
VPH 3.2 Au	9.6×10^{-11}	-4.567	2.975	1.6	-208	-139	69
VPH 62 Au	40×10^{-11}	-3.803	2.108	1.8	-247	-117	130

Con el ánimo de evaluar el efecto del pH de la solución del electrolito soporte en las mediciones electroquímicas, se probaron dos moléculas sonda: (i) $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (complejo cargado positivamente) y (ii) ferroceno (neutro), frente a los electrodos de trabajo modificados con los péptidos VPH 3.2 y VPH 62. En el rango de pH entre 2 y 5, se observó una reducción en la densidad de corriente para el proceso redox de la molécula sonda $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, en los electrodos de trabajo modificados, esto es generado por la presencia de grupos funcionales ionizables según el pH de trabajo en ambas secuencias peptídicas (**Figura 6-19A**). En condiciones de pH bajo se genera una carga neta positiva, causada por la protonación de las cadenas laterales de los aminoácidos Lys, Arg e His y el grupo amino N-terminal de ambos péptidos. Esta carga positiva tiende a repeler el complejo $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ provocando la

reducción en la densidad de corriente. Al evaluar el comportamiento de la molécula sonda neutra (ferroceno), se observa una densidad de corriente baja y constante en el rango de pH estudiado tanto para el electrodo de Au desnudo como para los electrodos funcionalizados, no recomendable para su aplicación en monitoreos de esta naturaleza (**Figura 6-19B**).

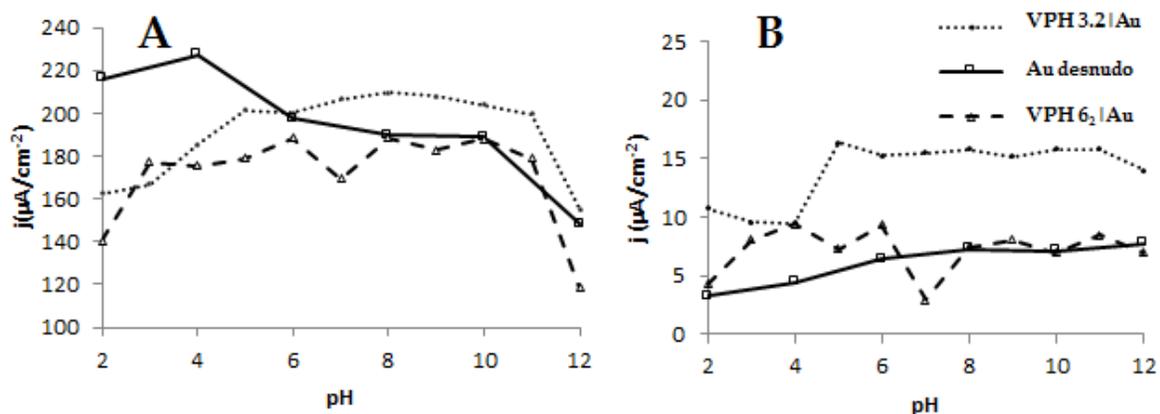


Figura 6-19. Efecto del pH sobre la densidad de corriente. Electrodo de trabajo: VPH 3.2|Au (círculos negros), VPH 6₂|Au (triángulos negros) y Au desnudo (cuadrado negro). Molécula sonda evaluada Ru(NH₃)₆³⁺ (Panel A) y ferroceno (Panel B).

6.3.4. Estudio de la interacción - antígeno anticuerpo en la superficie de electrodos modificados químicamente

Para la evaluación de la interacción antígeno-anticuerpo se escogió la técnica de voltametría de onda cuadrada (SWV) por sus ventajas con respecto a la voltamperometría cíclica, especialmente por la capacidad de suprimir el ruido de fondo, trabajando a concentraciones de analito considerablemente menores(50). En la **Figura 6-20** se observa una reducción significativa y diferenciable en la densidad de corriente cuando el electrodo VPH 3.2|Au fue evaluado frente a una dilución 1:5000 de suero post-III inmunización ((VPH 3.1)n) obtenida de conejos Nueva

Zelanda, en comparación al comportamiento mostrado al someter la modificación a una dilución de la misma concentración del suero preinmune.

Adicionalmente, el electrodo VPH 62|Au se retó frente a sueros post-III inmunización (VPH 64) y preinmune, sin evidenciar una respuesta específica en diluciones 1:5000 (ver Anexo E). Estos resultados sugieren la posibilidad de monitorear la interacción antígeno-anticuerpo en la superficie de electrodos de oro modificadas con el péptido VPH 3.2, siendo esta funcionalización promisoría para el desarrollo de un biosensor para la detección de la infección por VPH en muestra sanguíneas.

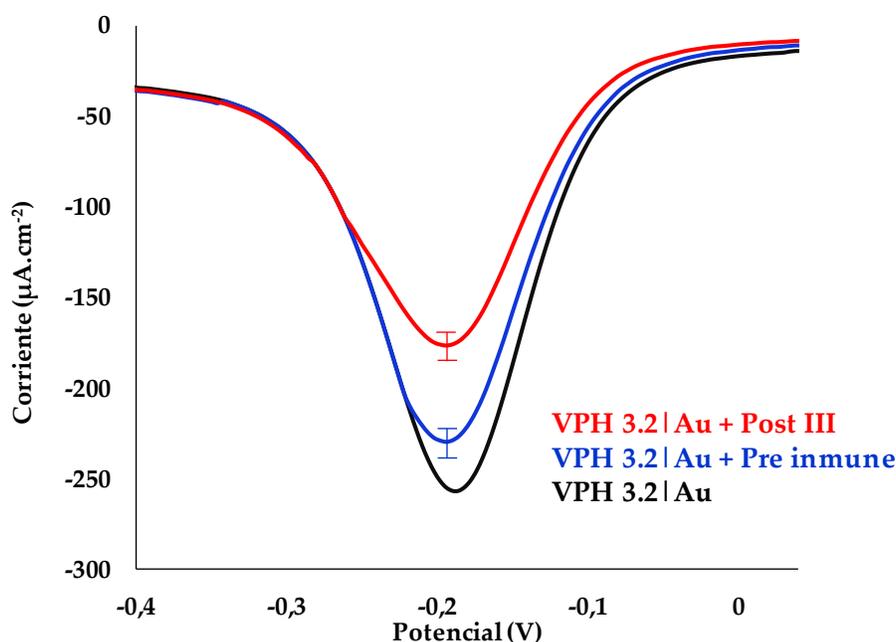


Figura 6-20. Detección de anticuerpos policlonales anti-VPH 3 (dilución se los sueros PI y PIII 1:5000 en PBS 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,4) usando el electrodo VPH 3.2|Au por SWV, bajo las siguientes condiciones; amplitud del pulso 25 mV, escalones de potencial 4 mV, rango de escaneo de 50 hasta -400 mV y frecuencia de 15 Hz. La densidad de corriente para el electrodo de Au desnudo fue de -575 µA.cm⁻² (a ~ 0,2V). Todas las mediciones se realizaron usando una solución de Ru(NH₃)₆Cl₃ 1 mM en KCl 0,50 M, a temperatura ambiente.

7. CONCLUSIONES

Se obtuvieron péptidos sintéticos análogos de la proteína L1 del VPH, con la capacidad de inducir anticuerpos policlonales en modelo animal de ratones BALB/c y conejos Nueva Zelanda.

Se logró la funcionalización de la superficie de electrodos de oro, mediante la modificación física del electrodo usando el polímero Nafion® y el péptido (Fc)-Ahx-SPINNTKPHEAR, logrando diferenciar la formación en superficie del complejo antígeno-anticuerpo usando mediciones amperométricas.

Se funcionalizaron químicamente superficies de electrodos oro con el péptido C-Ahx-SPINNTKPHEAR y con el dímero (YIK)₂-Ahx-C, siendo caracterizadas por voltamperometría cíclica. Estas superficies funcionalizadas permitieron monitorear la interacción antígeno - anticuerpo para el péptido C-Ahx-SPINNTKPHEAR, mediante voltametría de onda cuadrada.

Se evidenció que péptidos derivados de la secuencia SPINNTKPHEAR que contienen ferroceno y cisteína son inestables, siendo inviables para la funcionalización química de superficies de electrodos de oro.

8. PRODUCTOS ACADÉMICOS

Participación en congresos

- **33rd European Peptide Symposium.** “Chemisorption of synthetic peptides derived from human papilloma virus over gold electrode “. 2014. Sofia, Bulgaria. Presentación modalidad poster.
- **65rd Annual Meeting of the International Society de Electrochemistry.** “Fabrication de a sensor based on dispersion de a peptide derived de HPV L1 protein supported on gold electrodes with Nafion/DMF”. 2014. Lausana, Suiza. Presentación modalidad poster.
- **30th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop (HPV 2015).** “Gold electrodes modified with peptides derivated from HPV-L1 protein: First approximation for the development of a HPV-biosensor”. 2015. Lisboa, Portugal. Presentación modalidad oral.

Publicaciones

- D.P. Valencia, L.M.F. Dantas, A. Lara, J. García, Z. Rivera, J. Rosas, M. Bertotti. “Development of a bio-electrochemical immunosensor based on the immobilization of SPINNTKPHEAR peptide derived from HPV-L1 protein on a gold electrode Surface”. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 770 (2016) 50–55.
- J. A Lara - Carrillo, R. Fierro - Medina, J. Manríquez - Rocha, E. Bustos - Bustos, D. S. Insuasty - Cepeda, J. E. García – Castañeda, Z. J. Rivera – Monroy. “Design, Synthesis, and Use of Peptides Derived from Human Papillomavirus L1 Protein for the Modification of Gold Electrode Surfaces by Self-Assembled Monolayers”. *Molecules* 2017, 22, 1970.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bañuls MJ, Puchades R, Maquieira Á. Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (IO) biosensors: A review. *Anal Chim Acta*. 2013;777:1–16.
2. Rosu MC, Watanabe F, Pogacean F, Biris AS, Socaci C, Biris AR, et al. The influence of uric and ascorbic acid on the electrochemical detection of dopamine using graphene-modified electrodes. *Electrochim Acta* [Internet]. 2014;154:197–204. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2014.12.046>
3. Deng F, Shen Z, Li Z, Li B, Luo Q, Liu D. Ultrasensitive electrochemical biosensor based on the oligonucleotide self-assembled monolayer-mediated immunosensing interface. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2017;971:26–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.046>
4. Halliwell J, Savage AC, Buckley N, Gwenin C. Sensing and Bio-Sensing Research Electrochemical impedance spectroscopy biosensor for detection of active botulinum neurotoxin. *Sens BIO-SENSING Res* [Internet]. 2014;2:12–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbsr.2014.08.002>

5. Wang J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors : A Review. 2005;(ii):7–14.
6. Hu J, Yu Y, Brooks JC, Godwin LA, Somasundaram S, Torabinejad F, et al. A Reusable Electrochemical Proximity Assay for Highly Selective, Real-Time Protein Quantitation in Biological Matrices. 2014;
7. Hu J, Wang T, Kim J, Shannon C, Easley CJ. Quantitation of femtomolar protein levels via direct readout with the electrochemical proximity assay. *J Am Chem Soc.* 2012;134(16):7066–72.
8. Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JPJ. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: An overview. Vol. 7, *Virology Journal.* 2010. p. 1–8.
9. Rocha-Zavaleta L, Ambrosio JP, de Lourdes Mora-Garcia M, Cruz-Talonia F, Hernandez-Montes J, Weiss-Steider B, et al. Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate high-risk from low-risk HPV-associated low-grade squamous intraepithelial lesions. *J Gen Virol.* 2004;85(9):2643–50.
10. Molijn A, Kleter B, Quint W, Van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. Vol. 32, *Journal of Clinical Virology.* 2005. p. 43–51.
11. T. L, Z. T. Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. *Virol J* [Internet]. 2010;7:1–7. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L358317692%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-7->

2%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=1743422X&id=doi:
10.1186%2F1743-422X-7-2&atitle=Cellular+receptor+binding+and

12. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account [Internet]. Vol. 384, *Virology*. Elsevier Inc.; 2009. p. 260–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046>
13. Hausen H zur. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. Vol. 1288, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2002. 55-78 p.
14. Roth SD, Sapp M, Streeck RE, Selinka HC. Characterization of neutralizing epitopes within the major capsid protein of human papillomavirus type 33. *Virology*. 2006;3:1–12.
15. Olcese VA, Chen Y, Schlegel R, Yuan H. Characterization of HPV16 L1 loop domains in the formation of a type-specific, conformational epitope. *BMC Microbiol*. 2004;4:1–12.
16. Schellenbacher C, Roden R, Kirnbauer R. Chimeric L1-L2 Virus-Like Particles as Potential Broad-Spectrum Human Papillomavirus Vaccines. *J Virol*. 2009;83(19):10085–95.
17. Tang N, Huang S, Erickson B, Mak WB, Salituro J, Robinson J, et al. High-risk HPV detection and concurrent HPV 16 and 18 typing with Abbott RealTime High Risk HPV test. *J Clin Virol* [Internet]. 2009;45(SUPPL. 1):S25–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532\(09\)70005-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532(09)70005-8)
18. Papillomavirus H, Biology M. HHS Public Access. 2018;(617):3–12.

19. Waxman AG, Zsemlye MM. Preventing Cervical Cancer: The Pap Test and the HPV Vaccine. Vol. 92, Medical Clinics of North America. 2008. p. 1059–82.
20. Manu Gnanamony, Abraham Peedicayil , John Subhashini, Thomas Samuel Ram , Anuradha Rajasekar, Patti Gravitt PA. Detection and quantitation of HPV 16 and 18 in plasma of Indian women with cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2010;116:447–51.
21. Sabzi RE, Sehatnia B, Pournaghi-Azar MH, Hejazi MS. Electrochemical detection of human papilloma virus (HPV) target DNA using MB on pencil graphite electrode. *J Iran Chem Soc.* 2008;5(3):476–83.
22. Civit L, Fragoso A, O'Sullivan CK. Electrochemical biosensor for the multiplexed detection of human papillomavirus genes. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2010;26(4):1684–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.072>
23. Piro B, Kapella A, Le VH, Anquetin G, Zhang QD, Reisberg S, et al. Towards the detection of human papillomavirus infection by a reagentless electrochemical peptide biosensor. In: *Electrochimica Acta.* 2011. p. 10688–93.
24. Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* [Internet]. 2013;445(1–2):169–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.038>
25. Cason J, Patel D, Naylor J, Lunney D, Shepherd PS, Best JM, et al. Identification of immunogenic regions of the major coat protein of human papillomavirus type 16 that contain type-restricted epitopes. *J Gen Virol.*

1989;70(11):2973–87.

26. Clark LC, Lyons C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann N Y Acad Sci.* 1962;102(1):29–45.
27. Caygill RL, Blair GE, Millner PA. A review on viral biosensors to detect human pathogens. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2010;681(1–2):8–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.09.038>
28. Albers J, Grunwald T, Nebling E, Piechotta G, Hintsche R. Electrical biochip technology - A tool for microarrays and continuous monitoring. *Anal Bioanal Chem.* 2003;377(3):521–7.
29. Wink T, van Zuilen SJ, Bult A, van Bennekom WP. Tutorial Review Self-assembled Monolayers for Biosensors. *Analyst.* 1997;122(April):43–50.
30. Yang W, Gooding JJ, Hibbert DB. Characterisation of gold electrodes modified with self-assembled monolayers of L-cysteine for the adsorptive stripping analysis of copper. *J Electroanal Chem.* 2001;516(1–2):10–6.
31. who. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer [Internet]. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. 2019. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)
32. Stanley M, Pinto LA, Trimble C. Human papillomavirus vaccines - immune responses [Internet]. Vol. 30, *Vaccine.* Elsevier Ltd; 2012. p. F83–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.106>
33. Nicol AF, Nuovo GJ, Dillner J. A summary of the 25th International

Papillomavirus Conference 2009: Vaccines, screening, epidemiology and therapeutics. *J Clin Virol.* 2010;47(3):208–15.

34. Cox JT, Castle PE, Behrens CM, Sharma A, Wright TC, Cuzick J. Comparison of cervical cancer screening strategies incorporating different combinations of cytology, HPV testing, and genotyping for HPV 16/18: Results from the ATHENA HPV study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2013;208(3):184.e1-184.e11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2012.11.020>
35. Lloyd-Williams P, Albericio F, Giralt E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. CRC Press; 1997.
36. León-Calvijo MA, Leal-Castro AL, Almanzar-Reina GA, Rosas-Pérez JE, García-Castañeda JE, Rivera-Monroy ZJ. Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1–8.
37. García Castañeda JE, Vergel Galeano CF, Rivera Monroy ZJ, Rosas Pérez JE. Efficient Synthesis of Peptides with 4-Methylpiperidine as Fmoc Removal Reagent by Solid Phase Synthesis. *J Mex Chem Soc.* 2018;58(4):386–92.
38. Kaiser E, Bossinger CD, Colescott RL, Olsen DB. Color test for terminal prolyl residues in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Chim Acta.* 1980 Apr;118(1):149–51.
39. Riener CK, Kada G, Gruber HJ. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem.* 2002;373(4–5):266–76.
40. Sadler K, Tam JP. Peptide dendrimers: Applications and synthesis. *Rev Mol*

Biotechnol. 2002;90(3–4):195–229.

41. Vargas Casanova Y, Rodríguez Guerra JA, Umaña Pérez YA, Leal Castro AL, Almanzar Reina G, García Castañeda JE, et al. Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Molecules*. 2017;22(10):1–11.
42. Hoogvliet J, Dijkstra M, Kamp B, van Bennekom WP. Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self-assembly: a study in phosphate buffer pH 7.4. *Anal Chem*. 2000;72(9):2016–21.
43. Angerstein-Kozłowska H, Conway BE, Hamelin A, Stoicoviciu L. Elementary steps of electrochemical oxidation of single-crystal planes of Au-I. Chemical basis of processes involving geometry of anions and the electrode surfaces. *Electrochim Acta*. 1986;31(8):1051–61.
44. Piela B, Wrona PK. Capacitance of the gold electrode in 0.5 M H₂SO₄ solution: a.c. impedance studies. *J Electroanal Chem* [Internet]. 1995 May;388(1–2):69–79. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002207289403848W>
45. Bain CD, Troughton EB, Tao YT, Evall J, Whitesides GM, Nuzzo RG. Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold. *J Am Chem Soc*. 1989;111(1):321–35.
46. Chailapakul O, Crooks RM. Synthesis and Characterization of Simple Self-Assembling, Nanoporous Monolayer Assemblies: A New Strategy for

Molecular Recognition. Langmuir. 1993;9(4):884–8.

47. Juodkazis K, Juodkazyt J, Šebeka B, Lukinskas A. Cyclic voltammetric studies on the reduction of a gold oxide surface layer. *Electrochem commun.* 1999;1(8):315–8.
48. Bustos E, Manriquez J, Juaristi E, Chapman TW, Godinez LA. Electrochemical study of beta-cyclodextrin binding with ferrocene tethered onto a gold surface via PAMAM dendrimers. *J Braz Chem Soc.* 2008;19(5):1010–6.
49. Hong J, Moosavi-Movahedi AA, Ghourchian H, Rad AM, Rezaei-Zarchi S. Direct electron transfer of horseradish peroxidase on Nafion-cysteine modified gold electrode. *Electrochim Acta.* 2007;52(21):6261–7.
50. Allen J. Bard, R.Faulkner L. *Electrochemical methods, fundamentals and applications.* John Wiley & Sons. 2001.
51. Ulman A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly.* Academic Press. Rochester NY, editor. 1991.
52. Santamaria H, Manoutcharian K, Rocha L, Gonzalez E, Acero G, Govezensky T, et al. Identification of peptide sequences specific for serum antibodies from human papillomavirus-infected patients using phage display libraries. *Clin Immunol.* 2001;101(3):296–302.
53. Reddy KJ, Banapour B, Anderson DE, Lee SH, Marquez JP, Carlos MP, et al. Induction of immune responses against human papillomaviruses by hypervariable epitope constructs. *Immunology.* 2004;112(2):321–7.

54. Vallee A, Humblot V, Pradier CM. Peptide interactions with metal and oxide surfaces. *Acc Chem Res.* 2010;43(10):1297–306.
55. Venanzi M, Pace G, Palleschi A, Stella L, Castrucci P, Scarselli M, et al. Densely-packed self-assembled monolayers on gold surfaces from a conformationally constrained helical hexapeptide. *Surf Sci.* 2006;600(2):409–16.
56. Chaki NK, Vijayamohanan K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosens Bioelectron.* 2002;17(1–2):1–12.
57. Gatto E, Venanzi M, Palleschi A, Stella L, Pispisa B, Lorenzelli L, et al. Self-assembled peptide monolayers on interdigitated gold microelectrodes. *Mater Sci Eng C.* 2007;27(5–8 SPEC. ISS.):1309–12.
58. Sek S, Tolak A, Misicka A, Palys B, Bilewicz R. Asymmetry of electron transmission through monolayers of helical polyalanine adsorbed on gold surfaces. *J Phys Chem B.* 2005;109(39):18433–8.
59. Eckermann AL, Feld DJ, Shaw JA, Meade TJ. Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. *Coord Chem Rev [Internet].* 2010;254(15–16):1769–802. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.023>
60. White HS, Leddy J, Bard AJ. Polymer Films on Electrodes. 8. Investigation of Charge-Transport Mechanisms in Nafion Polymer Modified Electrodes. *J Am Chem Soc.* 1982;104(18):4811–7.
61. Tang D, Yuan R, Chai Y. Ligand-functionalized core/shell Ag@Au nanoparticles label-free amperometric immun-biosensor. *Biotechnol Bioeng [Internet].* 2006 Aug 5;94(5):996–1004. Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.20922>

62. Taton TA, Lu G, Mirkin CA. Two-color labeling of oligonucleotide arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *J Am Chem Soc.* 2001;123(21):5164–5.
63. Swalen JD, Allara DL, Andrade J., Chandross EA, Garoff S, Israelachvili J, et al. *Molecular Monolayers and Films.* *Langmuir.* 1987;3(1):932–50.
64. Ulman A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem Rev* [Internet]. 1996 Jan;96(4):1533–54. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr9502357>
65. Kannan P, John SA. Determination of nanomolar uric and ascorbic acids using enlarged gold nanoparticles modified electrode. *Anal Biochem* [Internet]. 2009;386(1):65–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2008.11.043>
66. Stuart BH. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2004. (Analytical Techniques in the Sciences). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0470011149>
67. A.H. Kuptsov GNZ. *Handbook of Fourier Transform Raman and Infrared Spectra of Polymers.* Elsevier Science; 1998.
68. Frank H.R, Goldie W. *Gold Plating Technology.* United kingdom: Amer Electroplaters Soc; 1987.

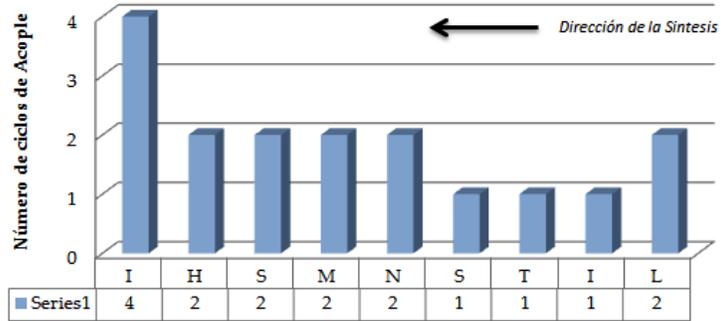
10. ANEXOS

ANEXO A. Comportamiento de la síntesis de los péptidos VPH 1, VPH2 y VPH

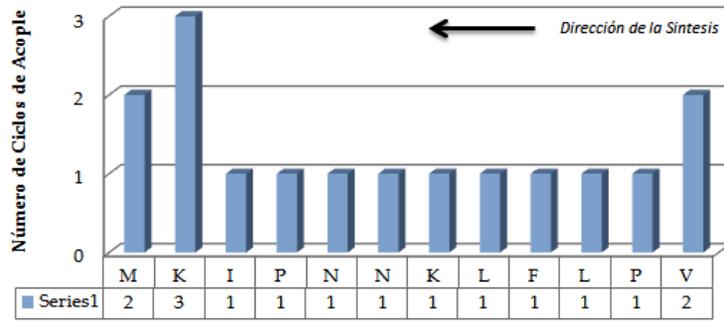
3.

Se muestran los ciclos de acople que fueron necesarios para tener una prueba de Kaiser negativa durante la incorporación de cada uno de los aminoácidos de la secuencia.

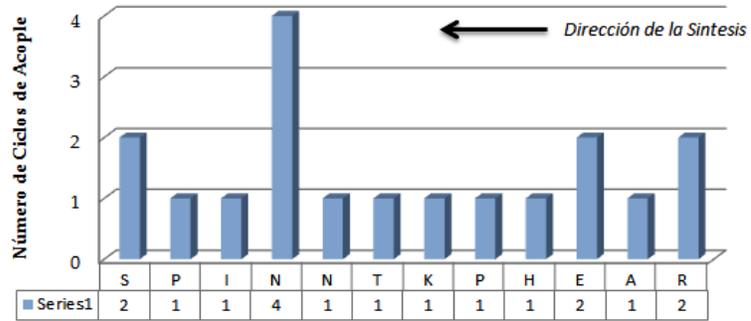
VPH 1



VPH 2



VPH 3

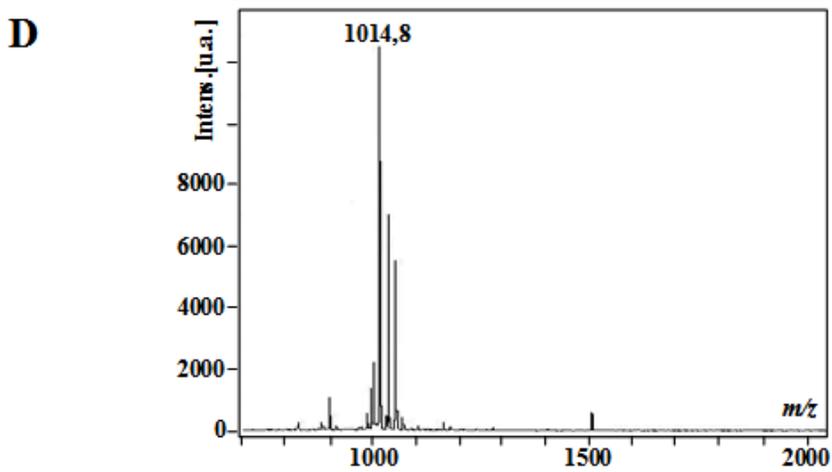
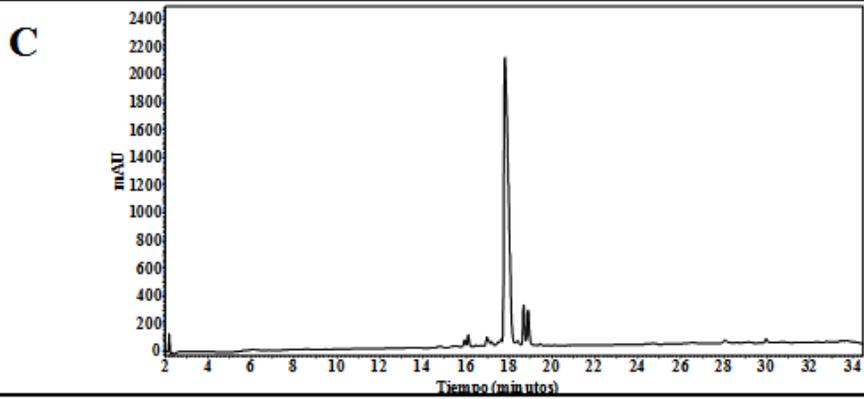
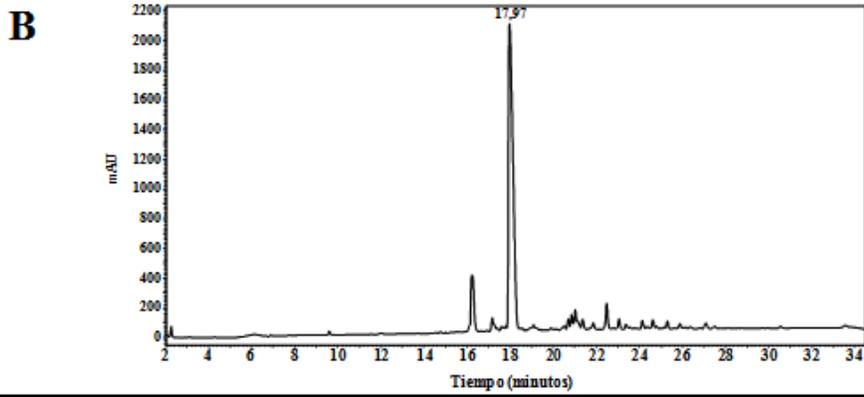
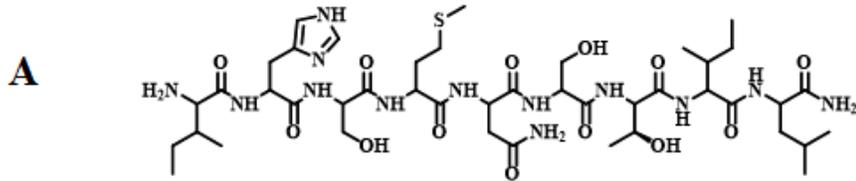


ANEXO B. Caracterización de los péptidos sintéticos obtenidos

A continuación, se muestran los resultados de la caracterización de los péptidos obtenidos en esta investigación. La información está distribuida de la siguiente manera: Panel A. Código, secuencia, estructura y masa monoisotópica del péptido. Panel B. Perfil cromatográfico del producto crudo. Panel C. Perfil cromatográfico del producto obtenido después de su purificación. Panel D. Espectro de masas del péptido puro.

VPH 1: IHSMNSTIL

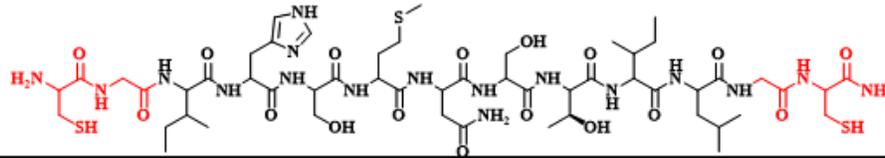
Exact Mass: 1013,5



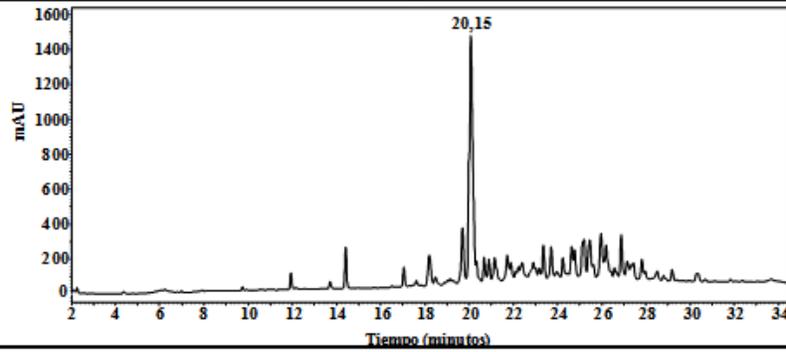
VPH 1.1: CGIHSMNSTILGC

Exact Mass: 1333,6

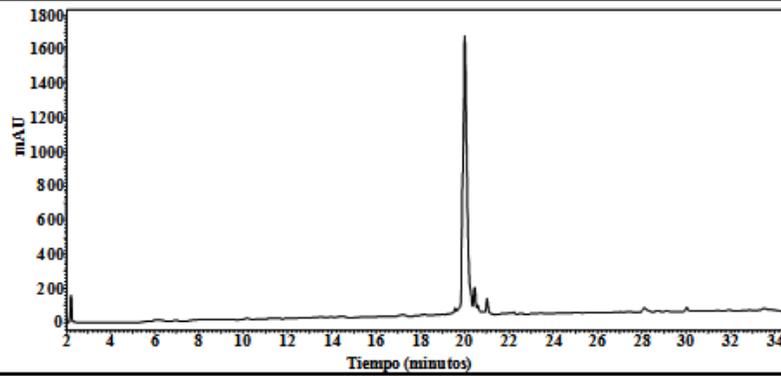
A



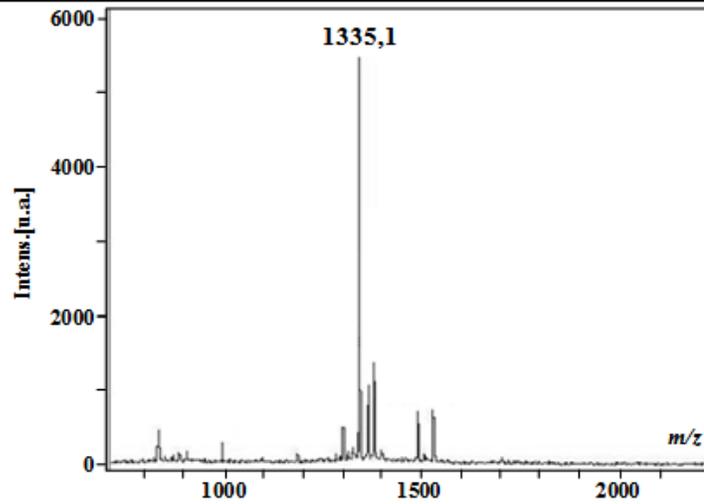
B



C

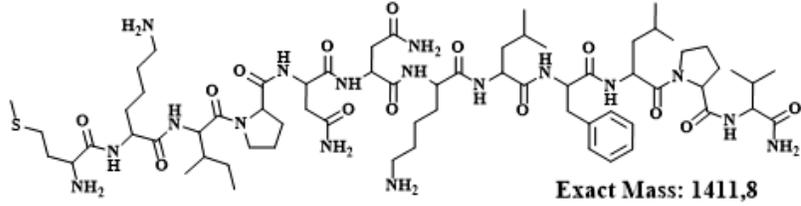


D

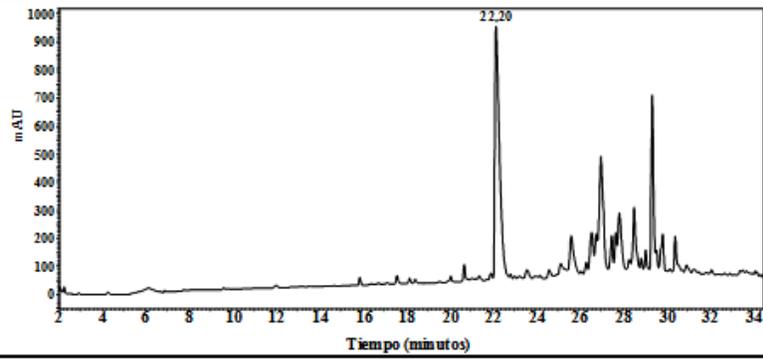


VPH 2: MKIPNNKLF^{LPV}

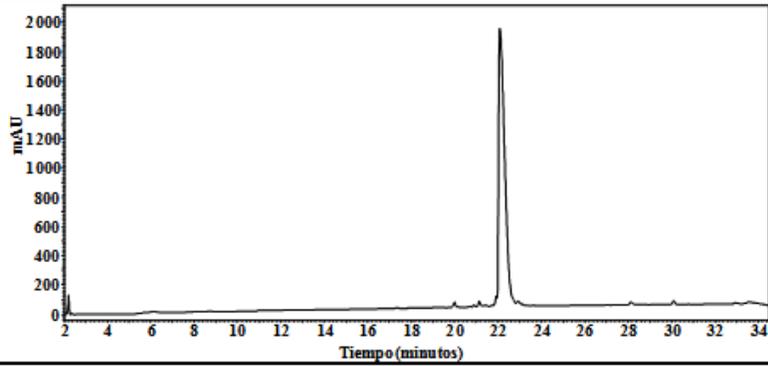
A



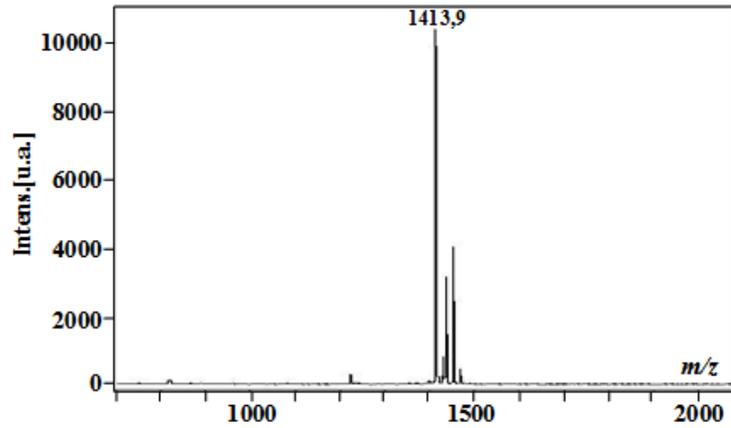
B



C

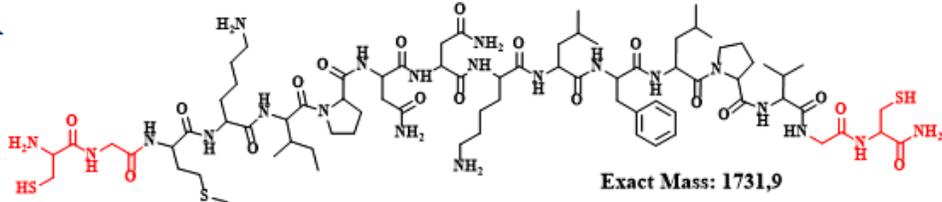


D

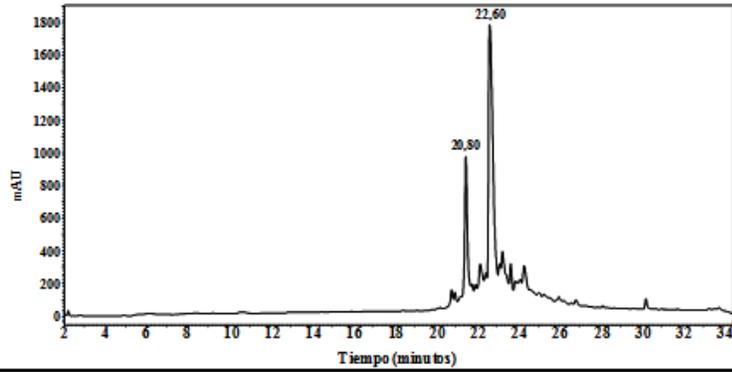


VPH 2.1: CGMKIPNNKLF LPVGC

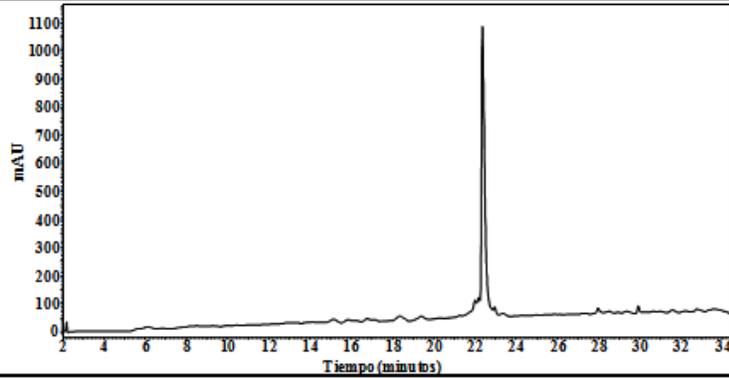
A



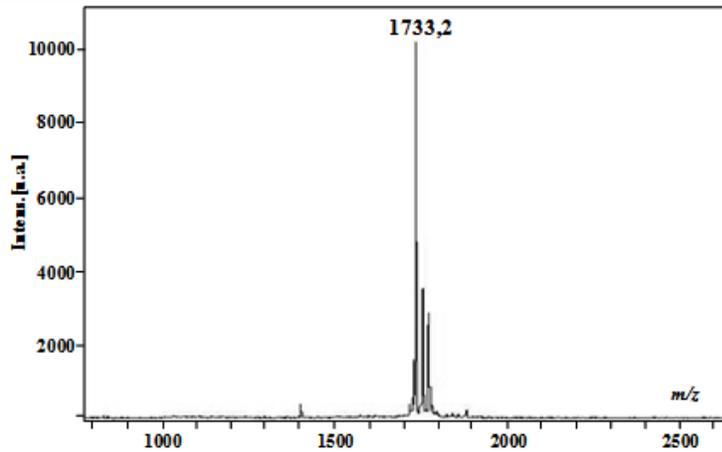
B



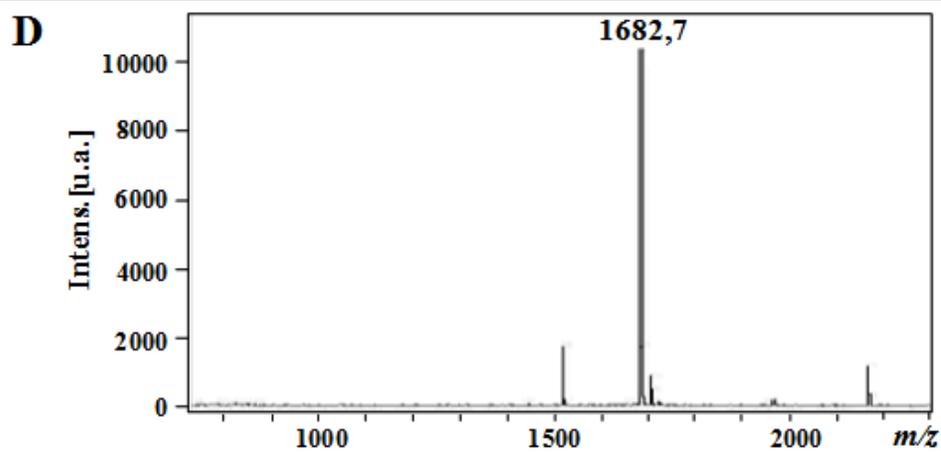
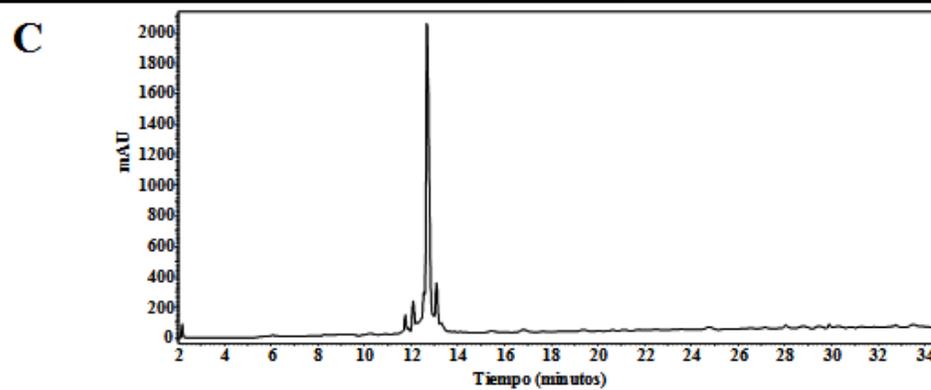
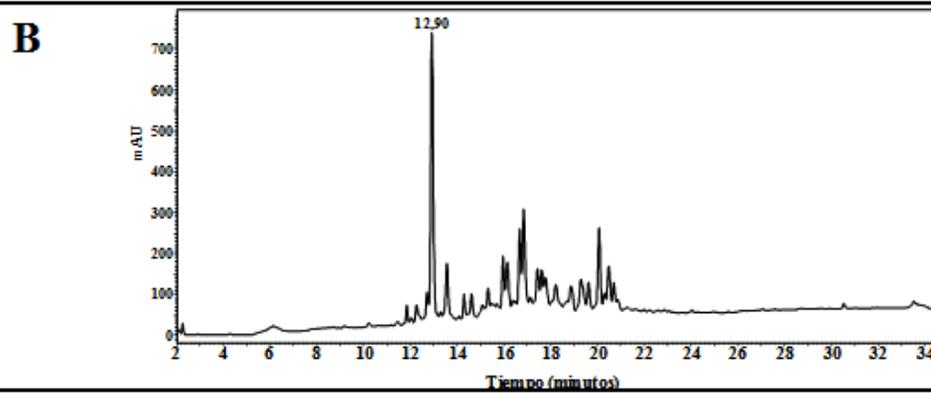
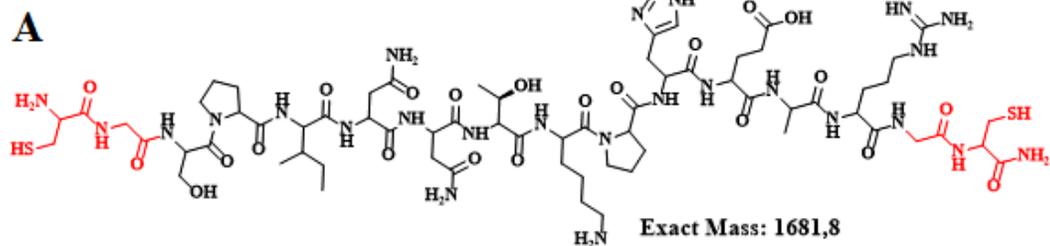
C



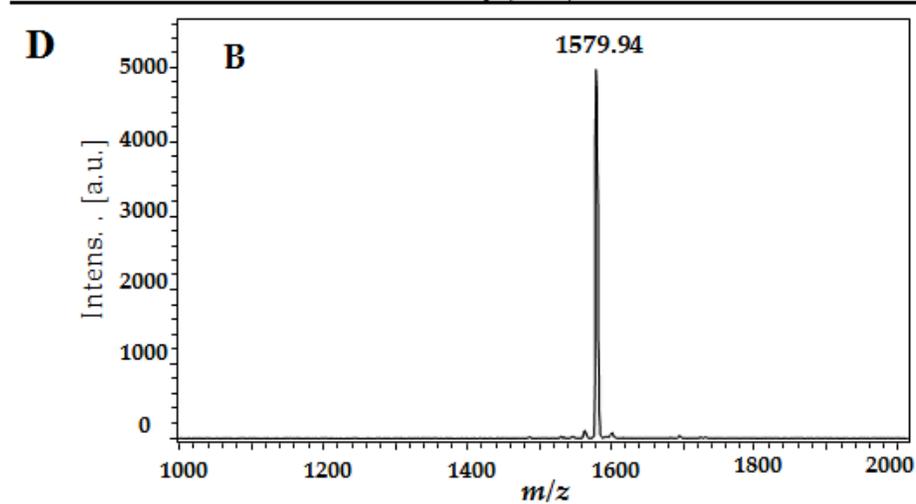
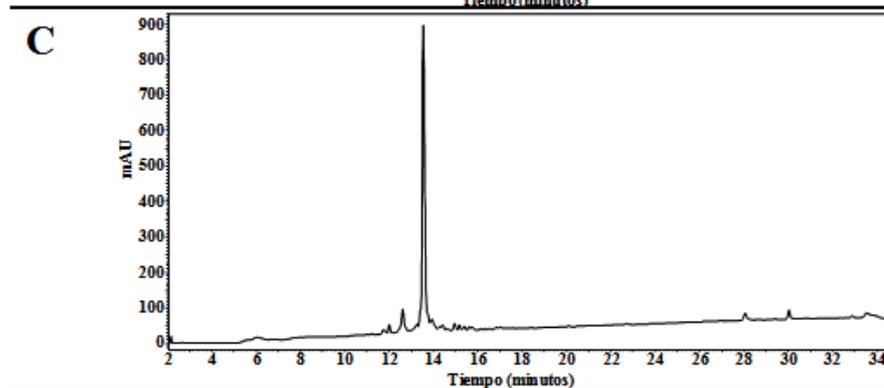
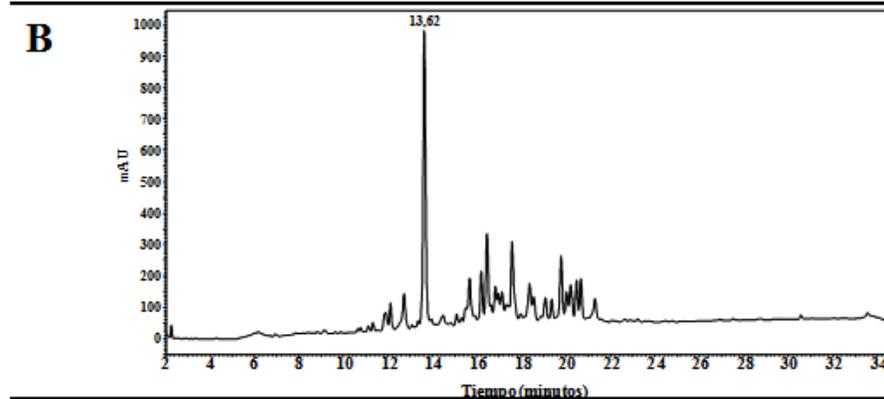
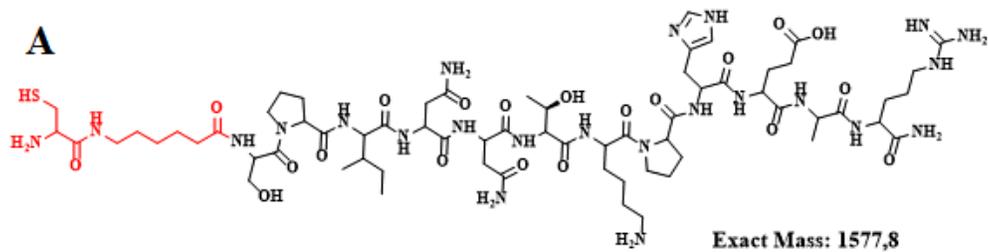
D



VPH 3.1: CGSPINNTKPHEARGC



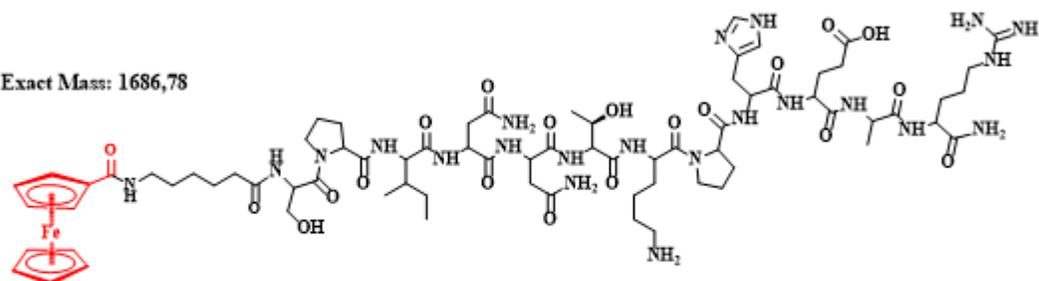
VPH 3.2: C-Ahx-SPINNTKPHEAR



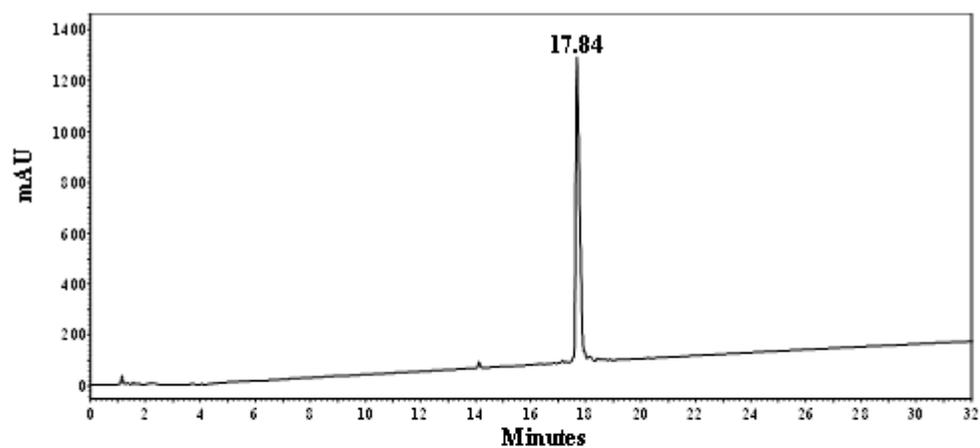
VPH 3.3: Fc-Ahx-SPINNTKPHEAR

A

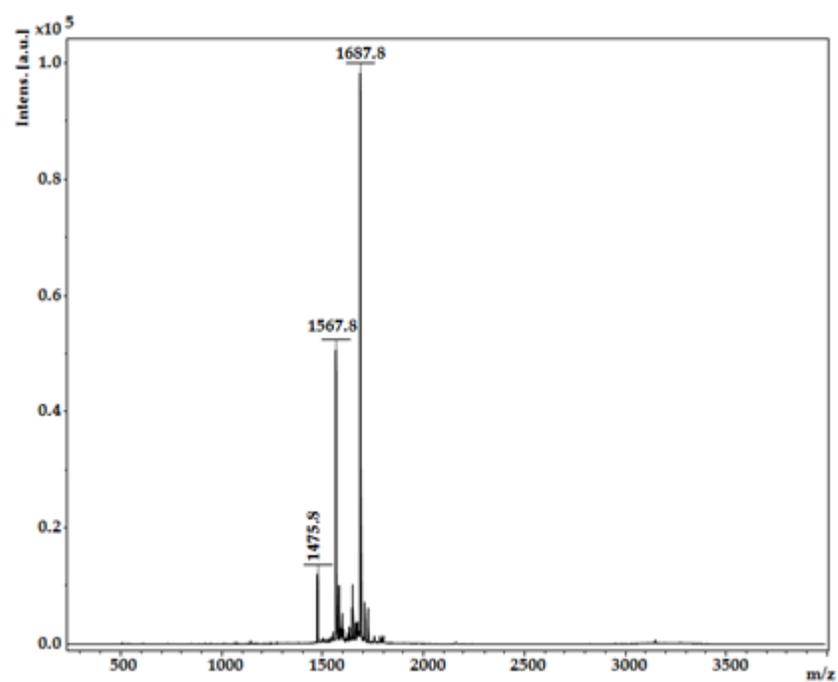
Exact Mass: 1686,78



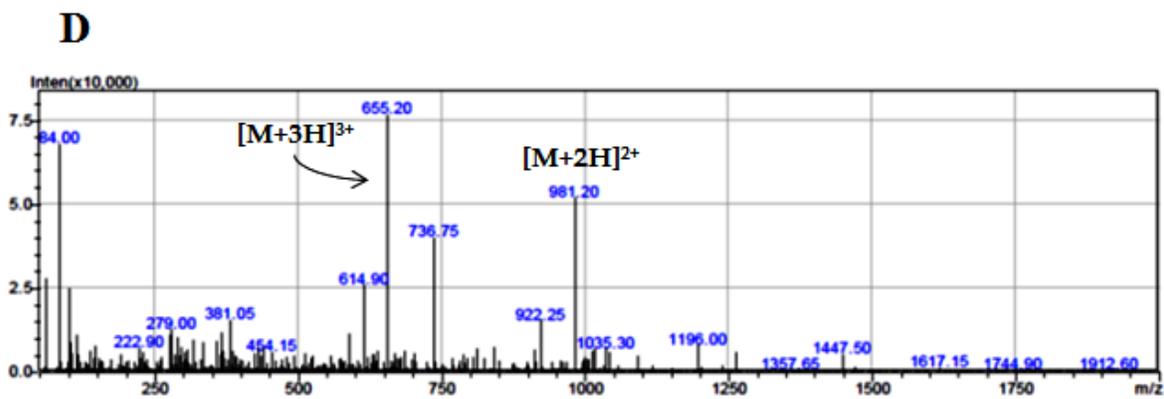
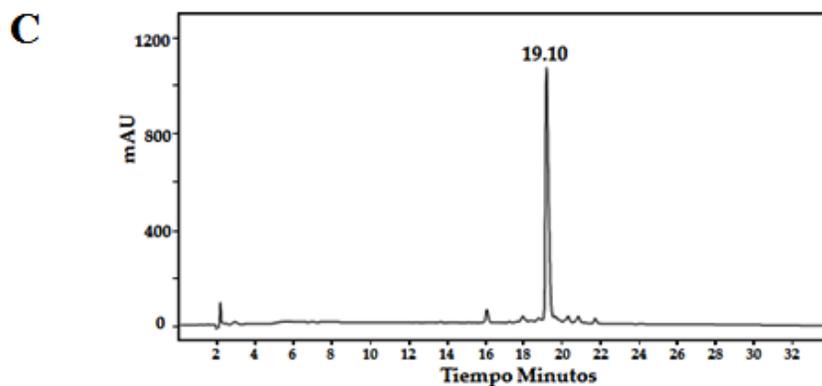
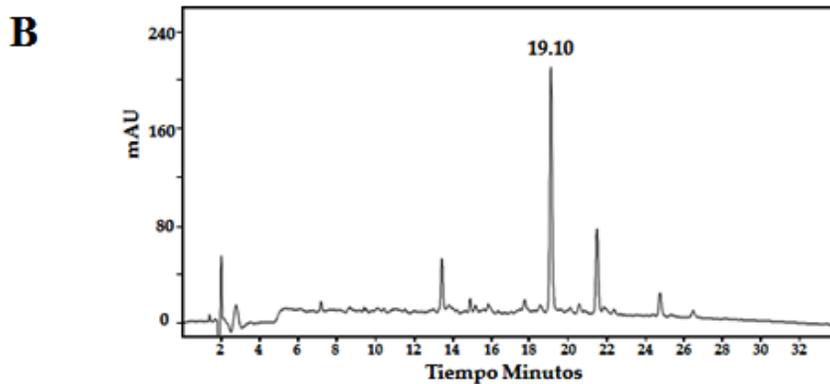
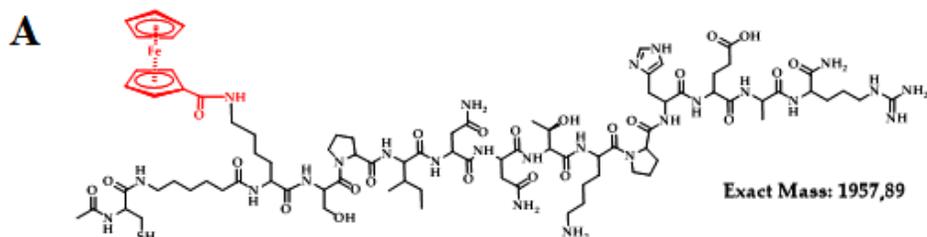
C



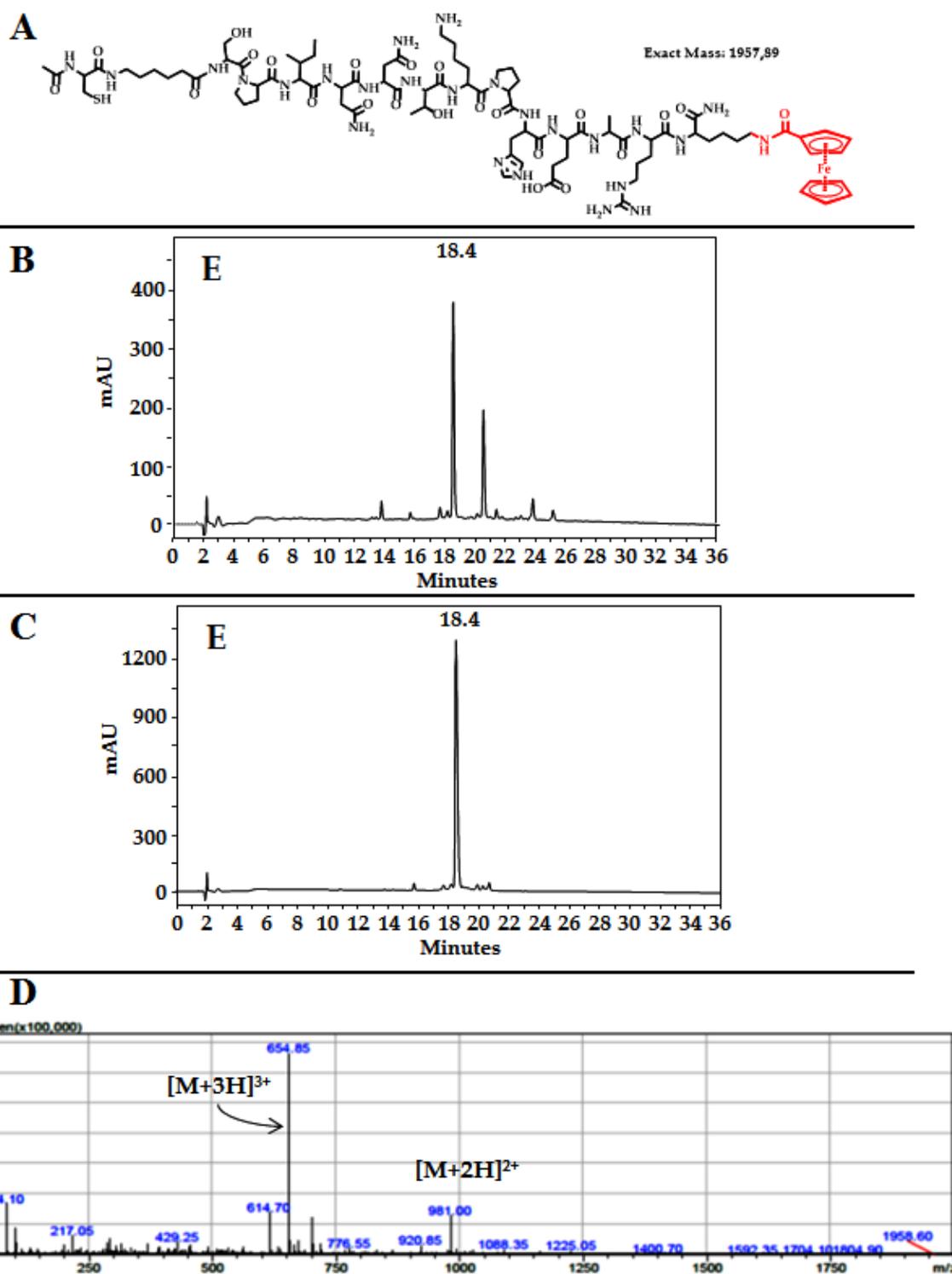
D



VPH 3.4: Ac-C-Ahx-(Fc)KSPINNTKPHEAR



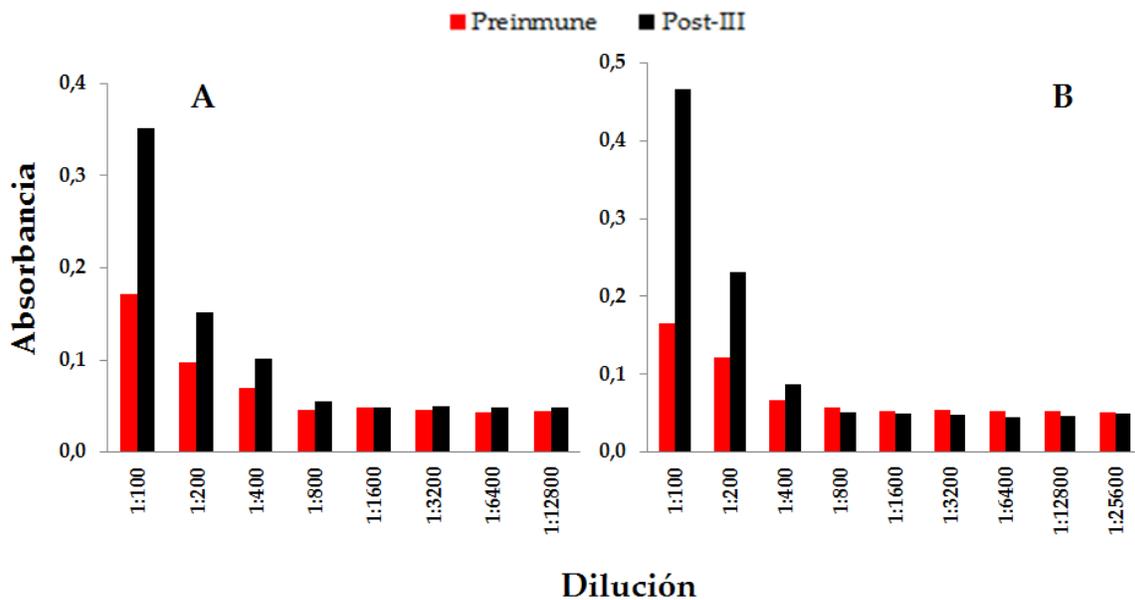
VPH 3.5: Ac-C-Ahx-SPINNTKPHEAR(Fc)K



ANEXO C. Determinación del título mediante ensayo de ELISA para sueros de ratones BALB/c

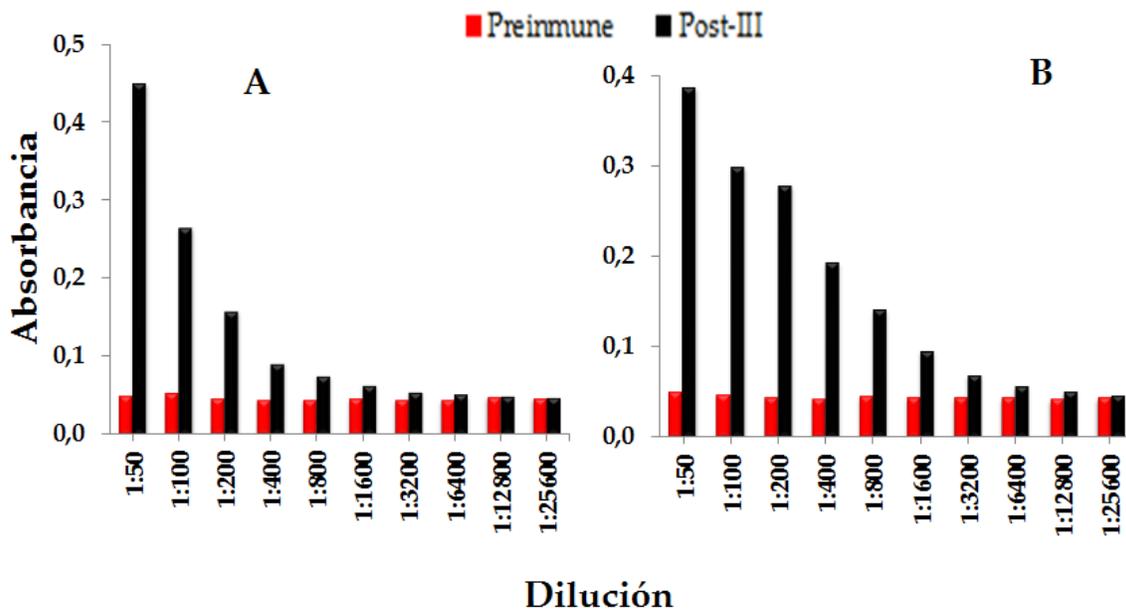
En las gráficas que aparecen a continuación se presenta el código y la secuencia en la parte superior, la gráfica **A** y **B** muestran el título para el suero de los ratones 1 y 3 respectivamente. Las barras de color negro corresponden a la absorbancia para el suero Post III y las de color rojo corresponden a la absorbancia obtenida para el suero preimmune.

VPH 3.1 CGSPINNTKPHEARGC



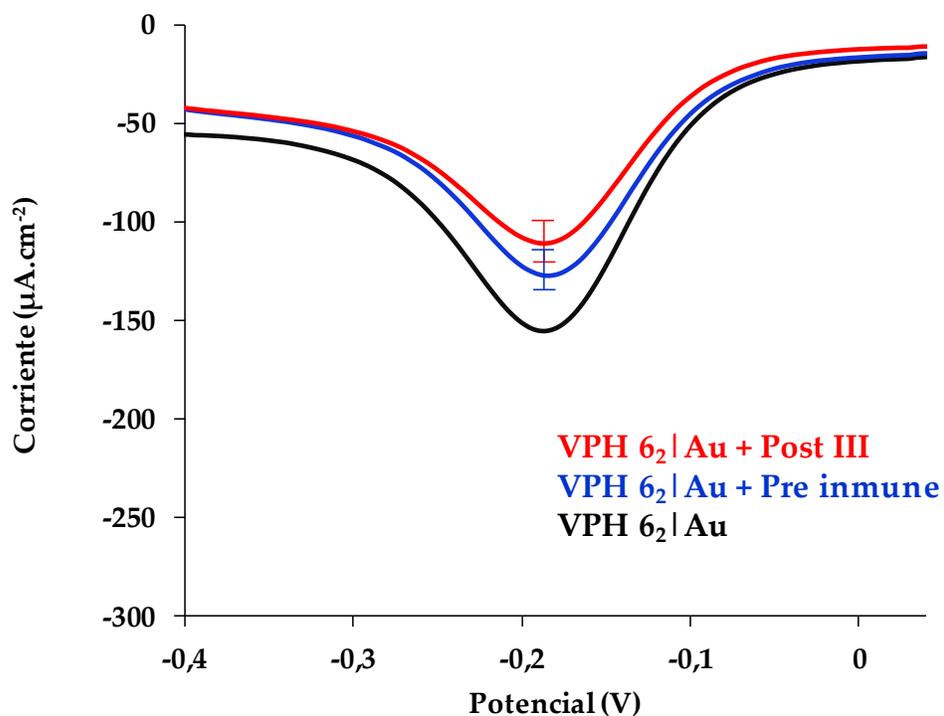
ANEXO D. Determinación del título mediante ensayo de ELISA para sueros de conejos Nueva Zelanda

Las gráficas A y B presentadas a continuación muestran el título para el suero de los segundos conejos inmunizados con los péptidos VPH 6₄ y (VPH 3.1)_n, respectivamente. Las barras de color negro corresponden a la absorbancia para el suero Post III y las de color rojo corresponden a la absorbancia obtenida para el suero preinmune.



ANEXO E. Detección de anticuerpos policlonales anti-VPH 6

En la siguiente grafica se muestra la detección de anticuerpos policlonales anti-VPH 6 (dilución se los sueros PI y PIII 1:5000 en PBS 0,1 mol.L-1, pH = 7,4) usando el electrodo VPH 6₂|Au por SWV, bajo las siguientes condiciones; amplitud del pulso 25 mV, escalones de potencial 4 mV, rango de escaneo de 50 hasta -400 mV y frecuencia de 15 Hz. La densidad de corriente para el electrodo de Au desnudo fue de -575 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ (a $\sim 0,2\text{V}$). Todas las mediciones se realizaron usando una solución de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 1 mM en KCl 0,50 M, a temperatura ambiente.

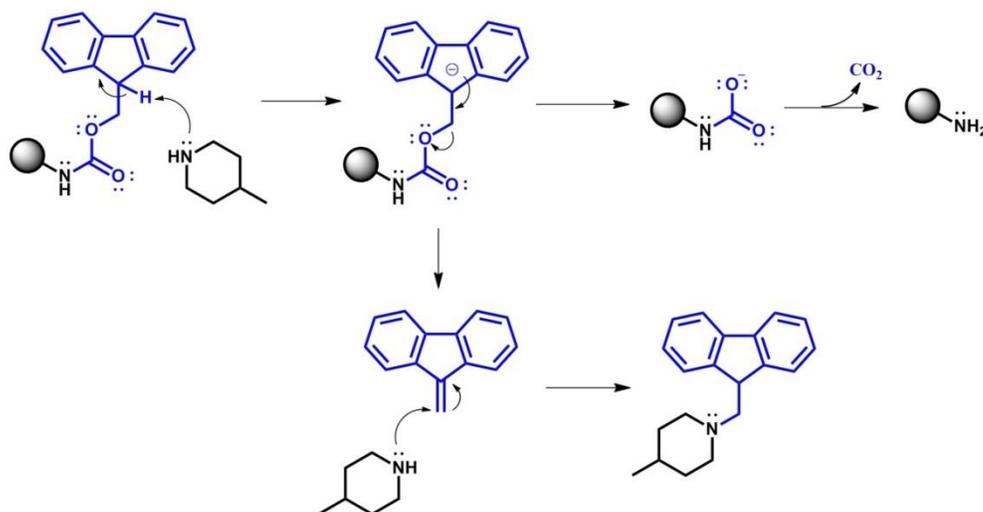


ANEXO F. Mecanismos de reacción involucrados en esta investigación

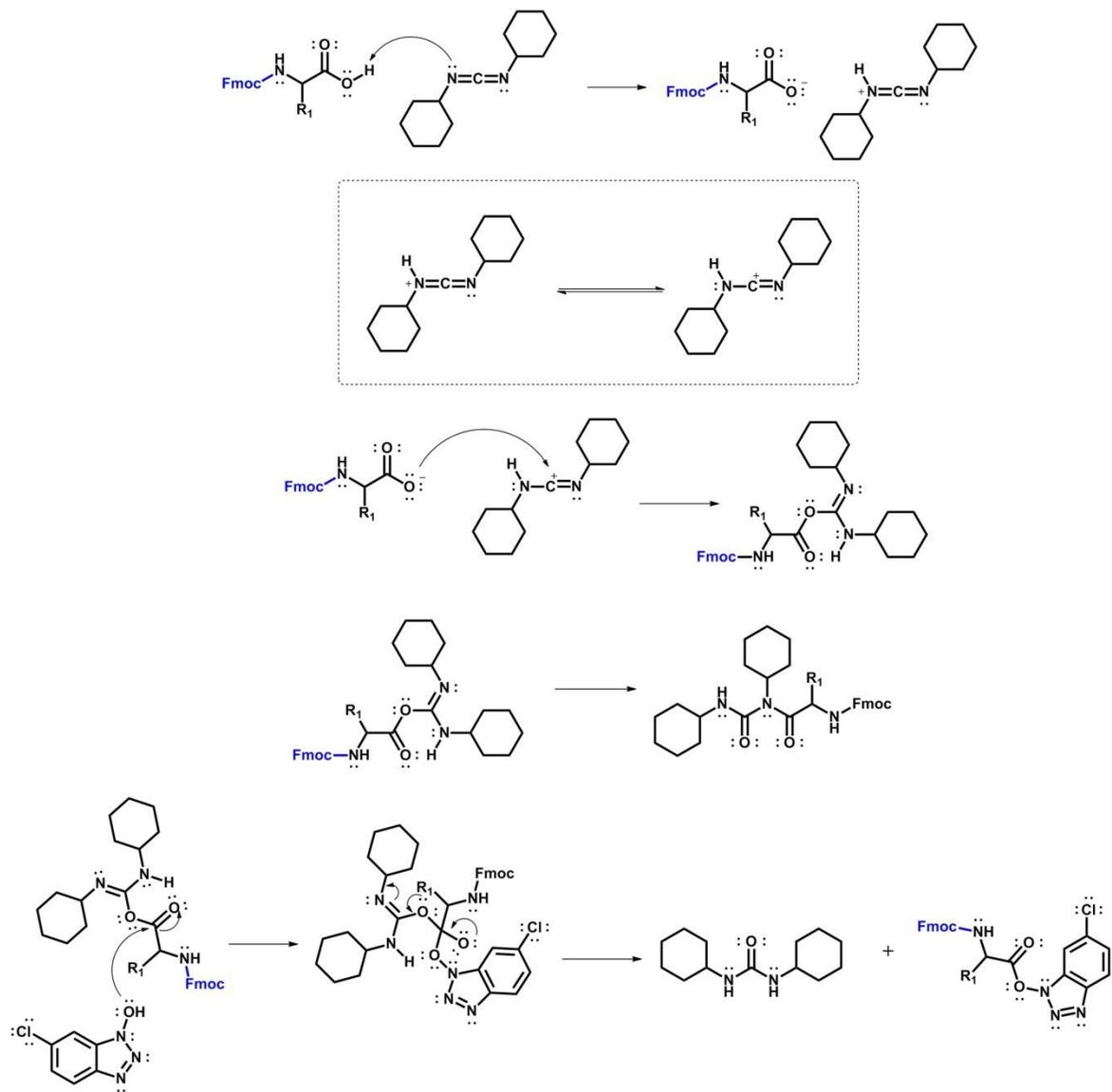
MECANISMOS DE REACCIÓN INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA EMPLEANDO LA ESTRATEGIA FMOC/TBU

La síntesis de péptidos en fase sólida está conformada por los siguientes pasos: (i) La remoción del grupo Fmoc presente en la resina y en los residuos que se van incorporando a la secuencia peptídica, (ii) La activación del aminoácido por formación de un éster y (iii) El acople del aminoácido activado en la secuencia peptídica creciente. La desprotección y el acople son monitoreados mediante el (iv) test de Kaiser, que es una prueba colorimétrica para determinar la presencia de grupos amina. Los mecanismos más aceptados para cada uno de estos pasos se exponen a continuación.

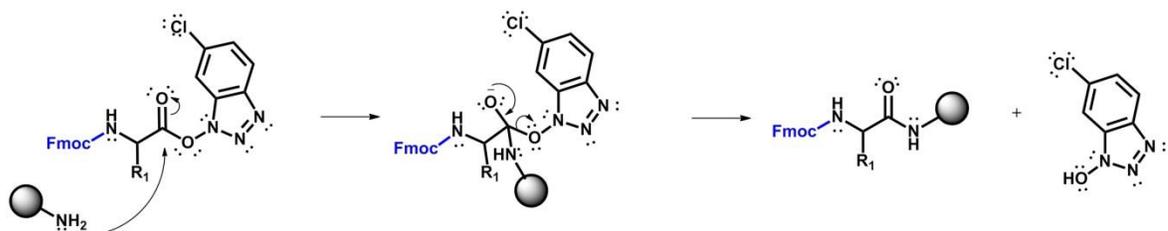
i. Remoción del grupo Fmoc



ii. Activación del aminoácido



iii. Acople del aminoácido



iv. Test de Kaiser

