



UASLP

Universidad Autónoma
de San Luis Potosí

Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Campus Altiplano

**X Congreso Nacional de Tecnología
Aplicada a Ciencias de la Salud**



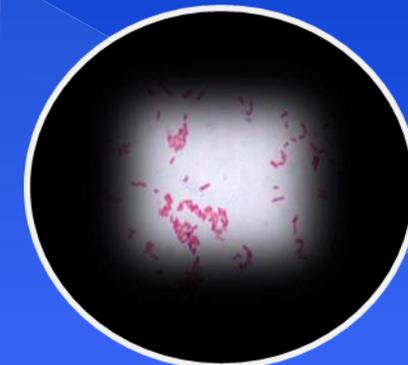
Análisis y caracterización
de fluidos biológicos
Usando espectroscopia Raman

Dra. Raquel Avila Rodríguez

Universidad Iberoamericana Puebla, Pue. 13,14, y 15 de Junio de 2019

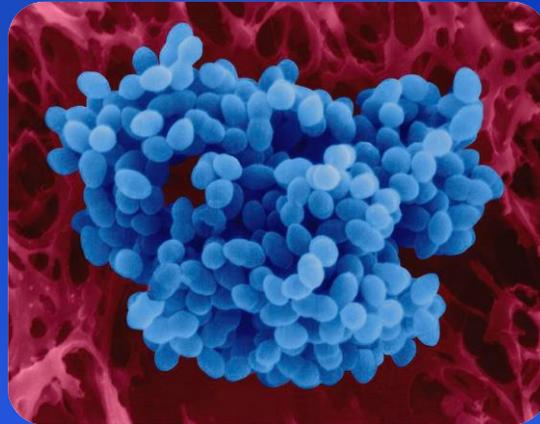
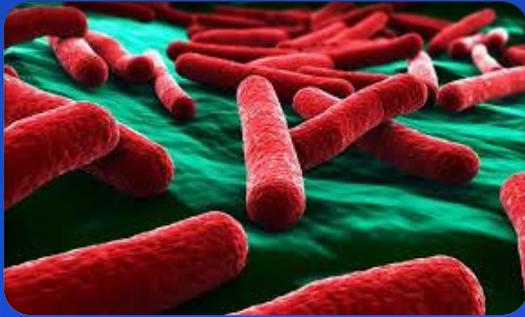
INTRODUCCIÓN

Actualmente las técnicas de análisis de fluidos biológicos son técnicas Invasivas, que necesitan de alguna preparación especial, de algunos reactivos, o de algún procesamiento que puede tardar días en analizar.



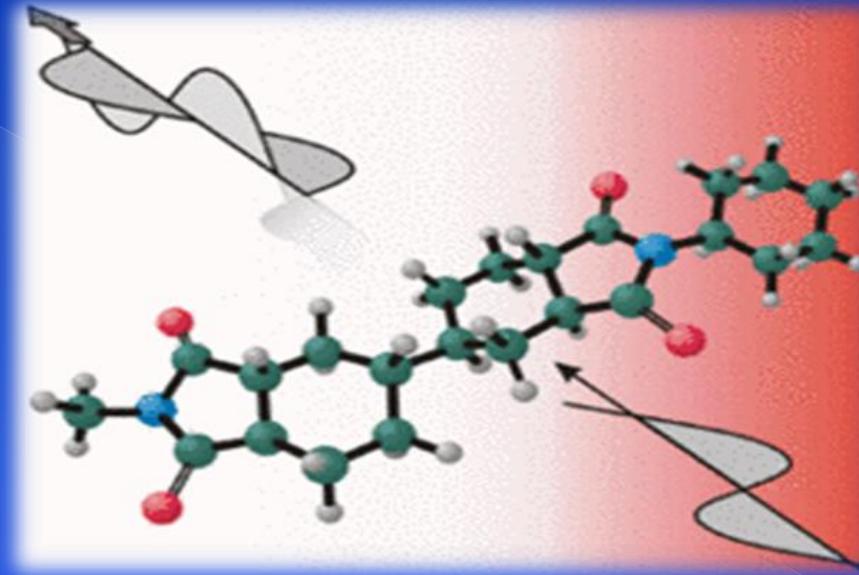
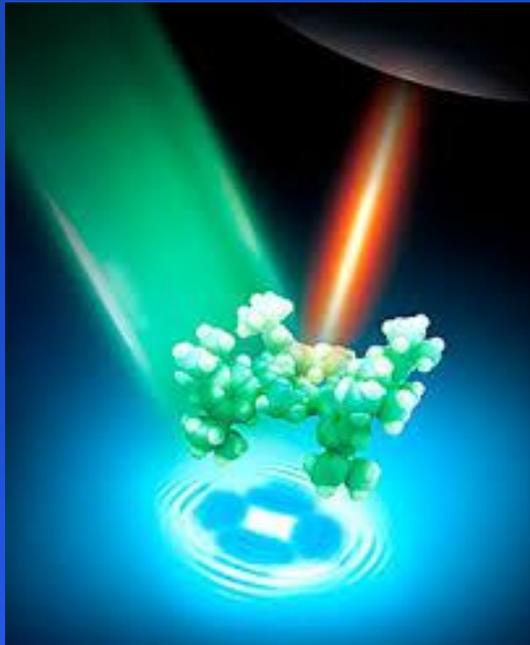
INTRODUCCIÓN

La identificación del agente etiológico responsable de una gastroenteritis, puede llevar tiempo [1]. Actualmente las técnicas para la identificación de los agentes patógenos específicos a la gastroenteritis son diversos, como la ampliación de ADN y la Inmunoelectroforesis, prueba de identificación bioquímica, serológica y de susceptibilidad a los antimicrobianos [2].



INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que las técnicas espectroscópicas, son técnicas confiables para identificar o cuantificar analitos o componentes como la glucosa o urea [3]. Actualmente la espectroscopia NIR se utiliza para la determinación de multitud de parámetros de un gran número de materiales biológicos. La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico.



INTRODUCCIÓN

Se han desarrollado técnicas de espectroscopia de apoyo para el diagnóstico en diferentes aplicaciones biológicas con excelentes resultados [4-5], una ventaja es que no necesitan de una preparación especial de la muestra o reactivo.



Figura 1. Algunas aplicaciones de las técnicas de espectroscopia para análisis de fluidos biológicos

INSTRUMENTACIÓN RAMAN:

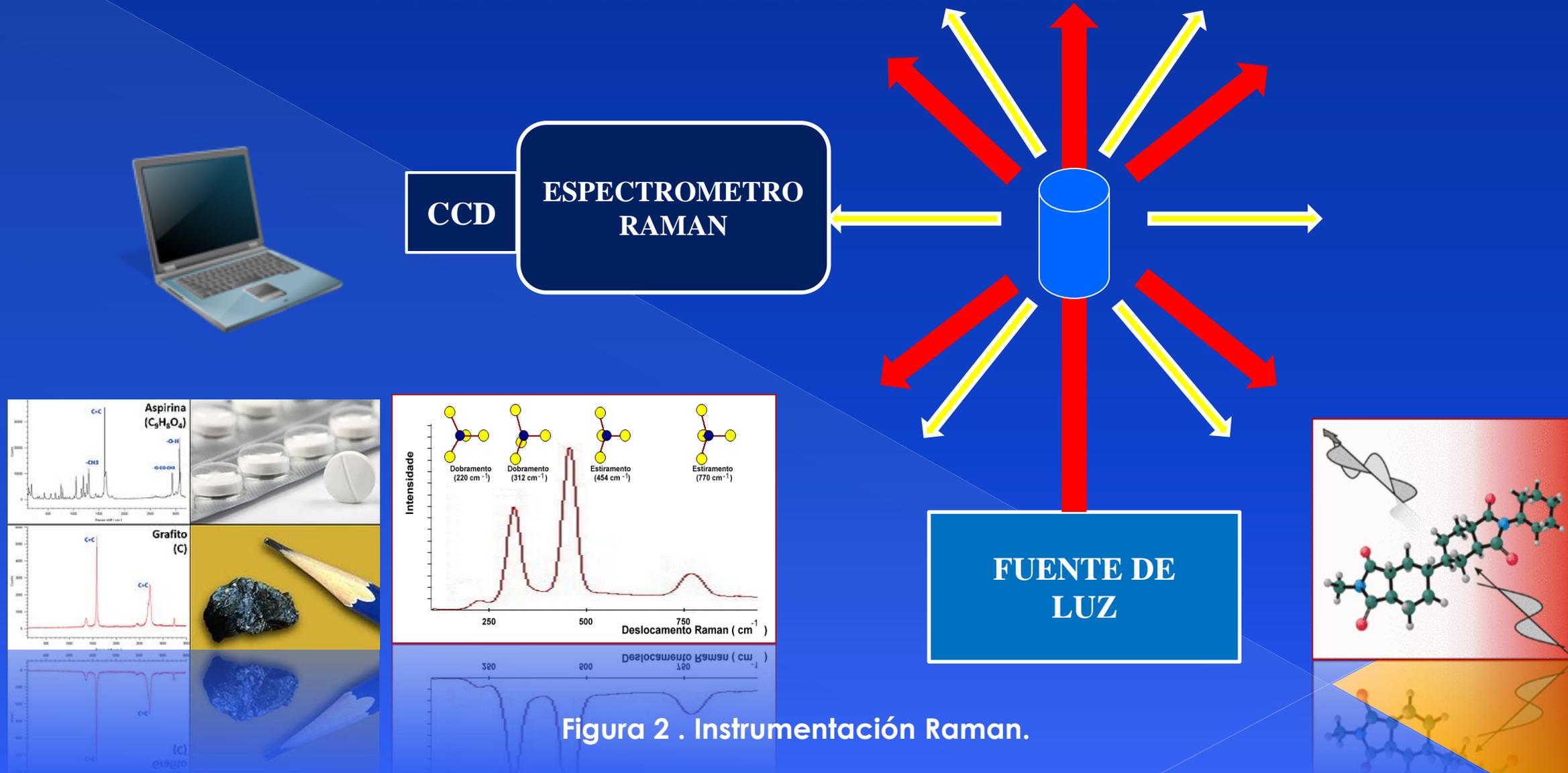


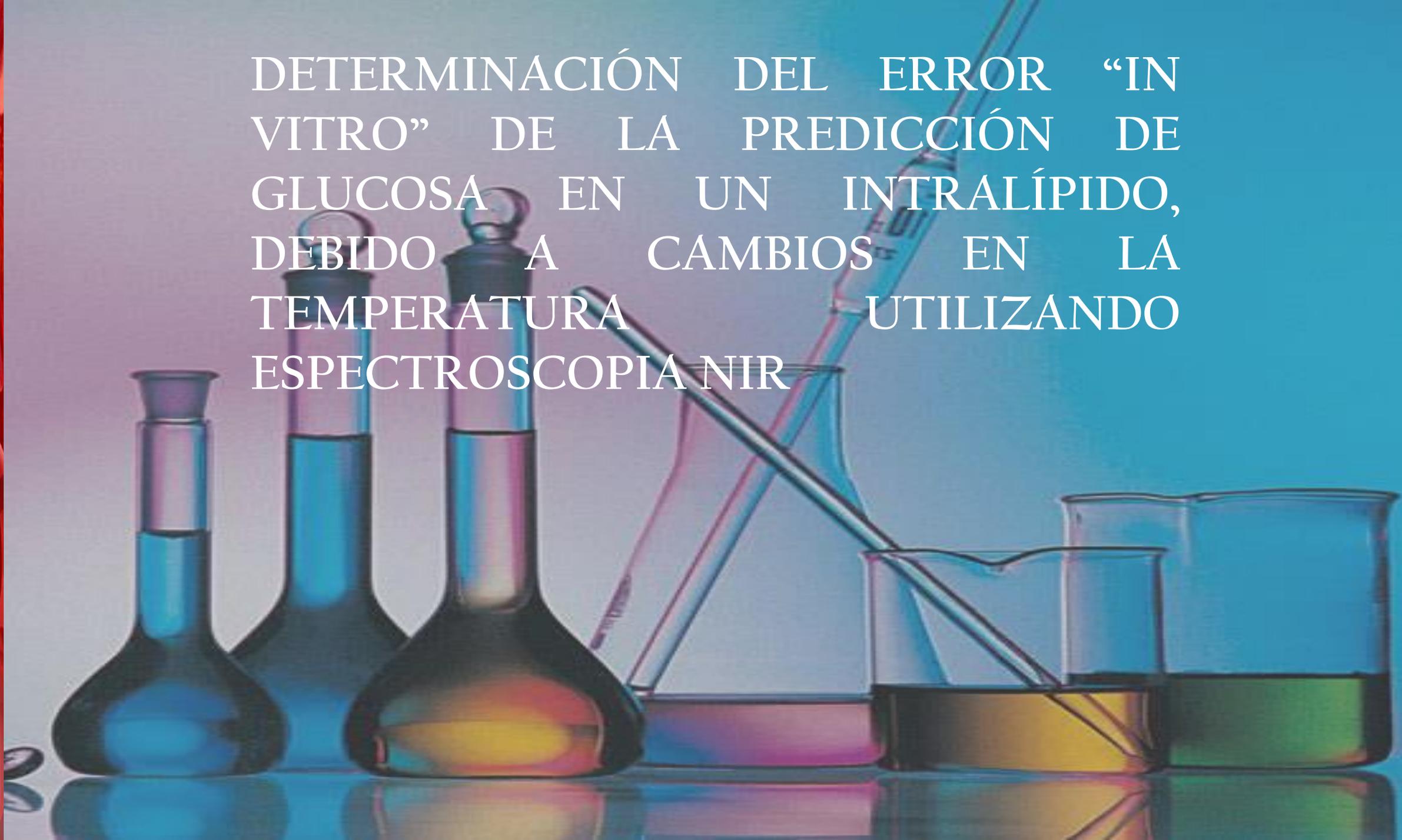
Figura 2 . Instrumentación Raman.

EQUIPO RAMAN UTILIZADO



Figura 3. Arreglo experimental del equipo Raman

DETERMINACIÓN DEL ERROR “IN VITRO” DE LA PREDICCIÓN DE GLUCOSA EN UN INTRALÍPIDO, DEBIDO A CAMBIOS EN LA TEMPERATURA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NIR



ANTECEDENTES

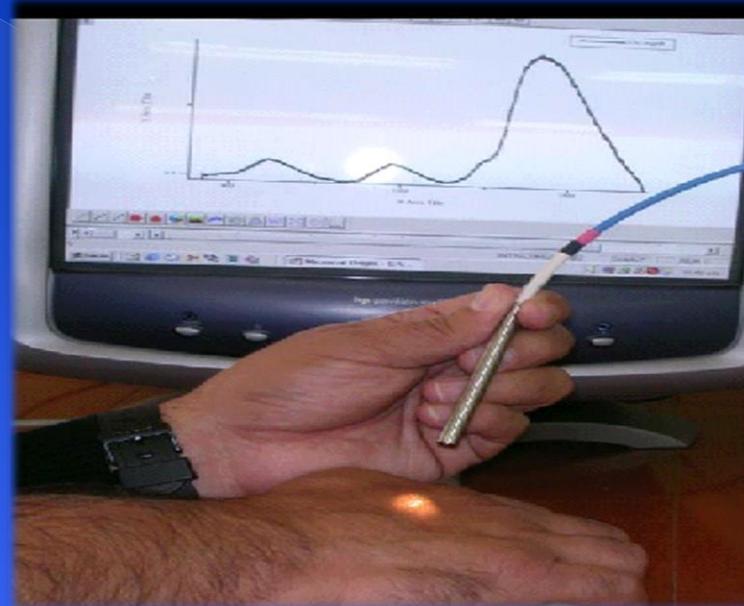
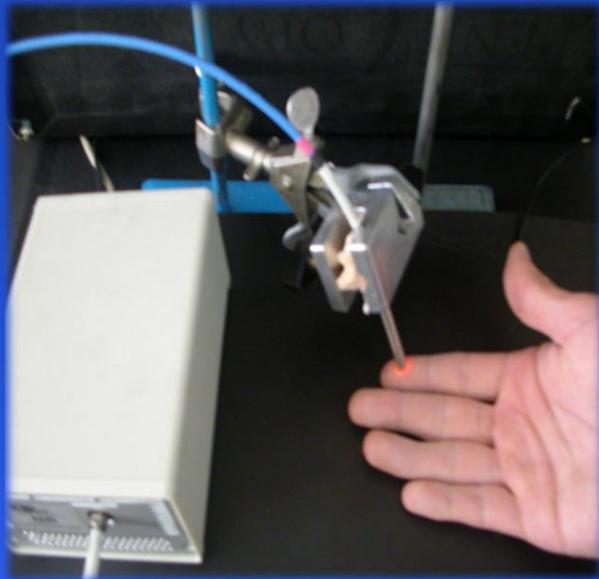


Figura 4. Medición de concentración de glucosa

ANTECEDENTES



Figura 5. Mediciones simultáneas

ANTECEDENTES

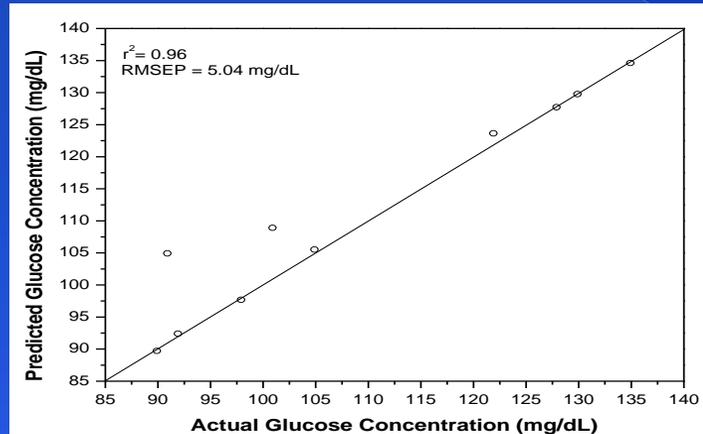
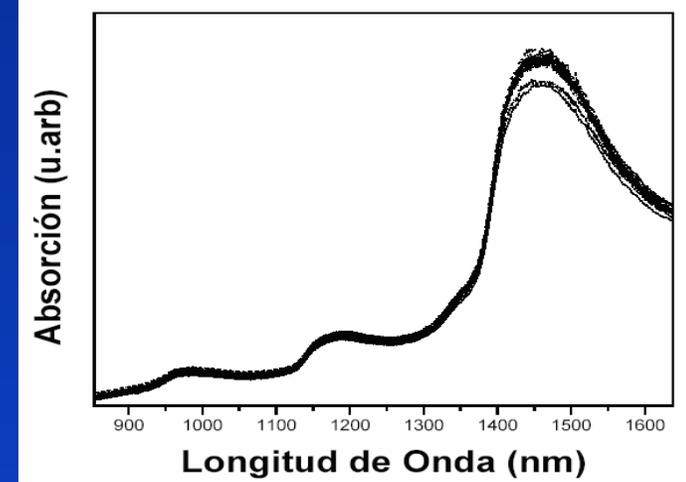
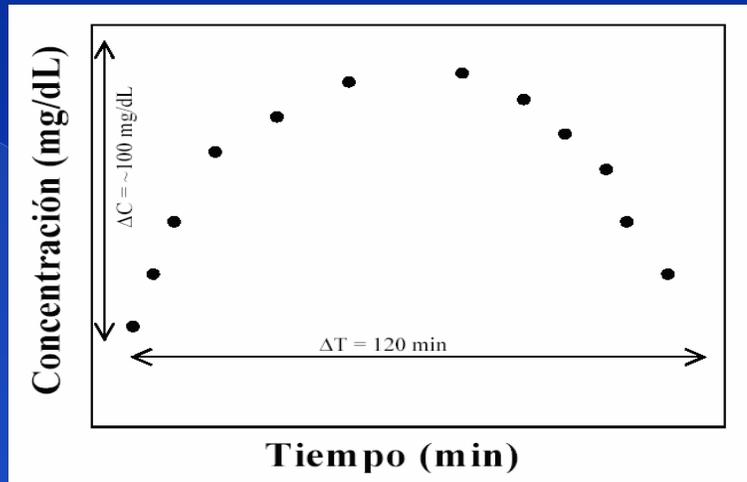


TABLE 4. Predicted glucose concentration values for patient 6 using model 2.

Actual Glucose Concentration (mg/dL)	Predicted Glucose Concentration (mg/dL)
100	112.3
107	101.4
84	83.7
86	93.0
88	89.5
98	102.8

Figura 6. Resultados de mediciones NIR para glucosa

C.Araujo-Andrade, Facundo-Ruiz, J.R. Martínez-Mendoza, H.Terrones. “Detección y predicción de concentraciones de glucosa en un medio turbio (intralípidos) utilizando espectroscopía de absorción en el cercano infrarrojo”. Enviado para su revisión a la Revista Mexicana de Física (2005).

ANTECEDENTES

Yema: $r^2 = 0.98$ RMSEP= 4.8 mg/dL

Falange: $r^2 = 0.86$ RMSEP= 15.1mg/dL

Palma: $r^2 = 0.76$ RMSEP= 17.4mg/dL

Vena: $r^2 = 0.68$ RMSEP= 22.7mg/dL

•Se demostró la factibilidad de la técnica no invasiva para la detección y cuantificación de la glucosa, obteniendo resultados aceptables comparados con los reportados en la literatura, pero aún no puede ser aplicada clínicamente.

•Se demostró que la mejor zona de medición en la mano.

•Factores como la zona de medición, la temperatura corporal y ambiental, configuración experimental, pueden llevarnos a una pobre calibración del modelo de predicción.

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

- ✓ Identificar cambios espectrales del intralipido, debido a cambios en concentraciones de glucosa.
- ✓ Determinar cambios espectrales en el intralipido debido a cambios en temperatura únicamente.
- ✓ Evaluar el error en la predicción de la concentración de glucosa debido al incremento de la temperatura.

METODOLOGÍA:

Para el desarrollo de las diferentes etapas, se utilizó una solución de intralípido, que puede usarse como medio dispersor de luz en NIR, ya que tiene las propiedades ópticas muy similares a las del tejido humano[18].

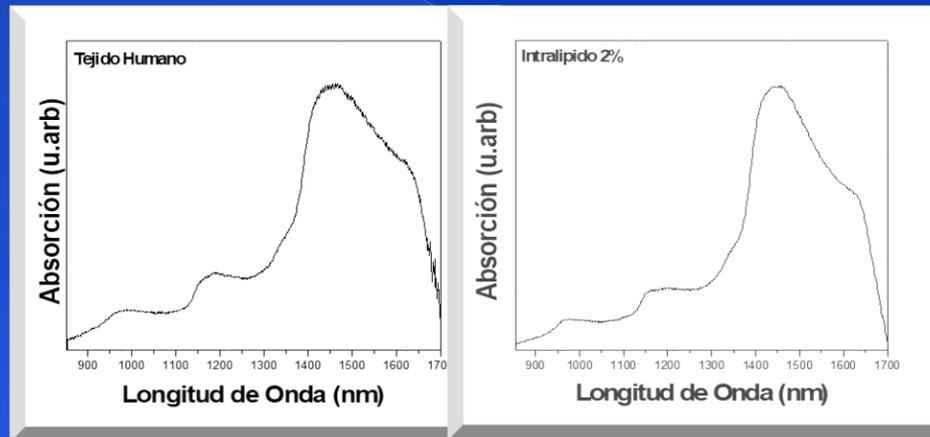


Figura 7. Espectros NIR de piel e intralípido.

METODOLOGÍA

PRIMERA ETAPA:

- **Utilizando un intralípido sin glucosa, se le fue variando la temperatura desde 24.5°C a 40°C, después con PLS y PCA se analizaron sus espectros, para verificar que los cambios espectrales están relacionados con la temperatura.**
- **PLS (Partial Least Square) regresión de mínimos cuadrados parciales, es una técnica de análisis multivariable, capaz de relacionar concentraciones de elementos directamente con espectros medidos en NIR**
- **PCA (Principal Component Analysis) es una técnica estadística de síntesis de la información o reducción de la dimensión de las variables originales, se utiliza si existen altas correlaciones entre las variables, y poder determinar agrupamientos, patrones, similitudes, o diferencias entre muestras.**

SEGUNDA ETAPA:

● Utilizando un intralípido como solución base, se le fue cambiando la concentración de glucosa de 0 mg/dL a 5000mg/dL, en intervalos de 500mg/dL, a una temperatura de 30°C, después se analizaron los espectros obtenidos con PLS y PCA para verificar que los cambios espectrales están relacionados solamente con el cambio de la glucosa.

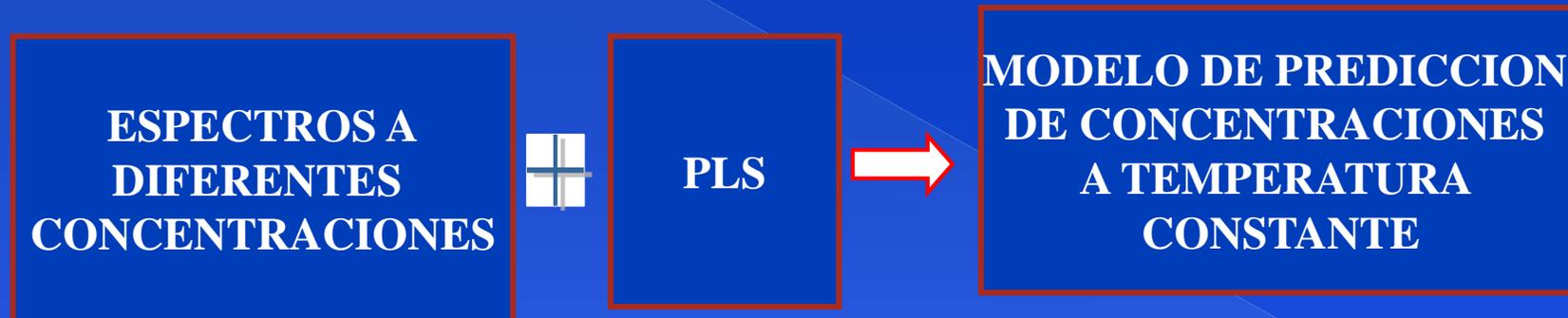


Figura 8. Medición del intralípido con Espectroscopia NIR.

TERCERA ETAPA

Se construyo un modelo de predicción de concentración de glucosa, para concentraciones desde 0 a 5000mg/dL, en intervalos de 500mg/dL, a una temperatura constante (30°C).

MODELO DE CALIBRACION:



TERCERA ETAPA

MODELO DE PREDICCIÓN:



A una concentración de 5000mg/dL se le fue incrementando la temperatura hasta alcanzar los 48°C, en intervalos de 2°C.

Este último procedimiento se repite 5 veces, para después estimar el error en la predicción de glucosa, utilizando el modelo de predicción calibrado para una temperatura constante.

RESULTADOS DE LA PRIMERA ETAPA:

Se utilizó una solución base de intralípido, a la que se le fue variando la concentración, como se aprecia en la figura 9.

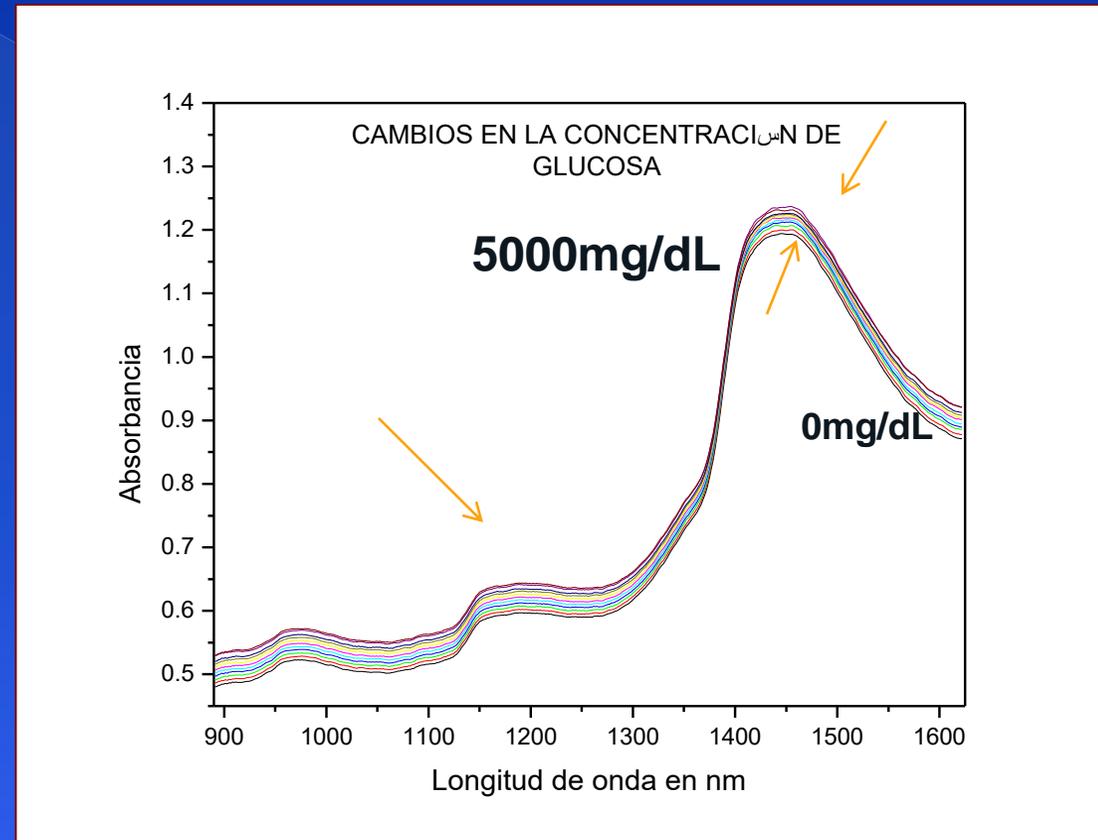


Figura 9. Cambios debido al incremento de la concentración de glucosa

RESULTADOS DE LA PRIMERA ETAPA

Un modelo de regresión PLS es construido con los espectros NIR para la predicción en la concentración de glucosa, obteniendo un coeficiente de correlación r^2 de 0.9, como se aprecia en la figura 10.

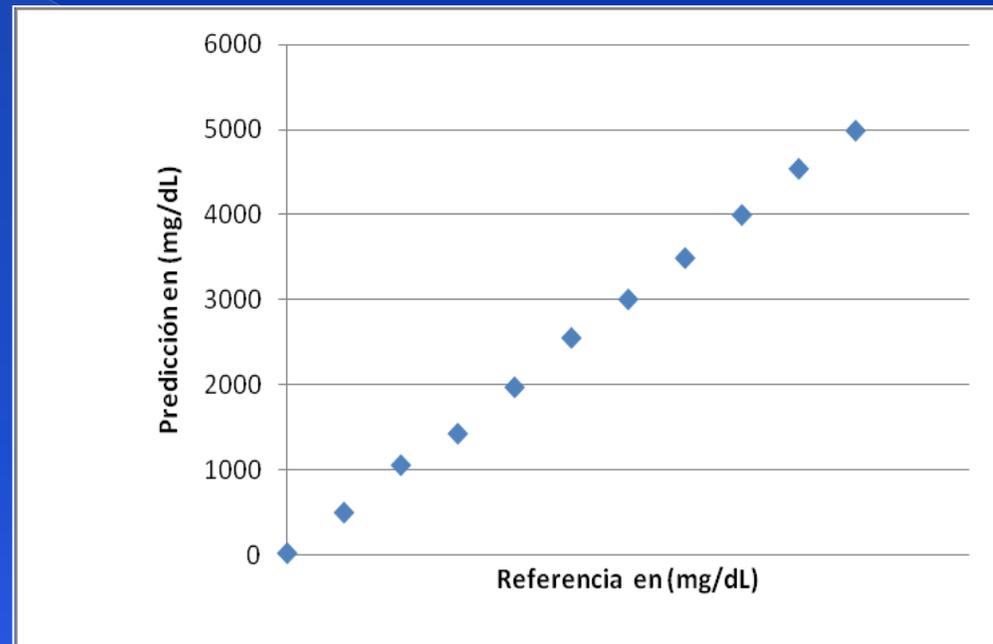


Figura 10. Relación entre la referencia y la predicción de la concentración de glucosa.

RESULTADOS DE LA PRIMERA ETAPA

Graficando los scores de PC1 contra PC2, observamos que PC1 explica el 100% de la varianza total asociada al incremento de la concentración de glucosa, como se aprecia en la figura 11.

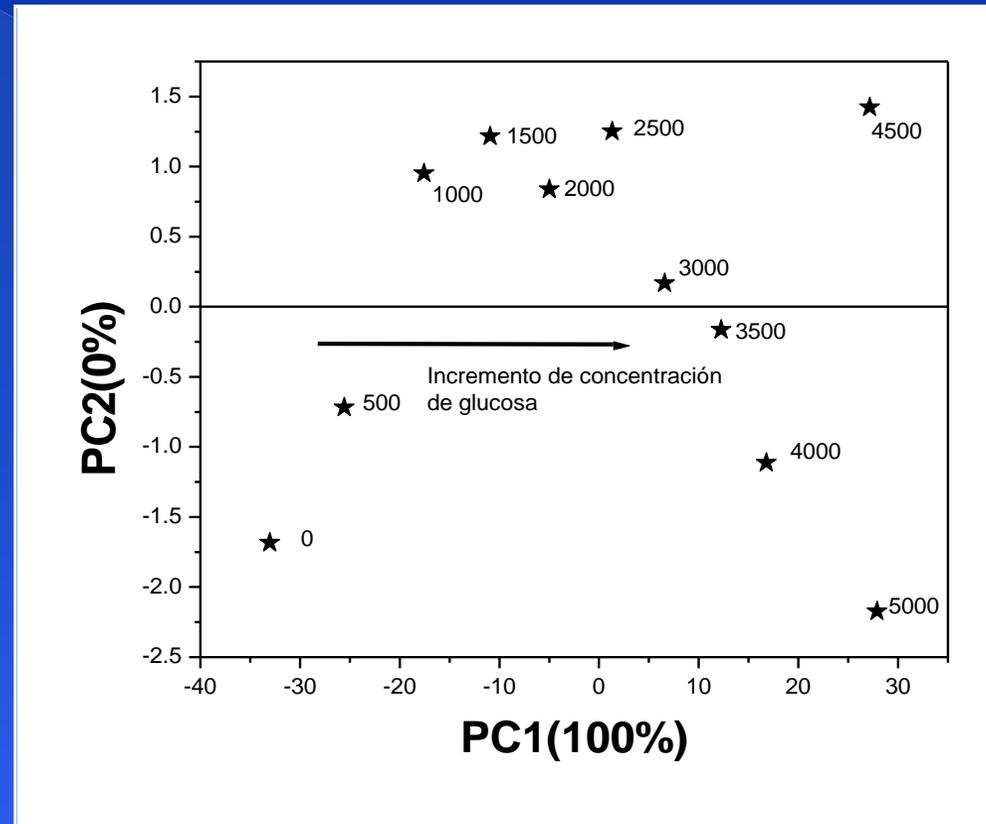


Figura 11. PC1 contra PC2 para diferentes concentraciones de glucosa

RESULTADOS

RESULTADOS DE LA SEGUNDA ETAPA:

Se incremento la temperatura de un intralípido desde 30°C a 50°C, en intervalos de 2°C, como se aprecia en la figura 12, observamos que los cambios espectrales están relacionados con la temperatura.

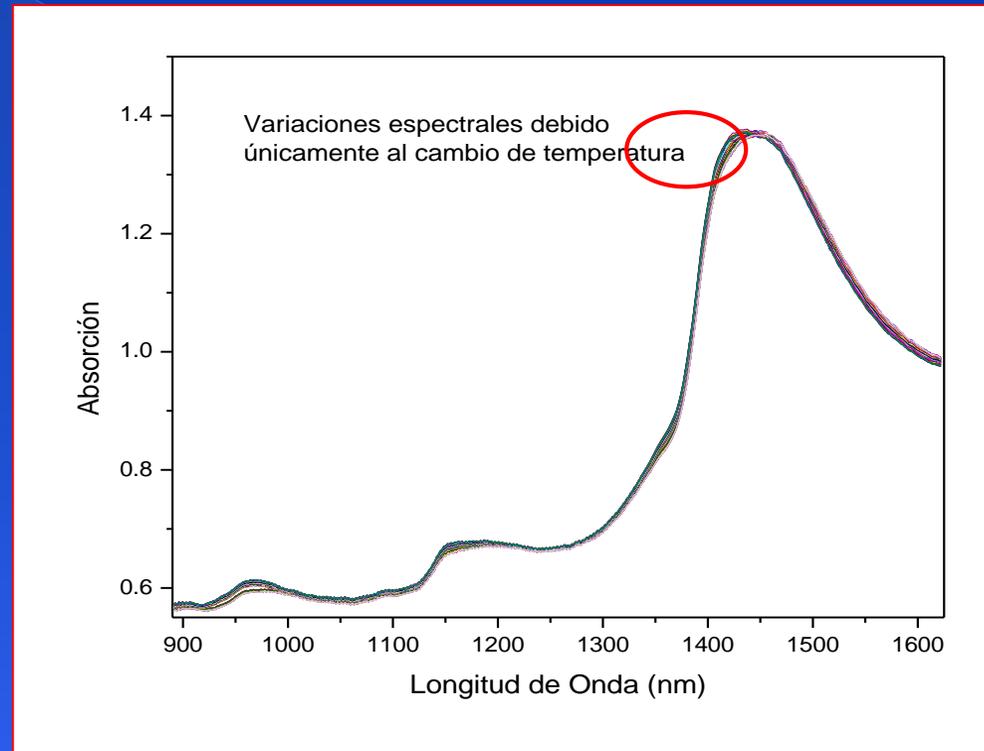


Figura 12. Espectros de absorción NIR de una solución de intralípido para diferentes temperaturas.

RESULTADOS DE LA SEGUNDA ETAPA

Relación de PC1 contra PC2, observamos que existe un cambio debido únicamente al cambio de temperatura, como muestra la figura 12.

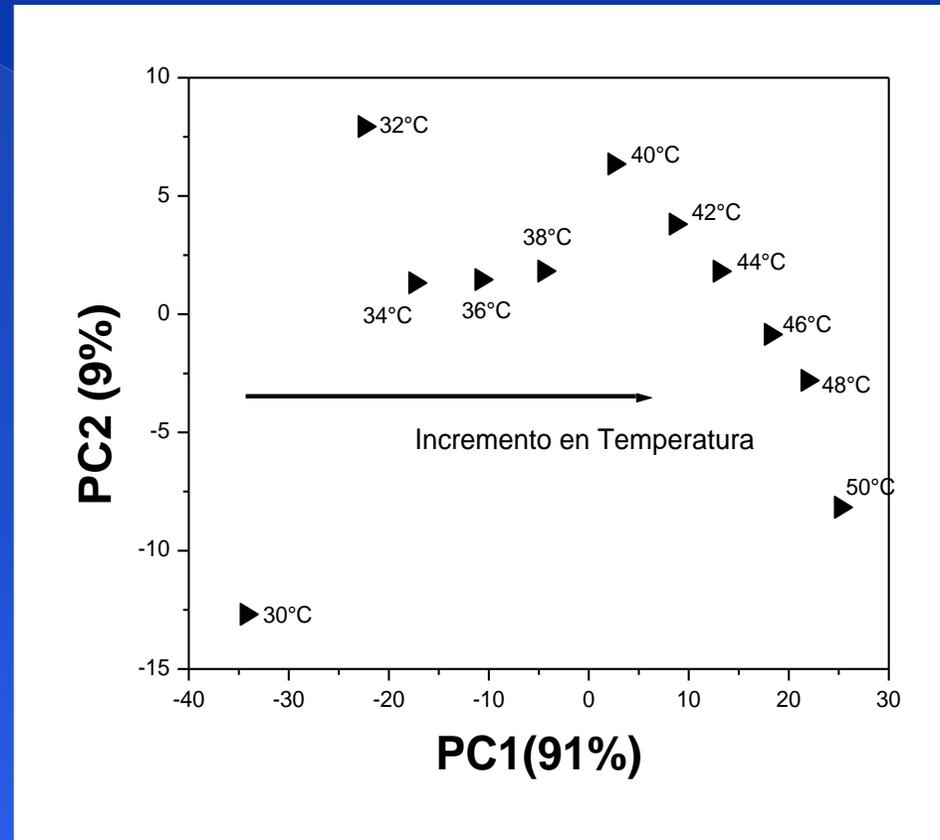


Figura 12. PC1 contra PC2 para cambios en temperatura

RESULTADOS DE LA SEGUNDA ETAPA

Espectros NIR, para identificar aquellas regiones en donde existe una importante variación de los espectros, debido al cambios en la concentración, como se aprecia en la figura 13.

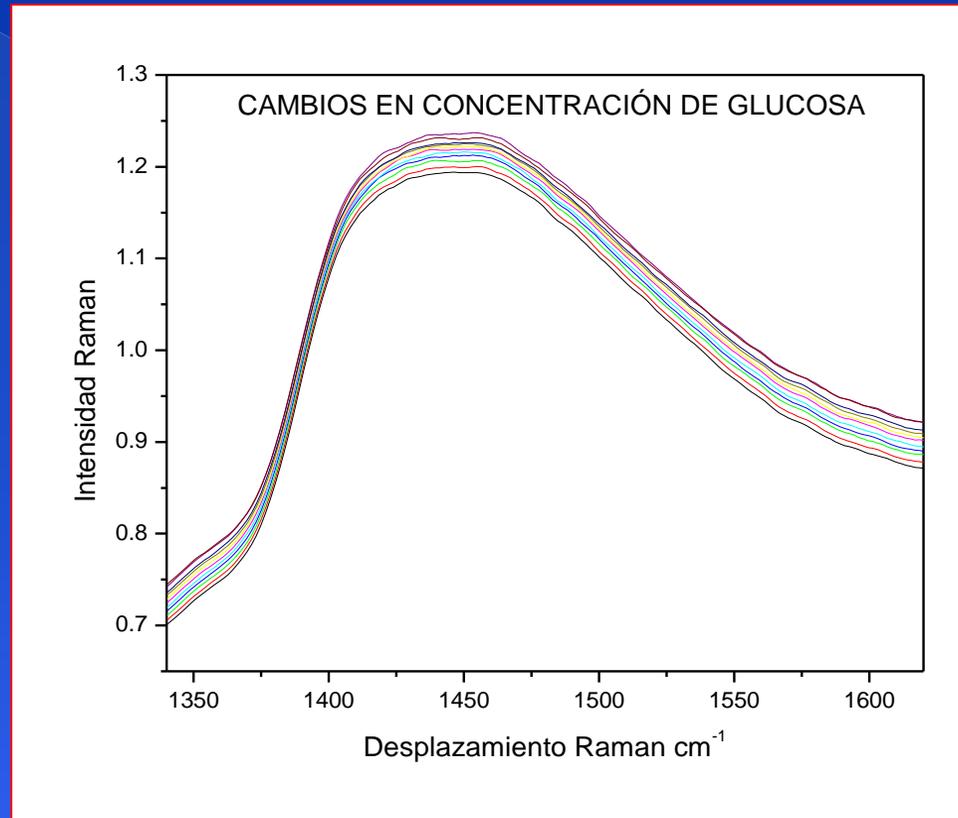


Figura 13. Espectros NIR y banda centrada en 1455nm para diferentes concentraciones de glucosa.

RESULTADOS DE LA SEGUNDA ETAPA

Existe una relación lineal entre la intensidad de absorbancia y la concentración de glucosa en el rango de 1455nm, como se aprecia en la figura 14.

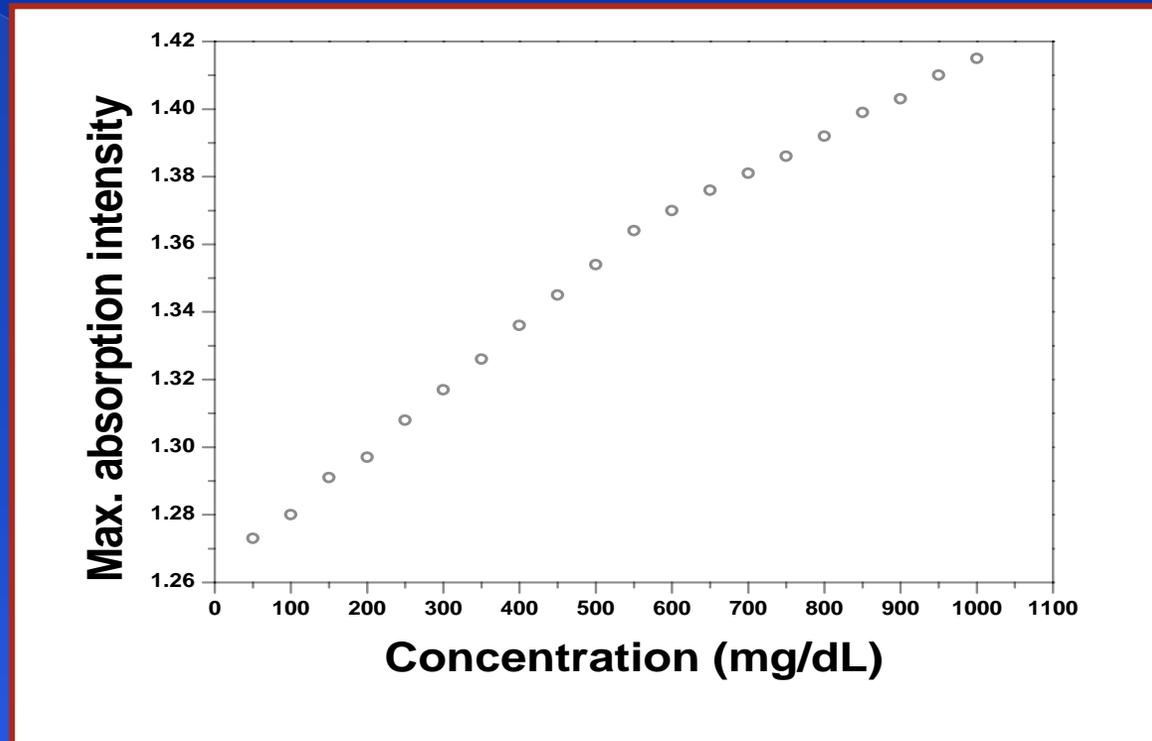


Figura 14. Relación entre la concentración de glucosa y la intensidad de absorbancia.

RESULTADOS DE LA TERCERA ETAPA

➤ A la concentración de 3500mg/dL, se le fue incrementando la temperatura hasta alcanzar los 50°C, en intervalos de 2°C, este procedimiento se realizó 4 veces, después la concentración de glucosa fue estimada para cada espectro, utilizando un modelo de predicción calibrado para una temperatura constante.

➤ La predicción de la concentración de glucosa fue estimada utilizando el modelo de predicción calibrado para diferentes concentraciones con temperatura constante.

➤ Obtenemos después los resultados de la predicción de la concentración de glucosa para diferentes temperaturas como se muestra en tabla 1.

RESULTADOS DE LA TERCERA ETAPA

Tabla 1 Resultados de la predicción de concentración de glucosa

Temperatura (°C)	Predicción de concentración (mg/dL)				Predicción promedio (mg/dL)
	Experimento	Experimento	Experimento	Experimento	
	1	2	3	4	
30	4919	5051	4955	4753	5011.33
32	5218	5170	5160	5623	5282.25
34	5338	5475	5097	5537	5366.25
36	5466	5542	5491	5619	5535.75
38	5543	5718	5374	5700	5589.25
40	6255	5796	5439	5892	5851.5
42	6017	5879	5442	5918	5825.75
44	6036	6034	5508	5919	5867.25
46	6170	5793	5532	5916	5585.75
48	6238	6123	5590	5924	5985
50	6422	6117	5771	5849	6007.5

RESULTADOS DE LA TERCERA ETAPA

Con los resultados obtenidos, de las predicciones de la concentración de glucosa para diferentes temperaturas, en base al modelo de predicción calibrado para una temperatura constante, proponemos las siguientes ecuaciones para determinar el error en la predicción de la concentración de glucosa.



$$\Delta T = T_{\text{fin}} - T_0$$

Donde T_0 es la temperatura original, T_{fin} es la temperatura final de la i -ésima medición, X_0 es el valor de la predicción de la concentración de glucosa en T_0 , X_i es el valor de predicción para la temperatura en T_{fin} , y “ n ” es el número de predicciones.

RESULTADOS DE LA TERCERA ETAPA

Una vez obtenidos los valores de la predicción, calculamos el "error" de predicción en la concentración de glucosa, debido a un incremento de la temperatura proponiendo la siguiente ecuación:


$$TErr_{1^{\circ}C} = \frac{1}{N} \sqrt{\sum (I_0C)^2}$$

Donde $TErr_{1^{\circ}C}$ es el error de predicción inducido por $1^{\circ}C$ en la concentración de glucosa, y N el número de experimentos realizados.

Con los resultados de los cálculos realizados, encontramos que hay un error $TErr_{1^{\circ}C}$ de 80.5mg/dL , por $1^{\circ}C$ en la predicción de la concentración de glucosa.

CONCLUSIONES PARA EL ERROR INDUCIDO EN CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA DEBIDO A CAMBIOS EN TEMPERATURA

- Con los resultados de los cambios espectrales debido a cambios en la temperatura, encontramos un r^2 de 0.99, por lo que podemos decir que están fuertemente relacionados solamente con los cambios en la temperatura.
- De forma similar, con los resultados obtenidos para los cambios en la concentración de glucosa, encontramos un r^2 de 0.90, lo cual nos indica que los cambios espectrales sí están fuertemente relacionados únicamente a los cambios en la concentración de glucosa.
- Se identifica que los resultados de los cambios en la concentración y los de temperatura, se daban con mayor intensidad en la banda centrada en los 1455nm.
- Encontramos también que el error en la predicción de la concentración de glucosa debido al incremento de la temperatura de 1°C es de 80.5mg/dL, por lo que podemos decir que la espectroscopia NIR es sensible a cambios en la temperatura.

The background of the slide is a microscopic image of E. faecalis bacteria. The bacteria are small, rod-shaped, and appear in various orientations and colors (green, yellow, blue) due to staining. They are densely packed in some areas and more sparse in others. On the left side of the slide, there is a vertical red decorative border with a repeating pattern of stylized, overlapping shapes.

ANÁLISIS DE BIOFILM
PRODUCIDO POR
LA BACTERIA *E. Faecalis*
UTILIZANDO
ESPECTROSCOPIA RAMAN

OBJETIVOS

Objetivos:

- ✓ **Determinar la factibilidad de la espectroscopía Raman para la detección del Biofilm formado por la bacteria *Enterococcus faecalis*.**
- ✓ **Encontrar los grupos funcionales producidos por el Biofilm utilizando Espectroscopia Raman.**

INTRODUCCION DEL BIOFILM:

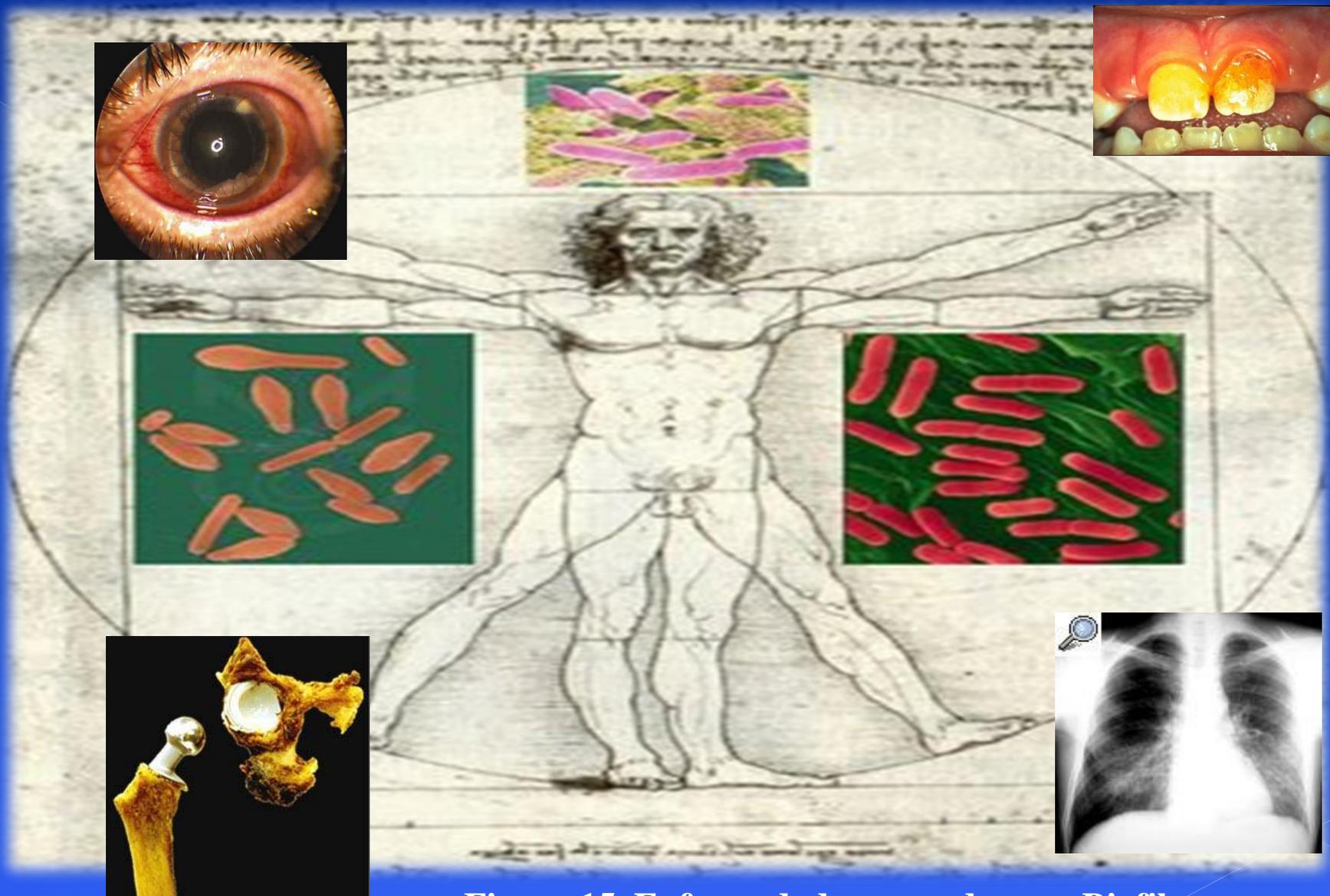


Figura 15. Enfermedades causadas por Biofilm

INTRODUCCION DEL BIOFILM:

El biofilm es una población de células que crecen unidas a una superficie envueltas en una matriz de exopolisacaridos que las protege del ataque de antibióticos, más del 60% de todas las infecciones microbianas son causadas por biofilms.

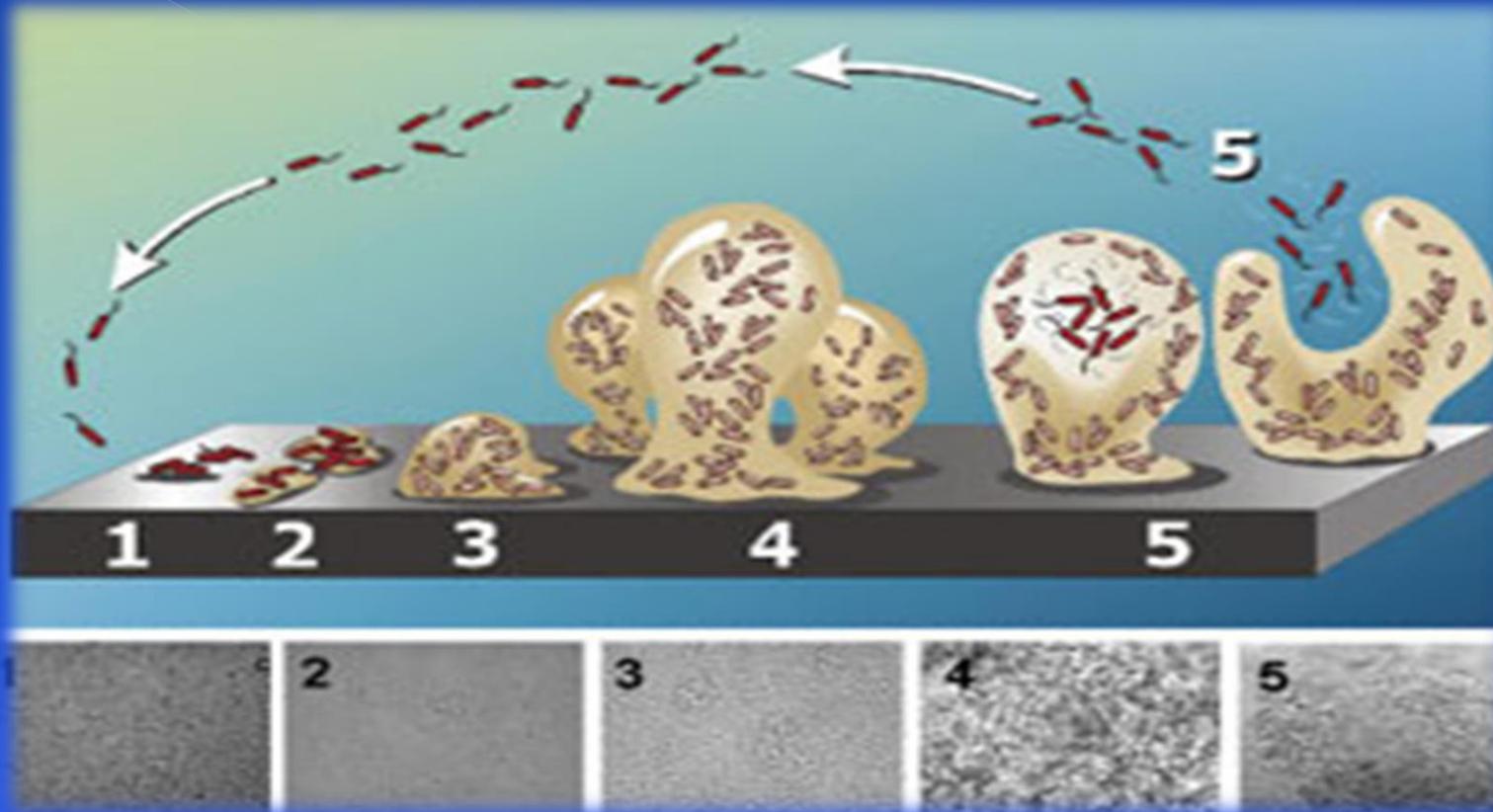


Fig. 16 Formación del Biofilm

INTRODUCCION DEL BIOFIM:

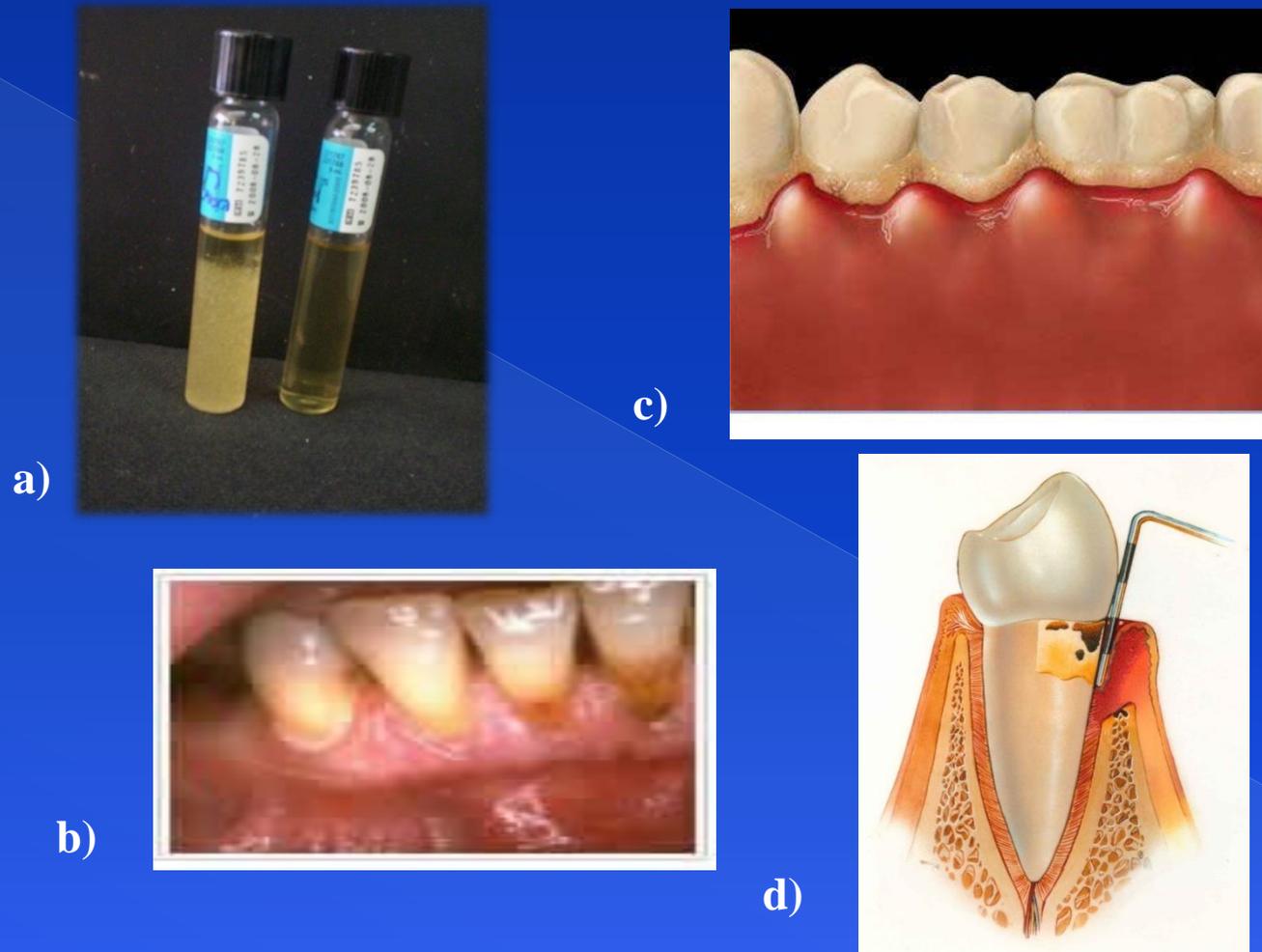
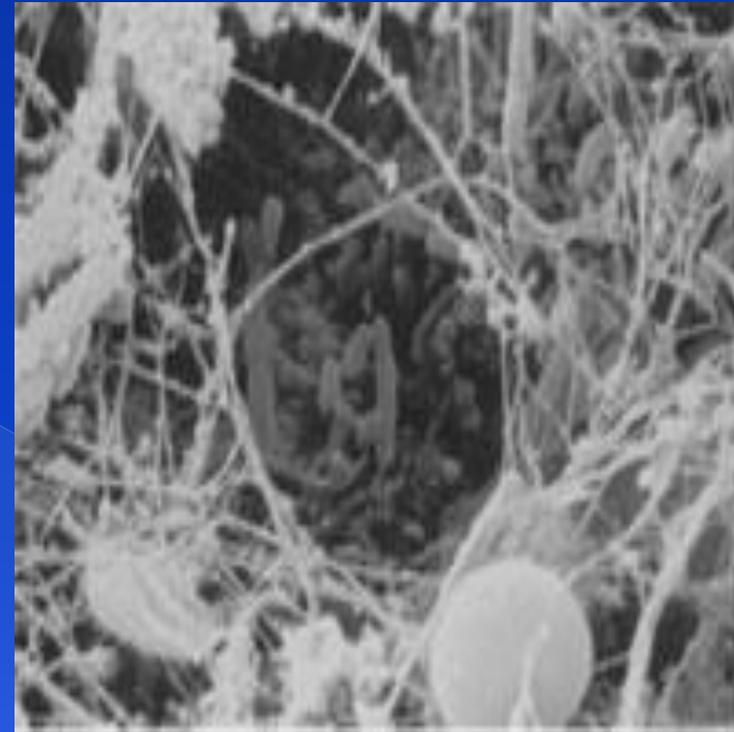


Figura 17. Formación del biofilm y sus problemas, a) Muestra de encía, b) Formación de biofilm, c) Gingivitis , d) Periodontitis.

INTRODUCCIÓN PARA BIOFILM:



a)



b)

Figura 18 a) Caso de periodontitis y b) Estructura del biofilm.

INTRODUCCIÓN PARA BIOFILM:



El hábitad natural de este microorganismo es el tracto gastrointestinal, puede ocasionar absceso abdominal, infección urinaria, endocarditis. También ha sido implicada en infecciones endodónticas, reportándose su presencia en un alto porcentaje en radiculares obturados, exhibiendo síntomas de periodontitis apical crónica, en endodoncia, la *E. faecalis* ha demostrado tener la habilidad de invadir túbulos dentinarios.

Figura 19. *E. faecalis*.

METODOLOGÍA PARA BIOFILM:

PARA BIOFILM:

Sistema de flujo continuo por goteo incubado en una cámara de anaerobiosis para simular el sistema de conductos, y observar el comportamiento de la bacteria sobre la dentina en condiciones in vitro.

Figura 20. Arreglo de sistema de flujo sobre los discos de dentina.



METODOLOGÍA PARA BIOFILM:

PARA BIOFILM:

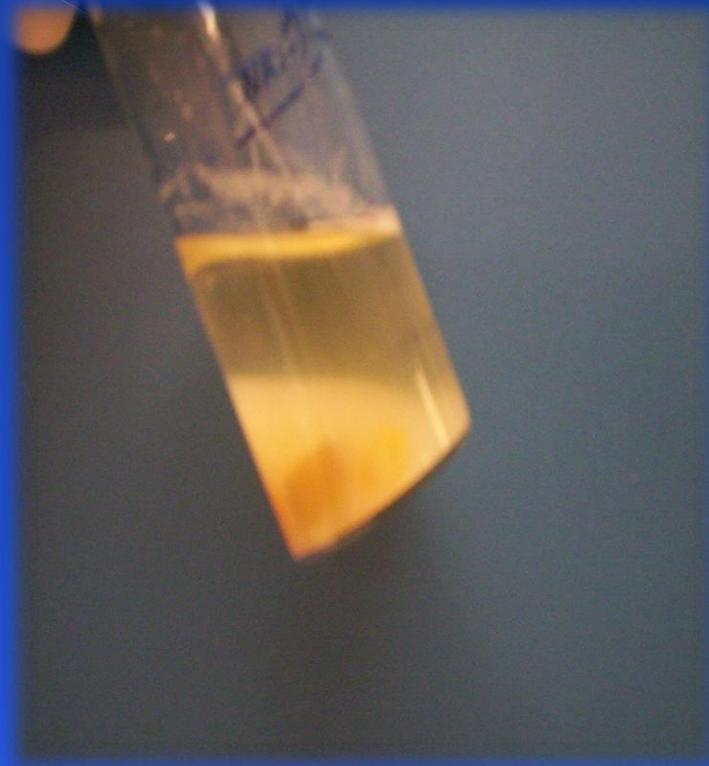


Figura 21. Biofilm de *E. Faecalis*



Figura 22. Medición del Biofilm con Raman

RESULTADOS DE BIOFILM:

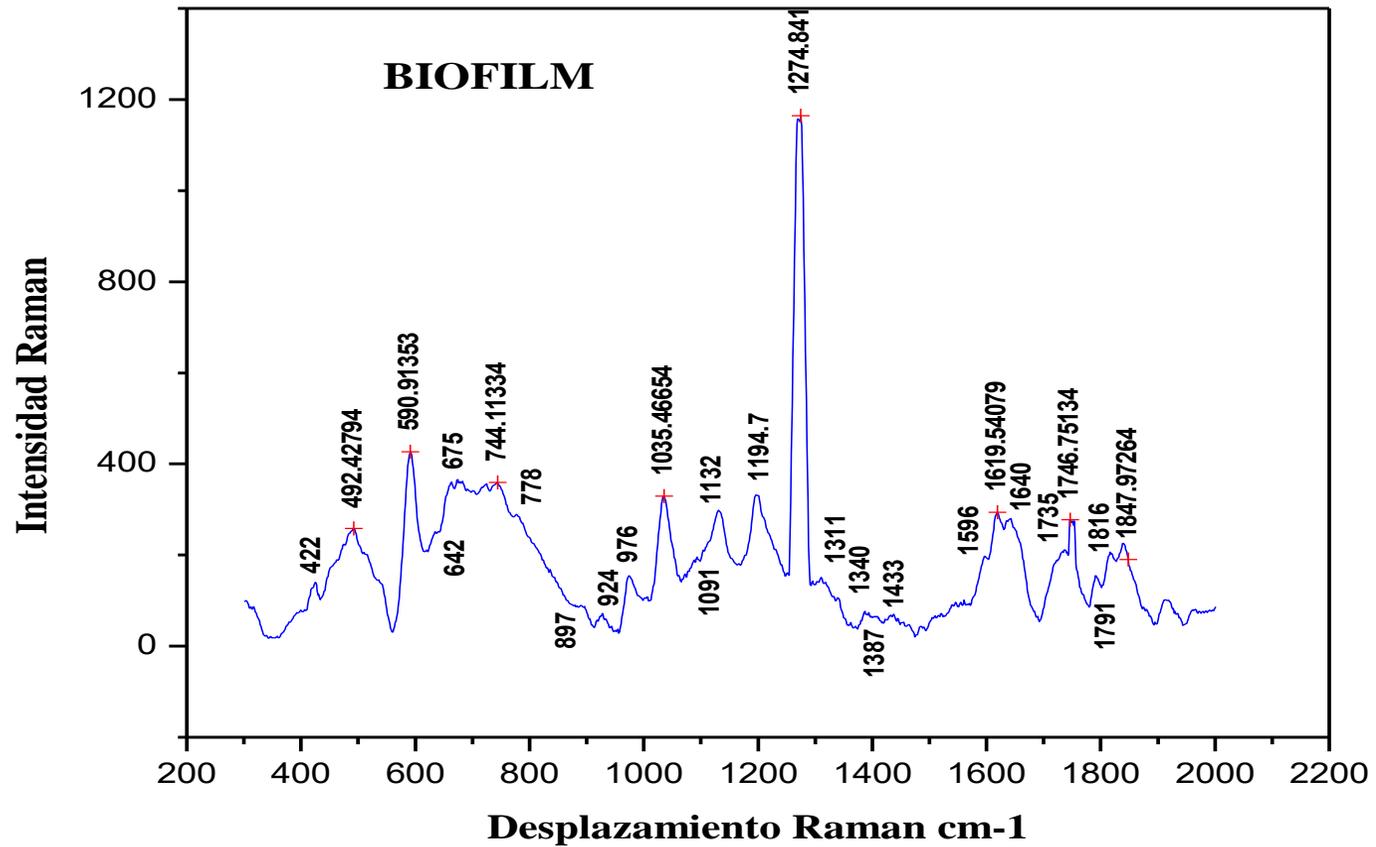
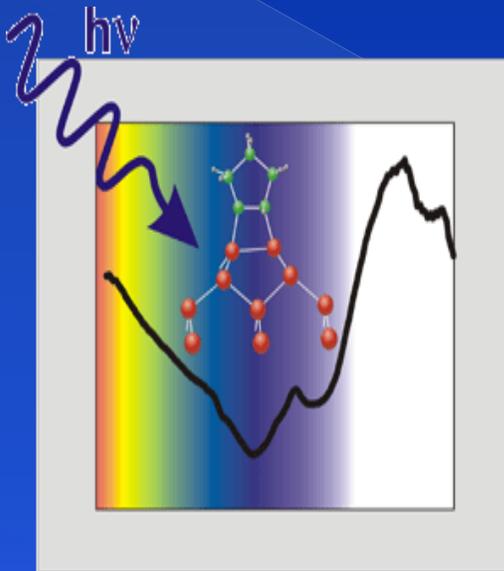


Figura 23. Espectro Raman del Biofilm de *E. faecalis*

RESULTADOS DE BIOFILM:

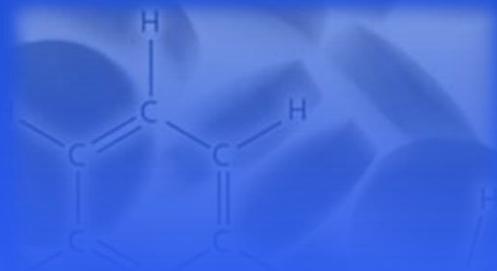
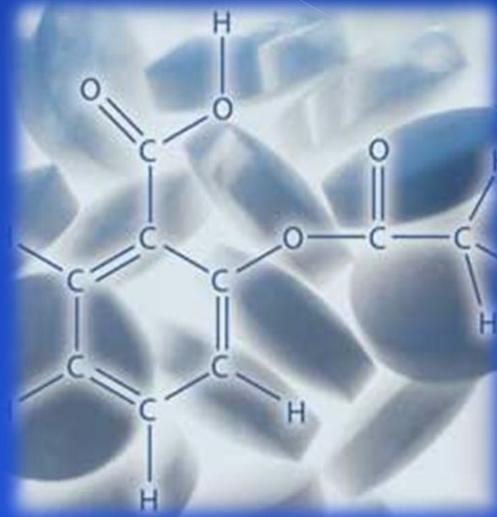
Tabla 2 Asignaciones Raman para Biofilm



FRECUENCIAS RAMAN cm ⁻¹	ASIGNACIONES	REFERENCIAS
422, 492, 541	C-C-O, C-C-C	Oliveira Luis, FT-Raman spectroscopy
541	En 540cm ⁻¹ esta C2- C(1)- O1	Oliveira Luis, FT-Raman spectroscopy
590,744	Grupo NH y NH ₂	Colthup, Introduction to IR and Raman
642, 675,897, 976	Movimiento CH o (hidrocarburos)	Colthup, Introduction to IR and Raman
778	Movimiento CH aromáticos, citosina, uracilo	Colthup, Introduction to IR and Raman
924	C-O ,C-C-H, C-C, específico a la banda de fructosa	Oliveira Luis, FT-Raman spectroscopy

RESULTADOS DE BIOFILM:

BIOFILM:



FRECUENCIAS RAMAN cm ₋₁	ASIGNACIONES	REFERENCIAS
1035	P-O-grupo alquilo	Colthup, Introduction to IR and Raman
1901	C-C	Colthup, Introduction to IR and Raman
1132,1194	C-O	Colthup, Introduction to IR and Raman
1274	C(6)-OH Y C(1)-OH	Oliveira, FT- Raman spectroscopy of honey
1311,1340,1384, 1433	Grupos CH ₂	Oliveira, FT- Raman spectroscopy of honey
1596, 1619	C=C, C=N, guaninas	Colthup, Introduction to IR and Raman
1640	C=C, C=N	Colthup, Introduction to IR and Raman
1735	C=O específico	Colthup

RESULTADOS DE BIOFILM:

✓El espectro Raman del polisacárido de *E. faecalis*, presente en 422cm^{-1} y 514cm^{-1} contribuciones de C-C-O y C-C-C[18], correspondientes a señales de carbohidratos.

✓En 744cm^{-1} y 778cm^{-1} corresponde a movimientos aromáticos, que corresponderían en conjunto a la presencia de ADN y RNA propio de la bacteria[19].

✓ 924cm^{-1} C-C-H, C-C, C-C-O banda característica a fructosa cristalina[18].

✓En 1274cm^{-1} corresponde a una banda de glucosa[27].

✓En 1735cm^{-1} se le asigna un grupo C=O, específico de las aldosas como la glucosa, y en 1791cm^{-1} , componentes carbonilos específicos de las hexosas[28].

RESULTADOS DEL BIOFILM DE *E. faecalis*

Se observa la superficie dentinaria cubierta en su totalidad por el biofilm con presencia de formas celulares listas para migrar y colonizar nuevas superficies. De igual manera se ve una estructura tridimensional a manera de cristales que semejan las estructuras cristalinas observadas en el microscopio estereoscópico.

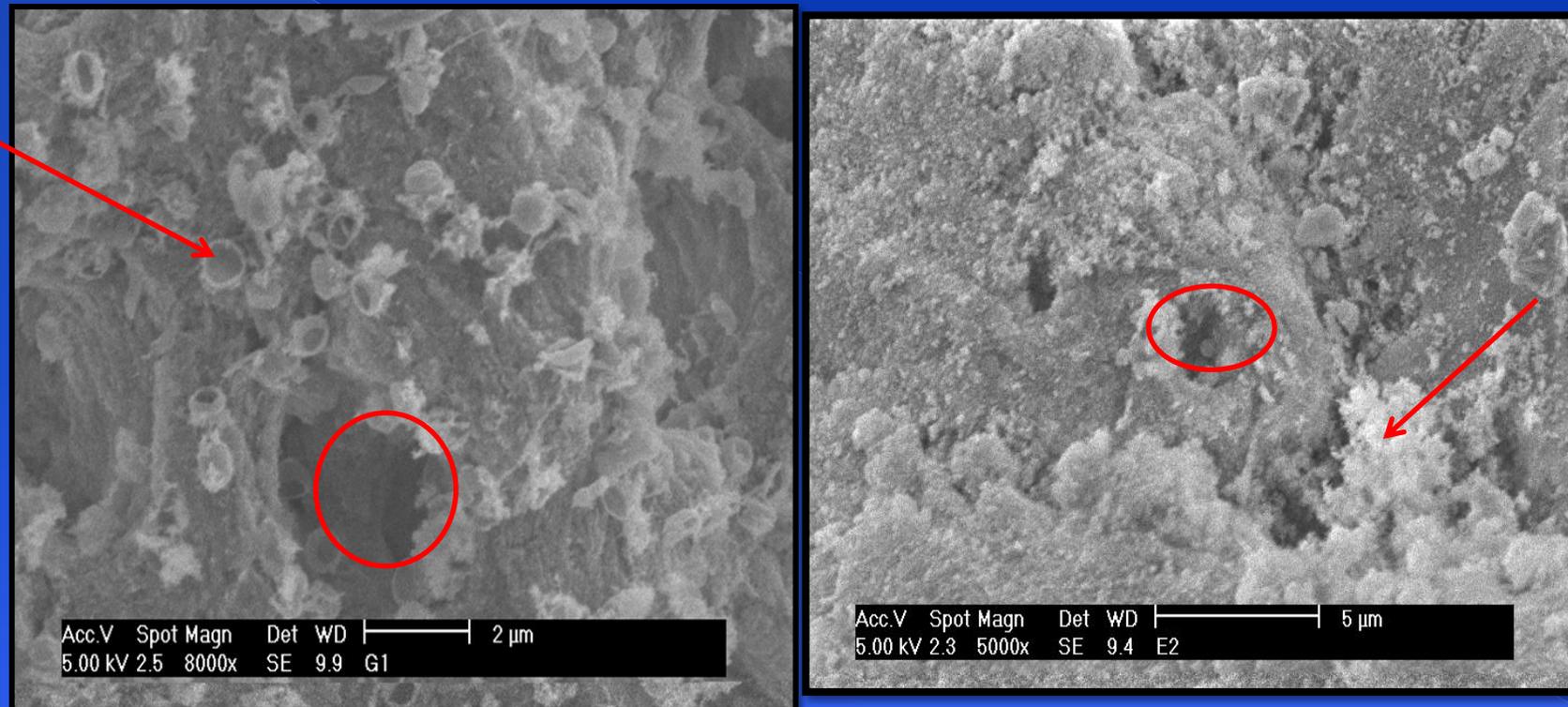


Fig. 24. MEB del Biofilm formado en superficie dentinaria.

CONCLUSIONES:

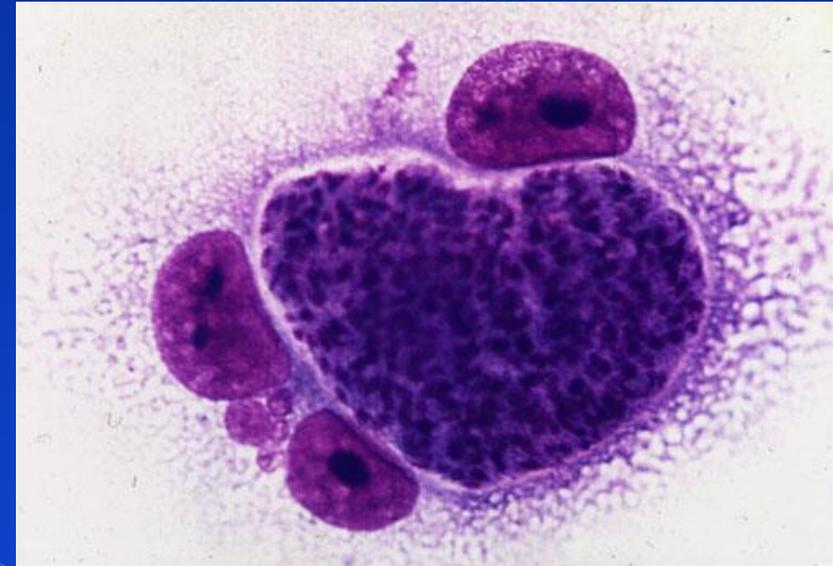
- Podemos decir que la espectroscopia Raman es una técnica alternativa para la detección de la bacteria *E. coli*, y con el análisis de PCA se identificaron diferencias entre las cepas, así como la identificación de los grupos funcionales de el biofilm formado por la bacteria *E. faecalis*.
- Los resultados nos indican que la mayor intensidad se da en los desplazamientos que corresponden grupos aromáticos, amidas y C=C y movimientos CH₂, para las diferentes cepas de *E. coli*.
- Las asignaciones encontradas para la matriz del Biofilm formado por la bacteria *E. faecalis* corresponden a los grupos funcionales de los azúcares como se esperaba, en especial en 1274cm⁻¹ correspondiente al grupo funcional de la glucosa, así como la presencia de citocina y uracil en 778cm⁻¹ indicadores de la presencia de ADN propio de la bacteria, y en 924cm⁻¹ C-C-, CH, C-C-O, característico de la fructosa.

ANTECEDENTES

**USO DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN Y
ANÁLISIS MULTIVARIANTE PARA LA
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS
ESPECIFICOS
AL TOXOPLASMA GONDII**

APLICACIÓN DEL ANTICUERPO DE TOXOPLASMA GONDII:

La toxoplasmosis es una parasitosis transmitida principalmente por los gatos, es asintomática, sin embargo, en las mujeres embarazadas pueden provocar aborto, o que el bebe tenga malformaciones congénitas, ceguera, hidrocefalia, o daño cerebral. Sin embargo, nuestro organismo cuenta con anticuerpos (Acs) cuya función es identificar sustancias extrañas y microorganismos que invaden nuestro cuerpo, así contamos con 5 clases de inmunoglobulinas(Igs): IgM, IgD, IgA, IgG e IgE. Actualmente para detectar estos anticuerpos existen pruebas serológicas, sin embargo existen técnicas como la espectroscopia Raman que se utiliza para caracterizar tumores, proteínas y anticuerpos en soluciones acuosas[6].



TOXOPLASMA GONDII:

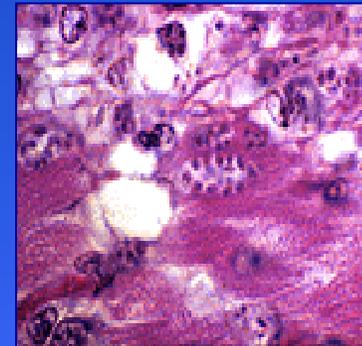
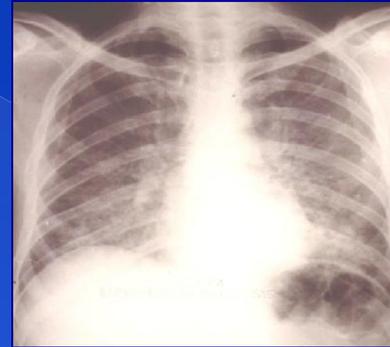
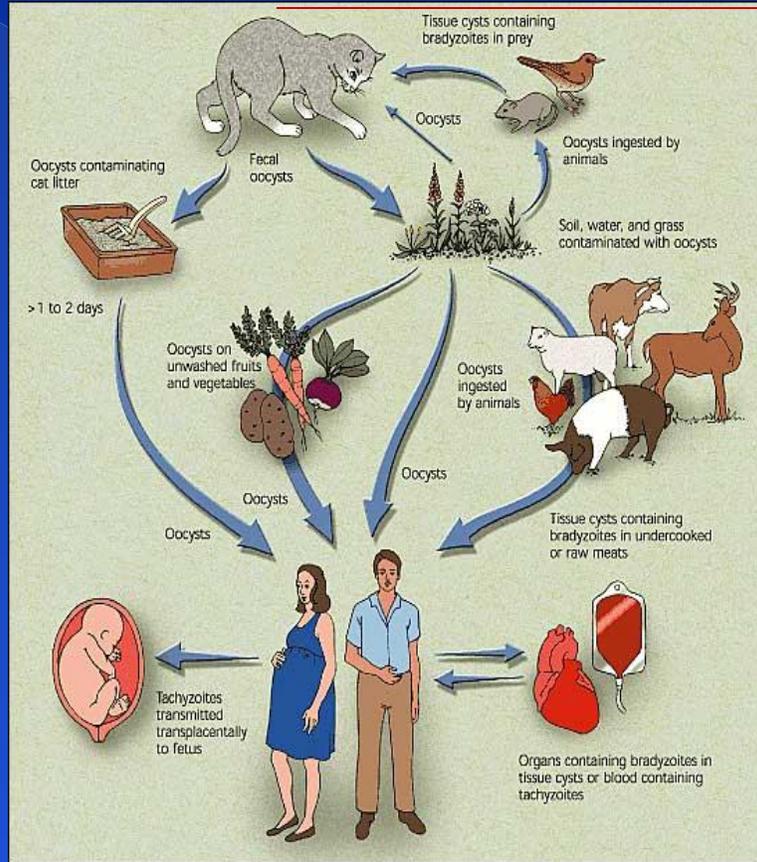


Figura 25. Consecuencias de la toxoplasmosis

METODOLOGIA

Se tomaron como voluntarias 182 mujeres embarazadas del Hospital materno Infantil y del hospital Regional del área de Ginecología de la Cd. De León Gto. México

Se realizaron pruebas de ELISA y de Raman de las mismas muestras de suero Sanguíneo. De los 182 espectros, 107 espectros fueron muestras negativas y 75 resultaron positivas al toxoplasma Gondii.

No existen pruebas clínicas que detecten el parásito en sangre, existen sin embargo, pruebas capaces de detectar los anticuerpos que nuestro organismo genera para combatir el parásito, en la figura 5 se muestra el equipo utilizado para la prueba serológica ELISA, para detectar anticuerpos IgG e IgM.



Fig. 26. Prueba serológica ELISA

RESULTADOS :

Los siguientes espectros que se muestran en las figuras 27a y 27b fueron tomados para las muestras de suero sanguíneo, donde la primer grafica representa los datos originales y la segunda los mismos datos, pero después de haberles aplicado la 1ª derivada.

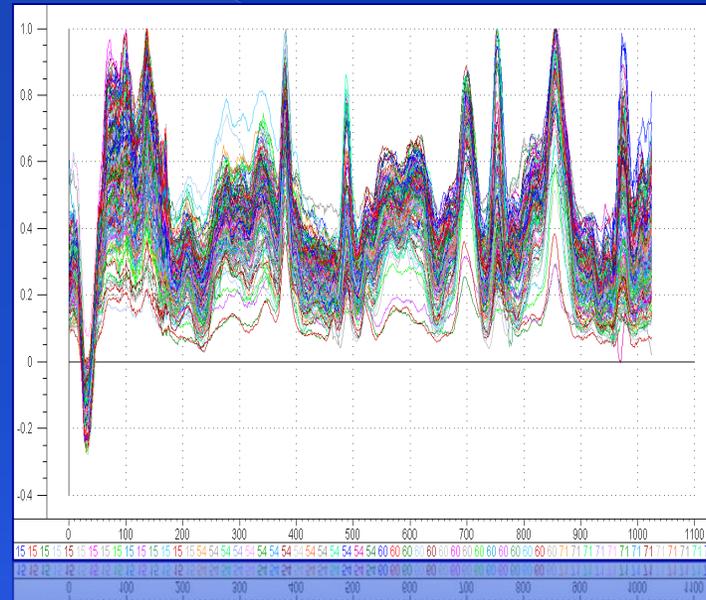


Fig. 27a Espectros Originales

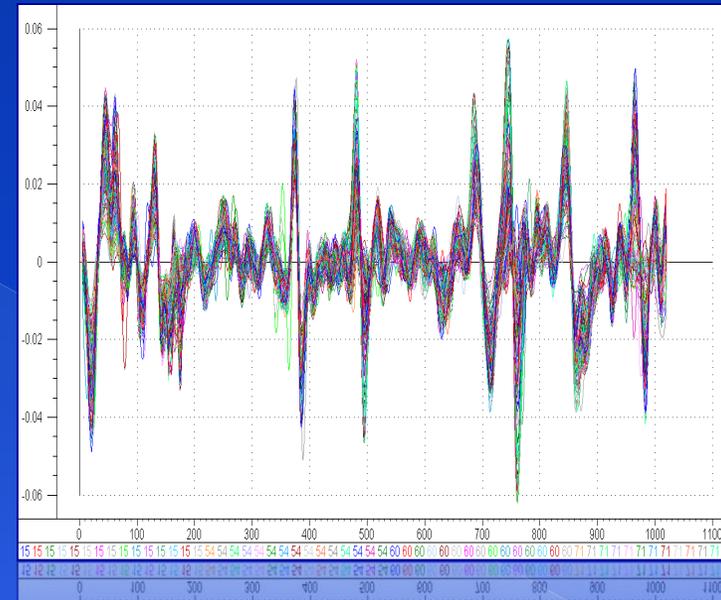


Fig. 27b Primera Derivada de los espectros originales

RESULTADOS

La diferencia más importante entre las muestras positivas y negativas se relaciona con los cambios en la intensidad Raman, ya que no hay bandas adicionales o desplazamientos diferentes entre muestras positivas y negativas. En las figura 28 y 29 se muestra el promedio de los espectros Raman, y las desviaciones estándar de las muestras positivas y negativas, respectivamente.

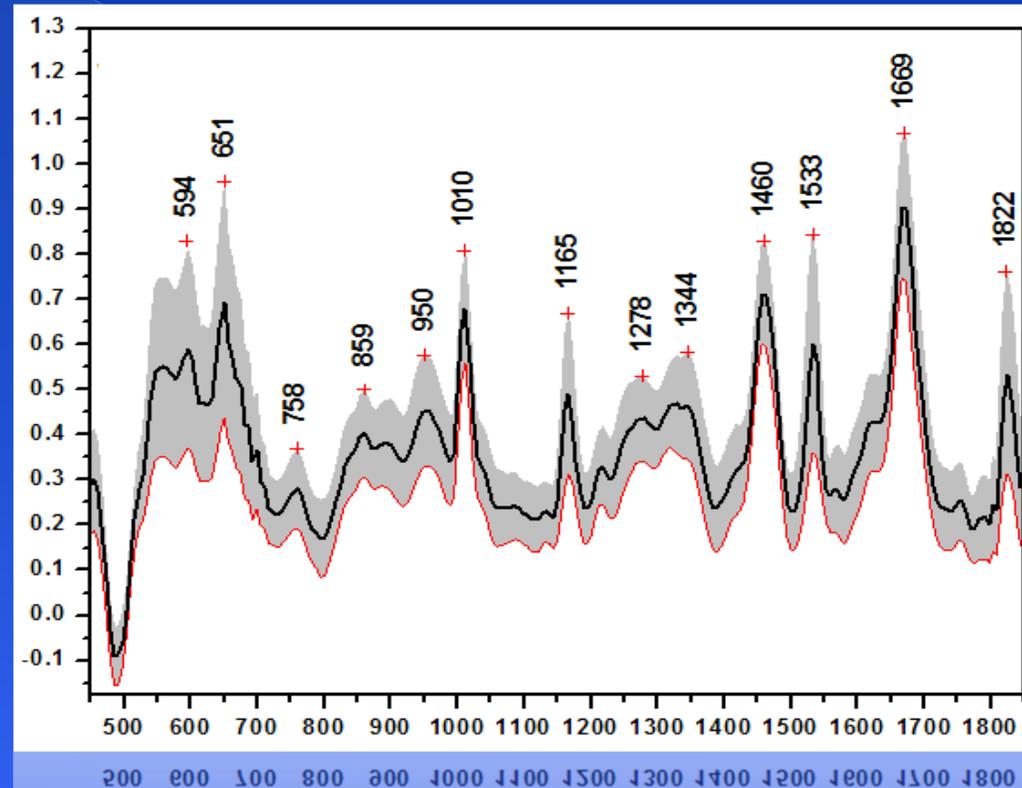


Figura 28. Espectro promedio de los resultados positivos al toxoplasma Gondii

RESULTADOS

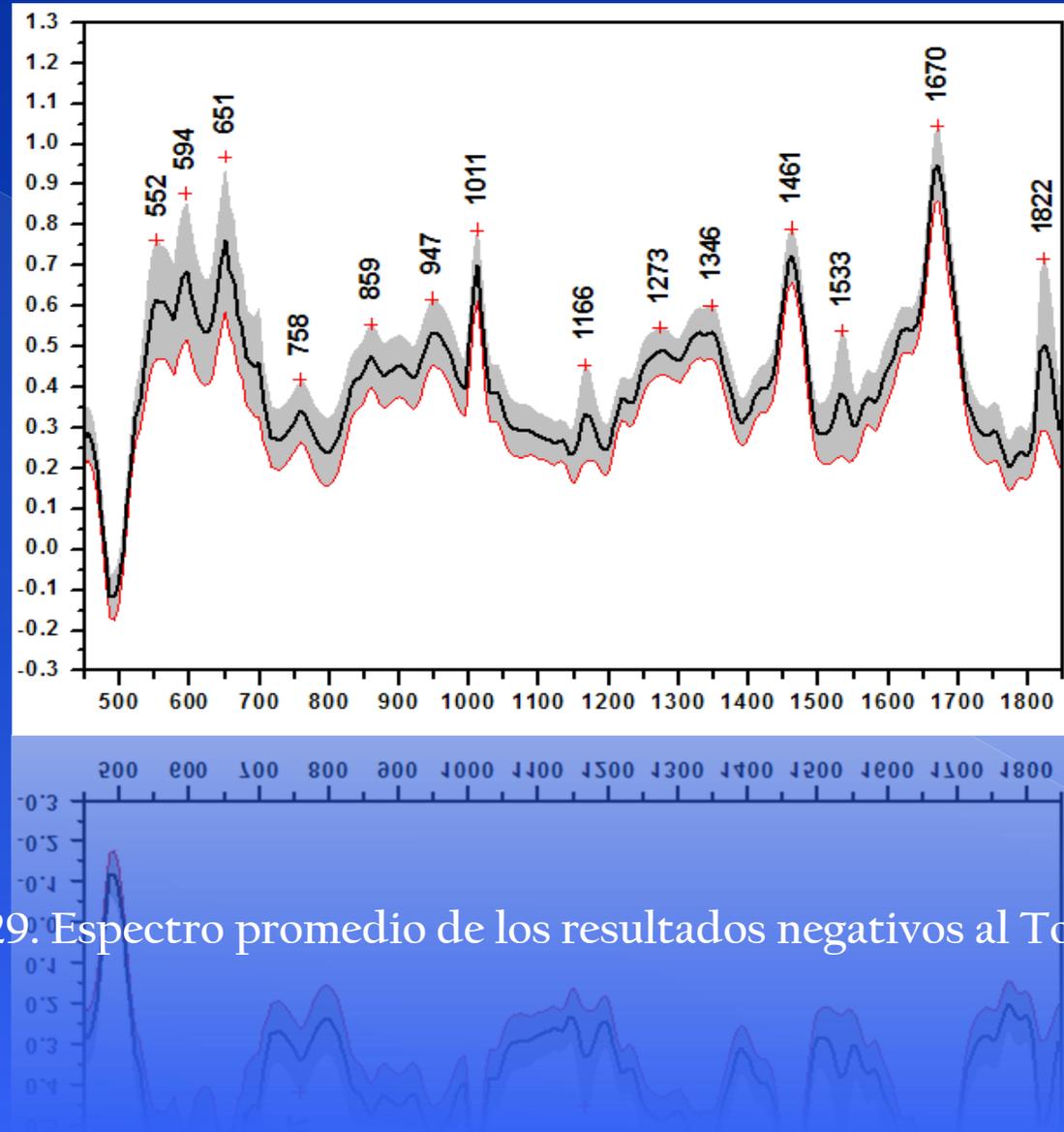


Figura 29. Espectro promedio de los resultados negativos al *Toxoplasma Gondii*

RESULTADOS

En la figura 30 se muestran los resultados de la segunda derivada para PC1 & PC2, y PC1 & PC3, y se muestra la discriminación entre muestras.

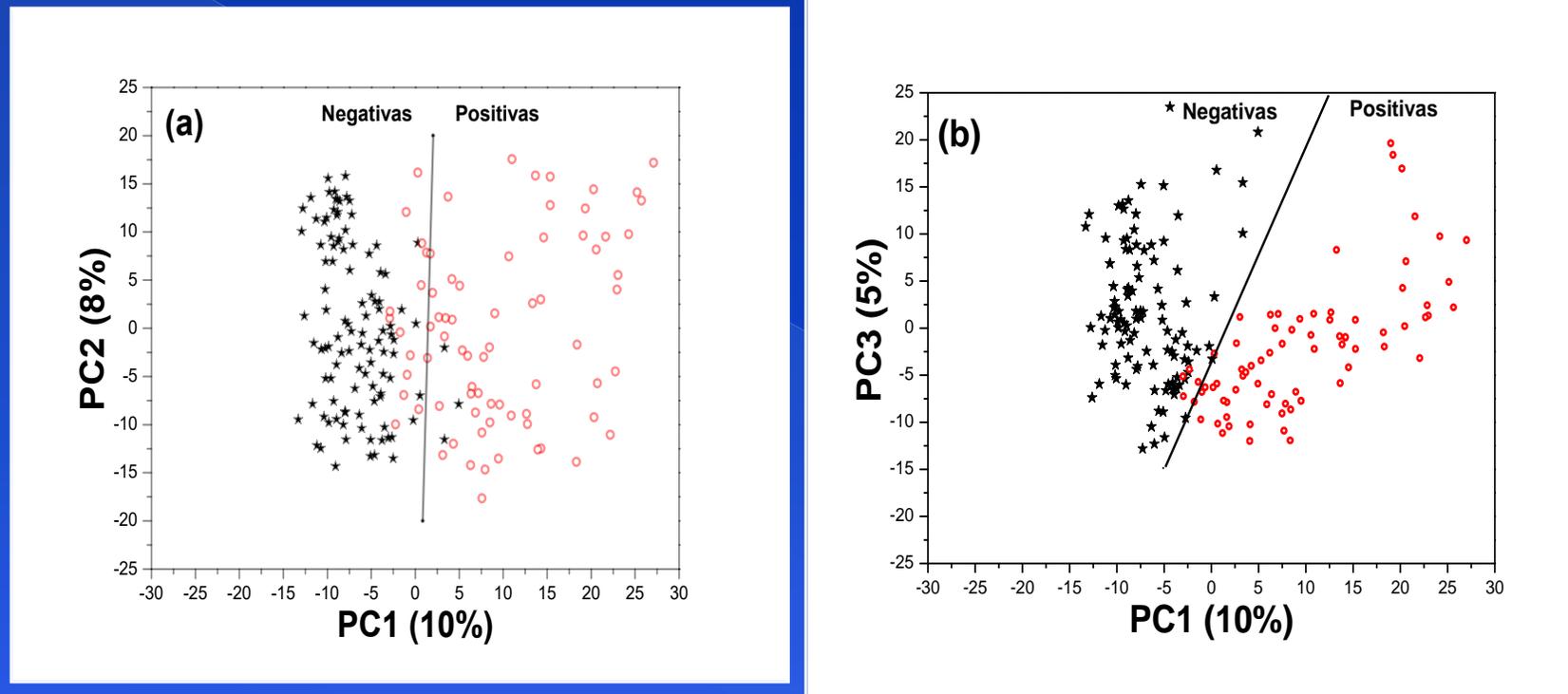


Figura 30. Análisis de componentes principales de los espectros de suero Con la presencia y ausencia del anticuerpo al *T. Gondii*.

RESULTADOS

$$Sensibilidad = \left(\frac{T_{(P)}}{F_{(N)} + T_{(P)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$Especificidad = \left(\frac{T_{(N)}}{F_{(P)} + T_{(N)}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos del análisis de componentes principales se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Valores experimentales de sensibilidad y especificidad de los PC's

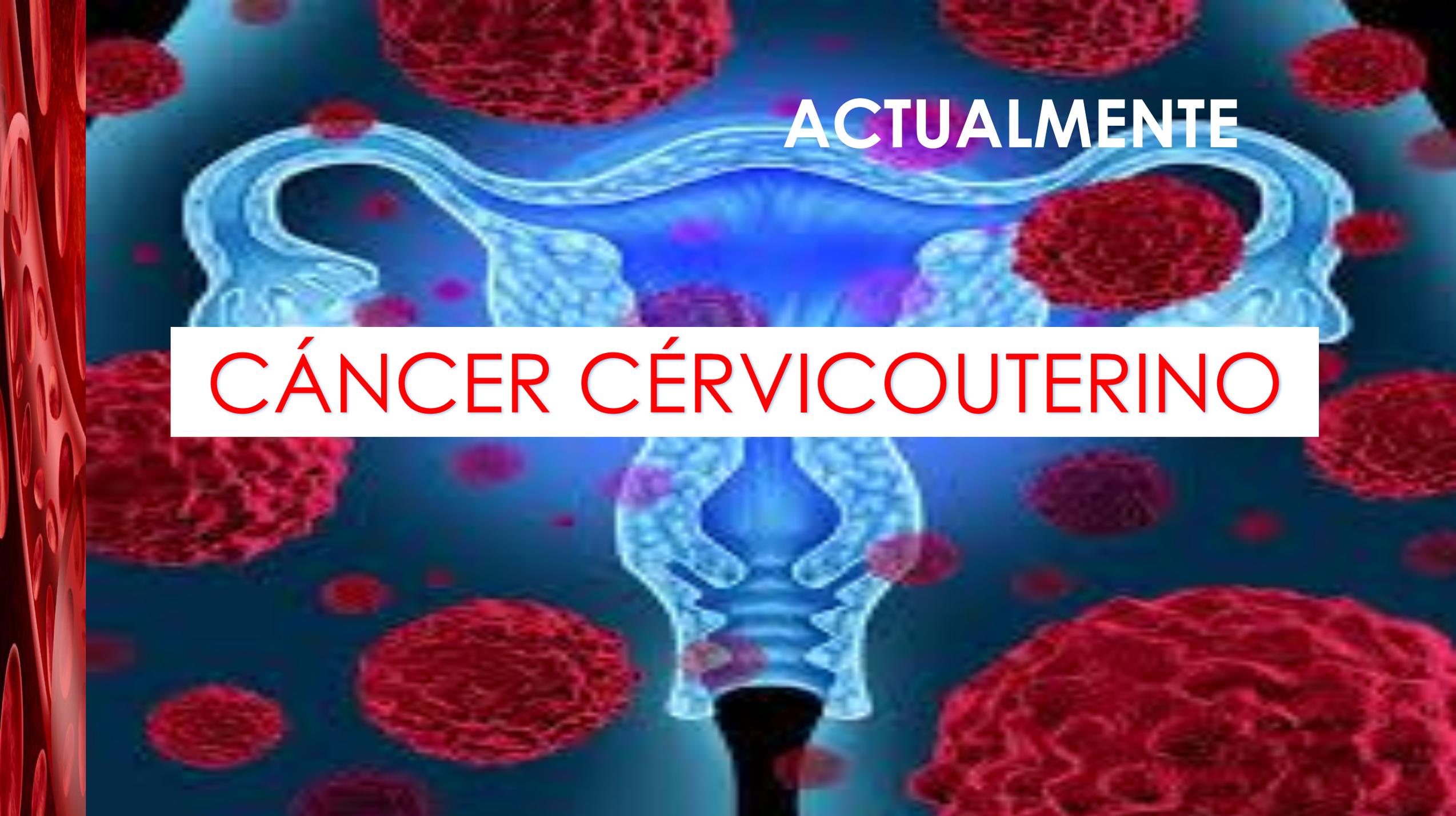
Scores	Sensitividad(%)	Especificidad(%)
PC1&PC2	84	97
PC1&PC3	95	98
PC1&PC4	78	98
PC1&PC5	85	99

RESULTADOS:

Tabla 4. Asignación de desplazamientos

En la siguiente tabulación se muestran algunos desplazamientos Raman que están relacionados con grupos funcionales, como pirimida, y amidas.

Desplazamiento Raman (cm^{-1})	Asignación
713 (650-730)	Hidrocarburos
851 (789-861)	Proteínas de ácidos nucleicos
1037 (100-1300)	C - C
1154 (1140-1300)	P=O
1174 (1162-1184)	Typ, Phe, Ácidos amino aromáticos, C- C
1445 (1250-1500)	CH ₂ , CH ₃ , Betacaroteno, Pirimidina, Fosfolípidos
1548 (1500-1690)	Triazinas
1660 (1656-1690)	Amida I

An anatomical illustration of the female reproductive system, including the uterus, fallopian tubes, and ovaries, rendered in a light blue color. The background is a dark blue field filled with numerous red, irregular, and textured masses of varying sizes, representing cancerous growths or tumors. A white horizontal bar is positioned across the middle of the image, containing the text 'CÁNCER CÉRVICOUTERINO'. Above this bar, the word 'ACTUALMENTE' is written in white capital letters. On the far left edge, there is a vertical strip showing a close-up of pinkish-red, layered tissue, likely representing the cervix.

ACTUALMENTE

CÁNCER CÉRVICOUTERINO

INTRODUCCIÓN

Displasia: Alteración en volumen y forma de las células epiteliales escamosas del cuello uterino.

Neoplasia Interpitelial Cervical (NIC) se agrupa en tres categorías:

- NIC I: Displasia leve
- NIC II: Displasia moderada acentuada
- NIC III: Displasia severa a carcinoma

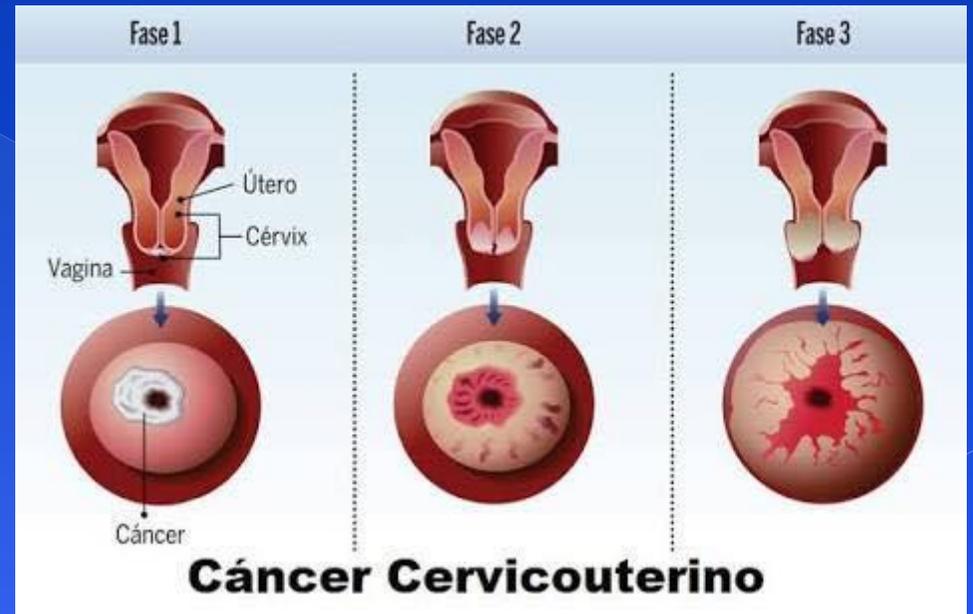
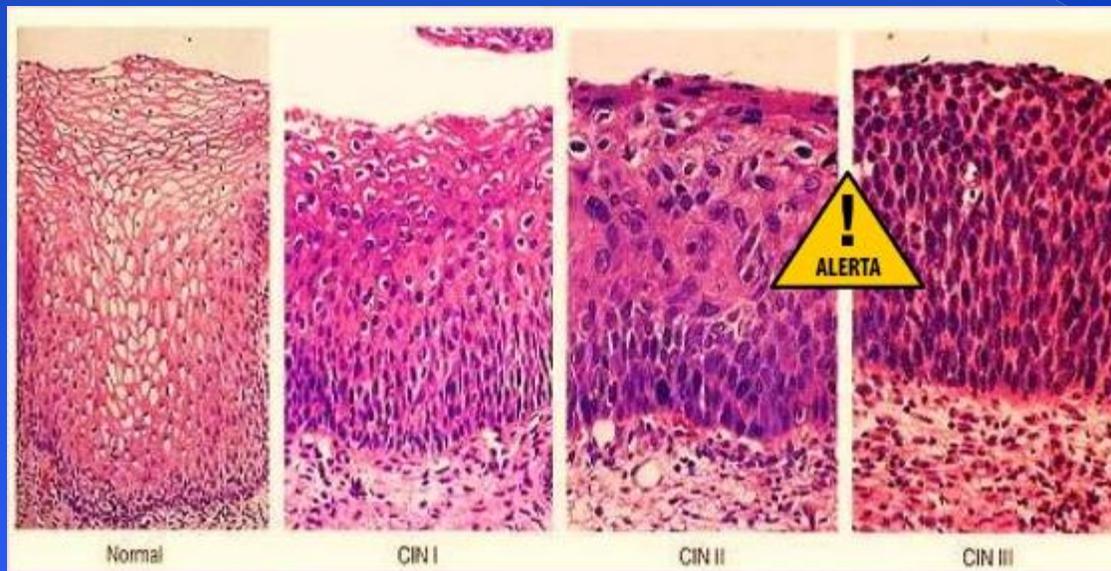


Figura 31. Citología cervical

INTRODUCCIÓN

En el 2018, más de 72,000 mujeres fueron diagnosticadas de cáncer cervicouterino y casi 34, 000 fallecieron por esta enfermedad .
Las tasas de mortalidad son 3 veces más altas en América Latina y el Caribe que en Norteamérica, evidenciando la desigualdad en salud. (OPS y OMS).

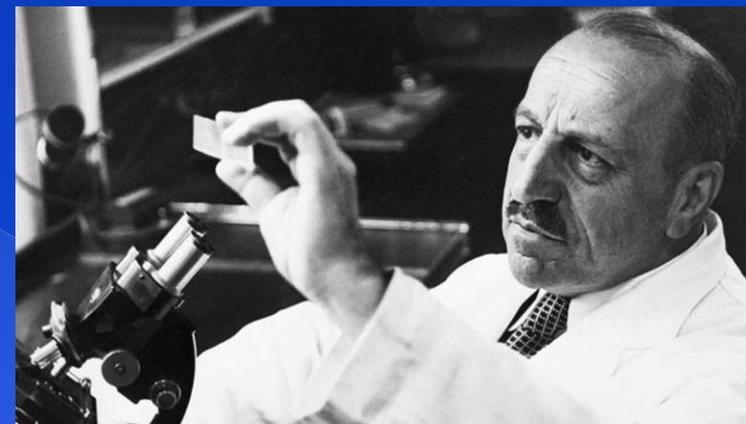
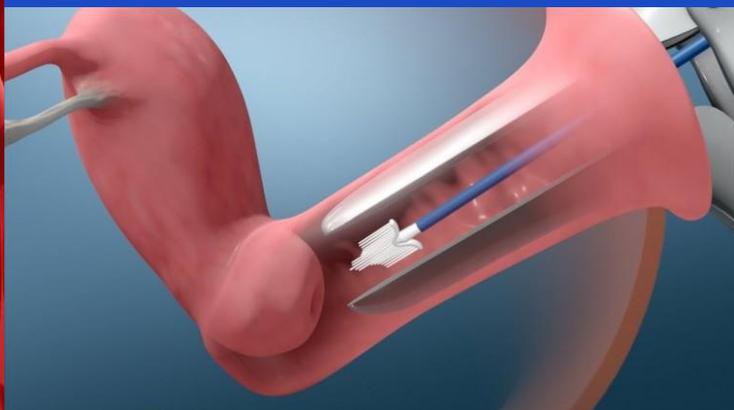


Figura 32. Proceso de la prueba de Papanicolaou

METODOLOGÍA

Las muestras fueron colectadas de 50 pacientes que acuden a la prueba de Papanicolaou Del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" de SLP.

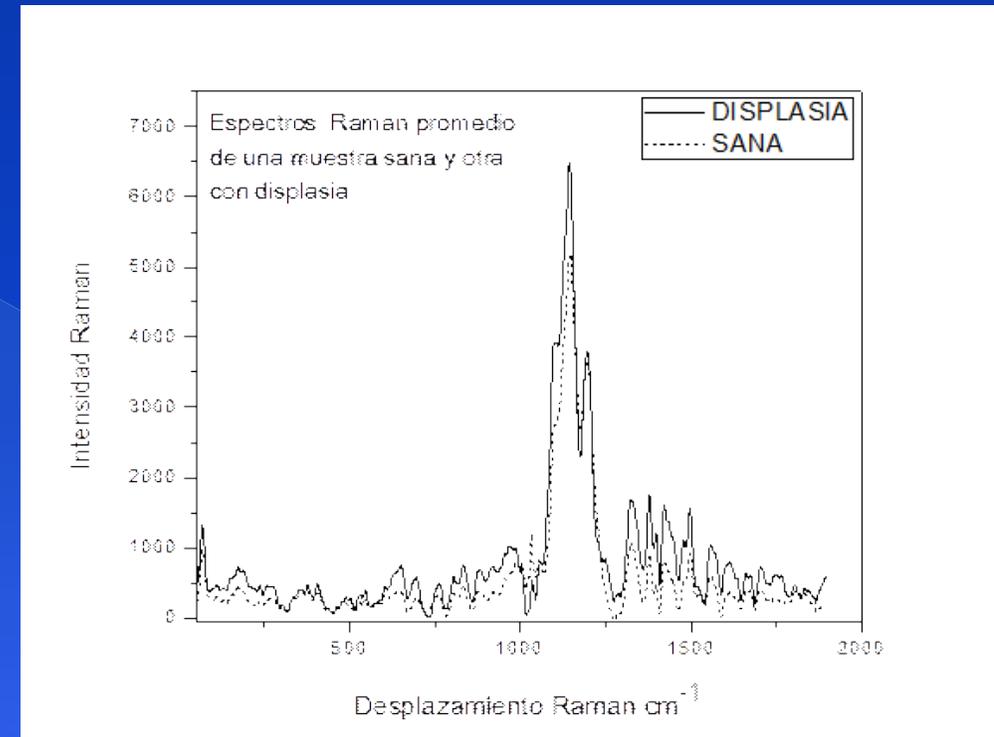


Figura 33.- Arreglo experimental de la medición con Raman

RESULTADOS

Tabla 5. Asignación de desplazamientos Raman.

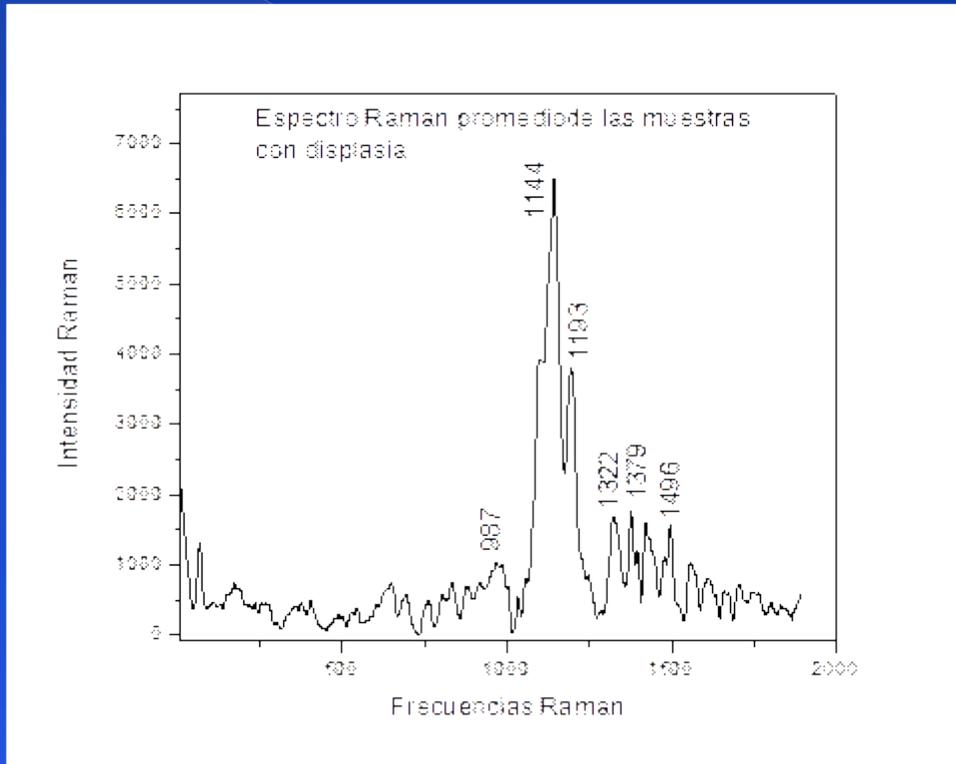


Figura 34. Espectro Raman de las muestras con Displasia.

FRECUENCIA RAMAN (cm ⁻¹)	GRUPO FUNCIONAL ASOCIADO A FRECUENCIA RAMAN	REFERENCIA
1144	C-O (1300-1000cm ⁻¹)	Norman B.Colthup, Introduction to Infrared and Raman spectroscopy, Academic Press, Inc. Tercera Edición.
1193	P-O (1100-830cm ⁻¹)	Norman B.Colthup,
1322	(1291-1324cm ⁻¹) Proteínas, lípidos, ácidos nucleicos	Kurt W.Short, Susan Carpenter, Raman spectroscopy detects biochemical changes, due to proliferation in mammalian cell cultures, Biophysical journal volume 88, 2005 4274-4288.
1379	(1325-1424cm ⁻¹) Proteínas, lípidos	Kurt W.Short, Susan Carpenter,
987	(900-500cm ⁻¹) OH, NH y NH ₂	Norman B.Colthup,

Estudio y caracterización del Tamiz Neonatal por medio de Espectroscopia Raman y análisis de Sangre

Nombre de la Madre _____
Fecha de nacimiento _____
Fecha de toma de muestra _____
Sexo F M _____
Peso _____

2748609

ANTECEDENTES

En México, como en el resto del mundo una de las prioridades en materia de salud pública es la prevención, diagnóstico oportuno y tratamiento para disminuir la tasa de morbilidad y mortalidad de la etapa prenatal, incluyendo la etapa neonatal [7]. En México, desde Septiembre de 1988 se creó un ordenamiento bajo la Norma Oficial Mexicana **NOM-034-SSA2-2013**, para prevención y control de los defectos de nacimiento, que lo hace obligatorio en la República Mexicana [8].



En México, para el 2017 se registraron 2,234,039 Nacimientos según datos del INEGI.

De los cuales 49,165 son nacimientos en el Estado de SLP. En el la cd. de Matehuala 1265 anuales [9].

TAMIZ NEONATAL



Figura 35. Toma de Tamizaje

La prueba de Tamiz neonatal consiste en obtener gotas de sangre, usualmente del talón o cordón umbilical, las cuales son colectadas en un papel filtro llamado tarjeta de Guthrie

El Tamiz Neonatal básico es una prueba que nos permite detectar algunas de las enfermedades de gran importancia en el desarrollo del infante como:

- ✓ Fenilcetonuria.
- ✓ Galactosemia.
- ✓ Problemas con la glándula Tiroides.



Figura 36. Manifestaciones clínicas de la galactosemia



Fenilcetonuria:
Problemas neurológicos.
Retraso en el desarrollo.
Microcefalia

ANTECEDENTES

Tabla 6. Frecuencia de las enfermedades congénitas

Enfermedad	Frecuencia
Hipotiroidismo congénito	1:2,500
Fenilcetonuria	1:18,000
Galactosemia	1:53,261
Homocistinuria	1:40,000 a 1:83,000
Tirosinemia	1:100,00 a 1:120,000
Orina de Jarabe de maple	< 1:100,000
Hiperplasia suprarrenal congénita	1:10,000 a 1:25,000



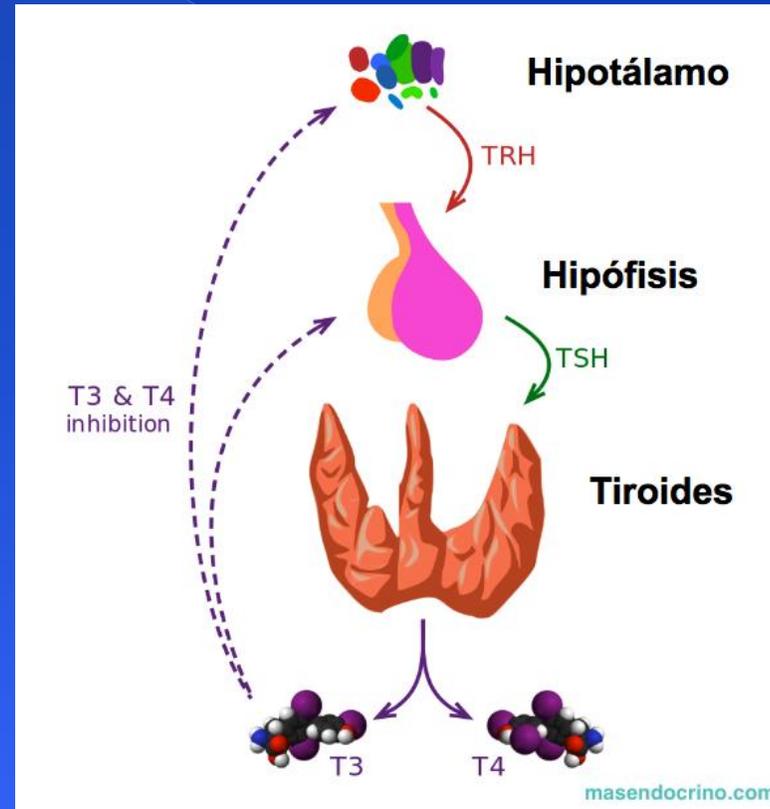
Figura 37. Recién nacido con hipotiroidismo

Sintomas de Hipotiroidismo:
Piel reseca, Hipotermia, constipación,
letargia, llanto ronco.

ANTECEDENTES



Las hormonas Tiroideas regulan el metabolismo y actividades del cuerpo:
Controlan la velocidad de los latidos de corazón.
Controlan la velocidad con la que se queman calorías.
Controla el movimiento del tubo digestivo.



TAMIZ NEONATAL

Objetivo:

Determinar la factibilidad de utilizar la Espectroscopia Raman como una técnica alterna Para la detección de TSH en las pruebas del Tamiz Neonatal.

Objetivos Específicos:

1. Recolectar muestras de sangre en tubos capilares del talón de neonatos con un rango de entre 3 y 5 días de nacido, en el Hospital General de Matehuala.
- 2.- Obtener los Espectros Raman de la TSH de referencia y de las muestras de suero sanguíneo, determinando si hay cambios espectrales.
3. Validar los resultados obtenidos con Espectroscopia Raman con el estándar de Oro.

METODOLOGÍA

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Química de la COARA, en colaboración con el Hospital General de Matehuala, en el módulo de salud reproductiva, previa la aprobación del comité de bioética del Hospital.



Figura 38. Hospital General de Matehuala



Figura 39. Edificio principal donde esta el Laboratorio del CA Tecnología y Salud.

Recién nacido

METODOLOGÍA

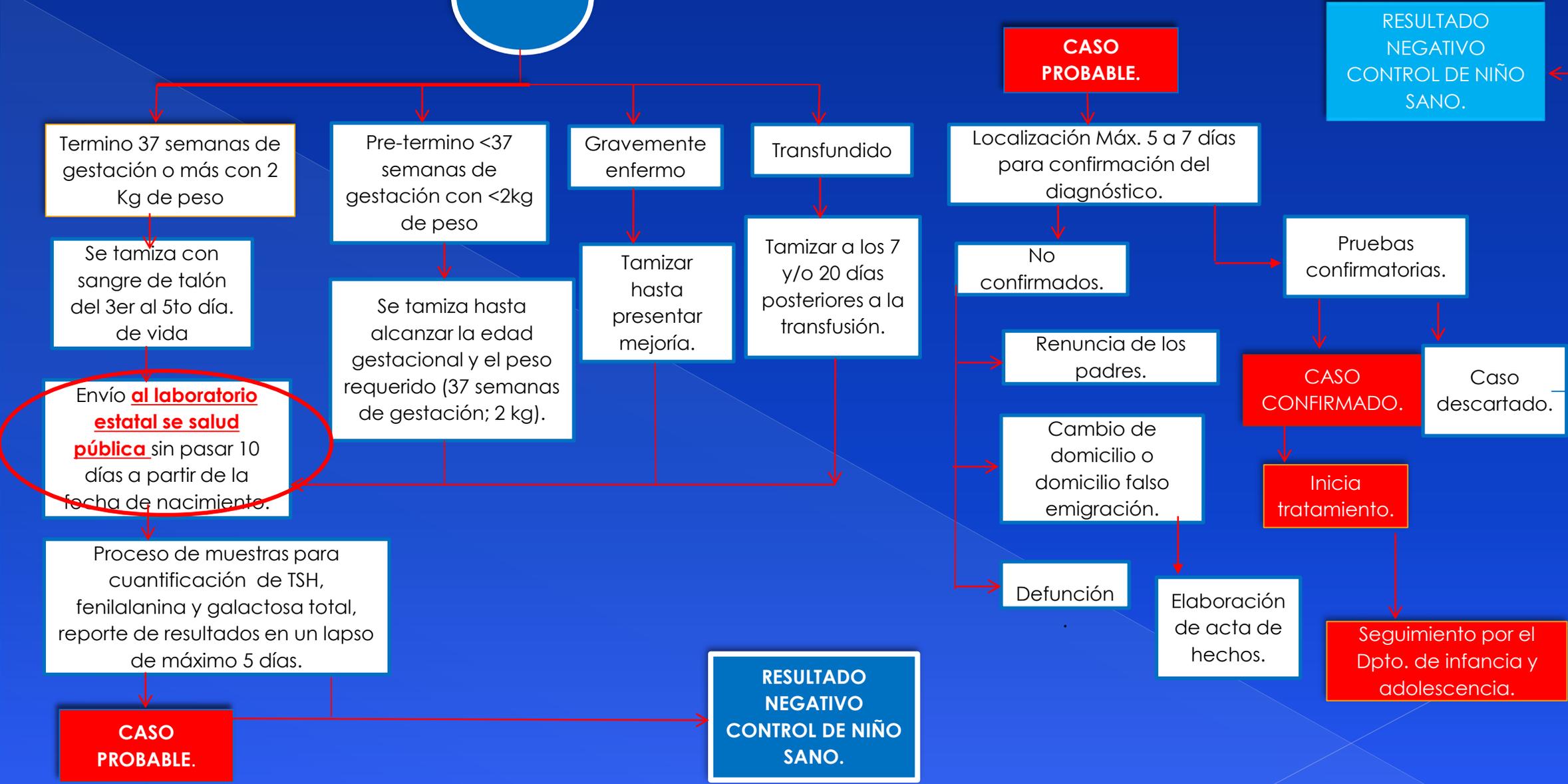


Figura 40. diagrama de proceso del tamizaje

METODOLOGÍA

DISEÑO DE ESTUDIO

Experimental básico Descriptivo, porque es un ensayo controlado y aleatorizado en el que se utilizan pacientes como sujetos de estudio.

Un estudio analítico descriptivo, ya que se recolectaron datos tal como es, en este caso la condición de niños nacidos en el Hospital General de Matehuala.

Es observacional, ya que no hay intervención del Investigador, se limita a medir las variaciones que se definen en el estudio.



Figura 41. Carta de consentimiento informado

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Folio, _____

Por medio de la presente, acepto participar en el proyecto de Investigación titulado "Estudio y caracterización del Tamiz Neonatal, por medio de Espectroscopia Raman y análisis de sangre." el cual se realizará en la universidad Autónoma de San Luis Potosí Coordinación Académica Región Altiplano (COARA), en vinculación con el Hospital General de Matehuala, tendrá como objetivo determinar la factibilidad de utilizar la espectroscopia Raman como una técnica alterna para el estudio del tamizaje. La técnica de espectroscopia Raman es una técnica no invasiva sobre la muestra por lo que no conlleva riesgos.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

- Responder una corta entrevista, con preguntas que se me harán sobre aspectos de mi salud y antecedentes familiares.
- El médico o pediatra obtendrá una pequeña muestra de sangre en un tubo capilar a la par del tamiz neonatal.

El investigador Principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo derivados del proyecto, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación, si lo prefiere puede escribir a la siguiente dirección de correo electrónico raquel.avila@uaslp.mx. En esta investigación no se identificará mi nombre y los datos relacionados con mi privacidad serán manejados de forma confidencial.

Nombre del responsable del Proyecto
Dra. Raquel Ávila Rodríguez.

Médico pediatra responsable
Dr. Javier Ávila Rodríguez.

Tabla 5. Criterios de Inclusión y exclusión

Inclusión	No inclusión	Exclusión
Niños nacidos con más de 72 horas de vida.	No se incluirán al estudio niños nacidos con más de 96 horas de vida.	Todos aquellos que tienen retiro voluntario
Niños de ambos sexos.	No se aplicara el estudio a niños nacidos en otros hospitales.	
Los niños deben nacer en el Hospital General de Matehuala.	Niños que no tengan firmada la carta de consentimiento informada.	
Se aplicara el estudio solo a los niños que tengan firmado el consentimiento informado de sus padres.	Niños con defectos de patologías congénitas.	

METODOLOGÍA

Universo de Estudio

Muestreo aleatorio, ya que todos los neonatos tenían la misma probabilidad de ser elegidos.

Muestreo por conglomerado, se eligió solamente el Hospital General de Matehuala.

Muestreo por conveniencia, solo se obtuvieron muestras del Hospital General de Matehuala, de donde sabemos nacen un promedio de 120 niños al mes.

Tamaño de muestra: , basándonos en determinar el tamaño de muestra con la fórmula (1) con un coeficiente de confiabilidad de un 95%.

$$n = \frac{z^2(p)(q)(N)}{NE^2 + z^2(p)(q)} \quad (1)$$

Z es el nivel de confianza (1.96).

p es la variabilidad positiva (0.5).

q es la variabilidad negativa (0.5).

N es el tamaño de la población (120).

E es la precisión o el error (3%).

n es el tamaño de la muestra (108).

METODOLOGÍA



- Lanceta para tamizaje.



- Pinchazo en el talón del recién nacido.



- Recolección de muestrars en targetas Guthrie.



- Tarjeta Guthrie completa.



Figura 42. Diagrama del proceso realizado para Tamiz neonatal.

METODOLOGÍA



Figura 43. Proceso de preparación para la Medición con Espectroscopia Raman

METODOLOGÍA



Figura 44. Arreglo experimental para la medición con Espectroscopia Raman

RESULTADOS

En la figura 45 se muestra el espectro Raman de la TSH, donde se observan algunos picos con Intensidades altas.

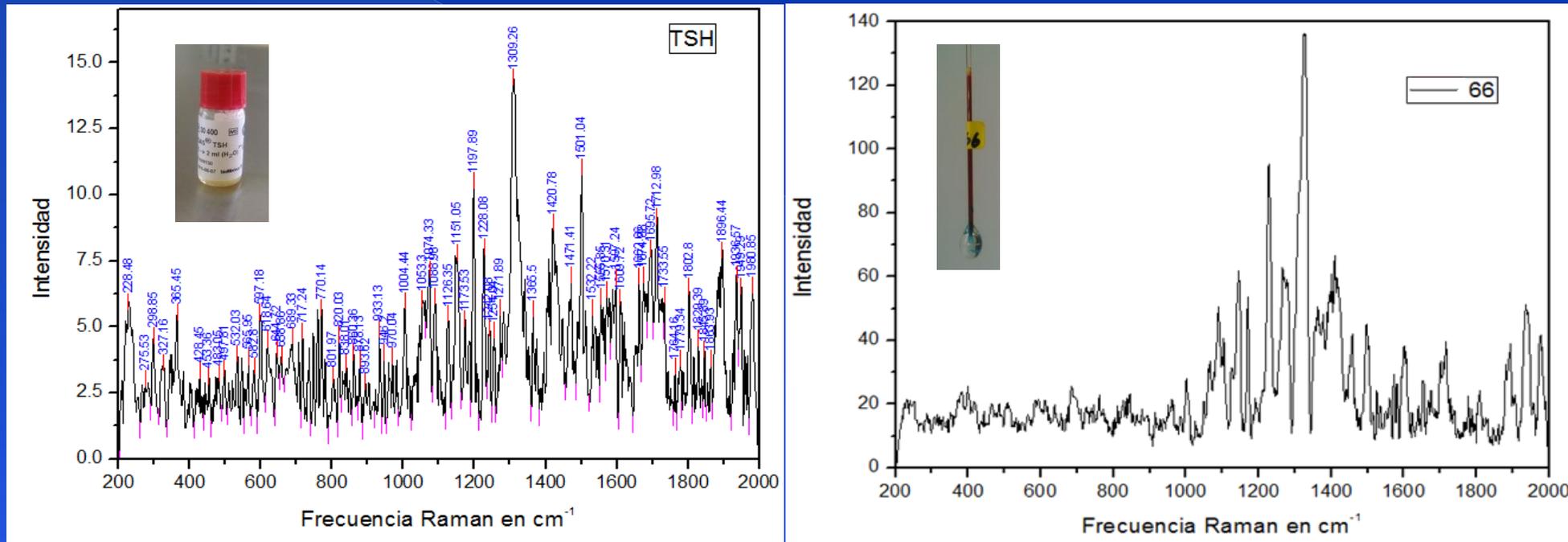


Figura 45. Espectro Raman de la TSH grado reactivo y la muestra Número 66

RESULTADOS

En la figura 46 se muestran los resultados de los 108 Espectros Raman de suero sanguíneo y el de referencia TSH.

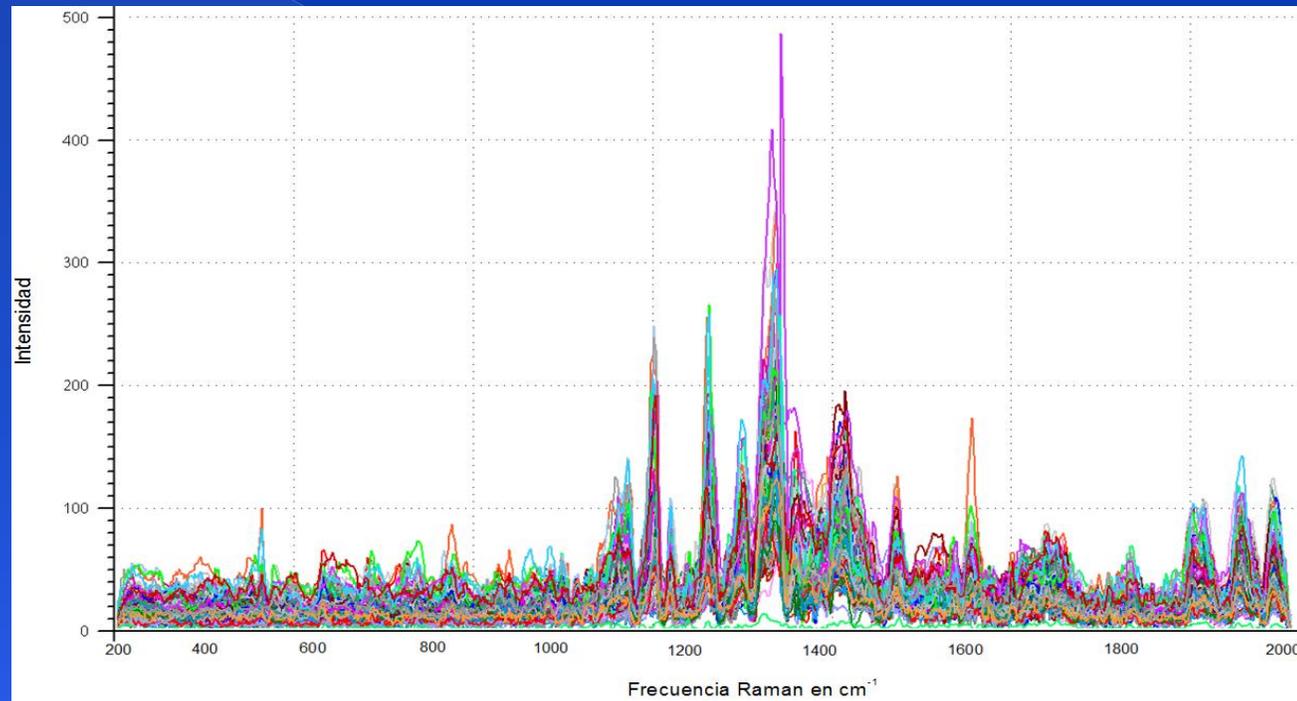
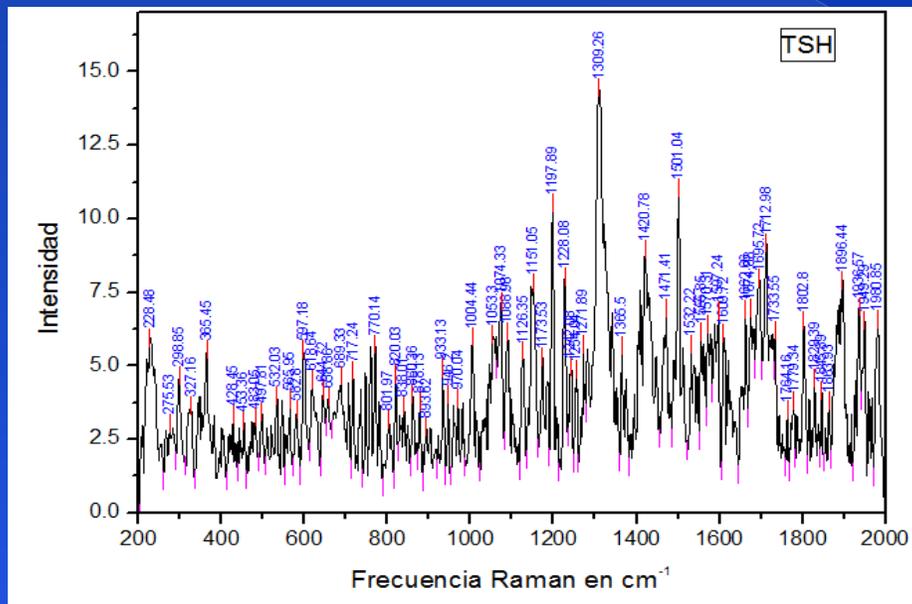


Figura 46 Espectros Raman de todas las muestras, incluyendo el TSH.

RESULTADOS

Tabla 6. Grupos funcionales



Frecuencia Raman	Grupo funcional	Referencia.
228	C-C-O	105
365, 395, (350-398)	C-C-C, C-C-O	100
483, 497, 532, 565, 582, (470-580)	Cistina	101
597	NH ₂	100
658 (653-673)	Citosina	103
770 (773)	Citosina	103
1004 (986-1006)	Fenilalanina	103
1053 (1040-1100)	C-C	100
1151	C-N	104
1197	CH	102
1228 (1238)	Lípidos y proteínas	100
1309 (1308-1347)	CH ₂	100
1420 (1400-1470)	Ácidos Nucleicos	100
1471 (1400-1470)	CH ₂	102
1507 (1550-1900)	C=O	100
1570 1532 1555 (1530-1573)	Guanina, Adenina	104
1674 (1697)	C=O	102
1712	C=O	100
1802	C=O	100
1896	CH	105
1949	CH	105

RESULTADOS

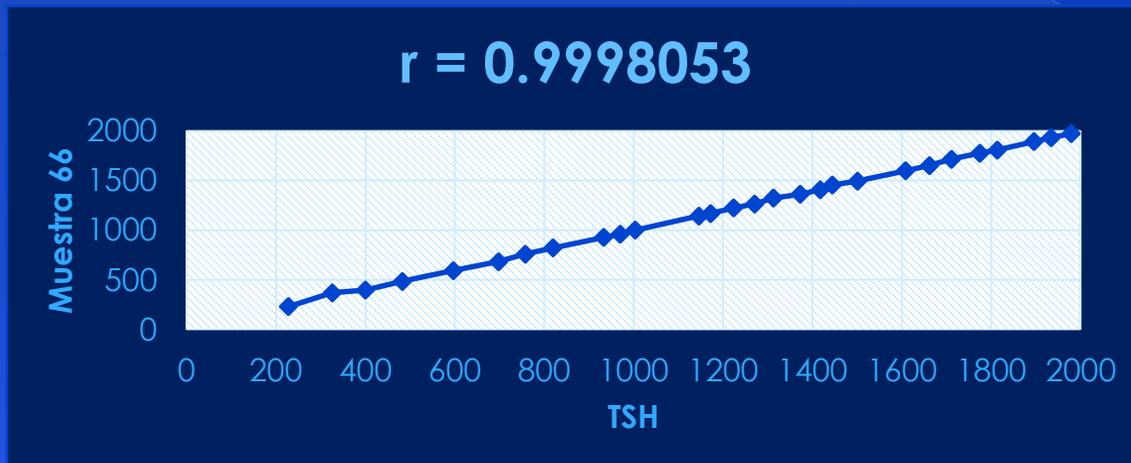


Figura 48. Relación entre TSH y muestra 66

Tabla 7 de grupos funcionales de TSH y muestra 66

Frecuencia Raman de la muestra 66 en cm^{-1}	Frecuencia Raman de la TSH en cm^{-1}
231	228
370	362
398	400
485	483
594	597
684	689
760	758
822	820
928	933
961	970
1002	1004
1144	1146
1169	1173
1226	1224
1265	1271
1324	1313
1363	1373
1409	1418
1456	1445
1495	1501
1599	1609
1652	1662
1716	1711
1777	1775
1809	1814
1893	1896
1934	1934
1974	1979

RESULTADOS

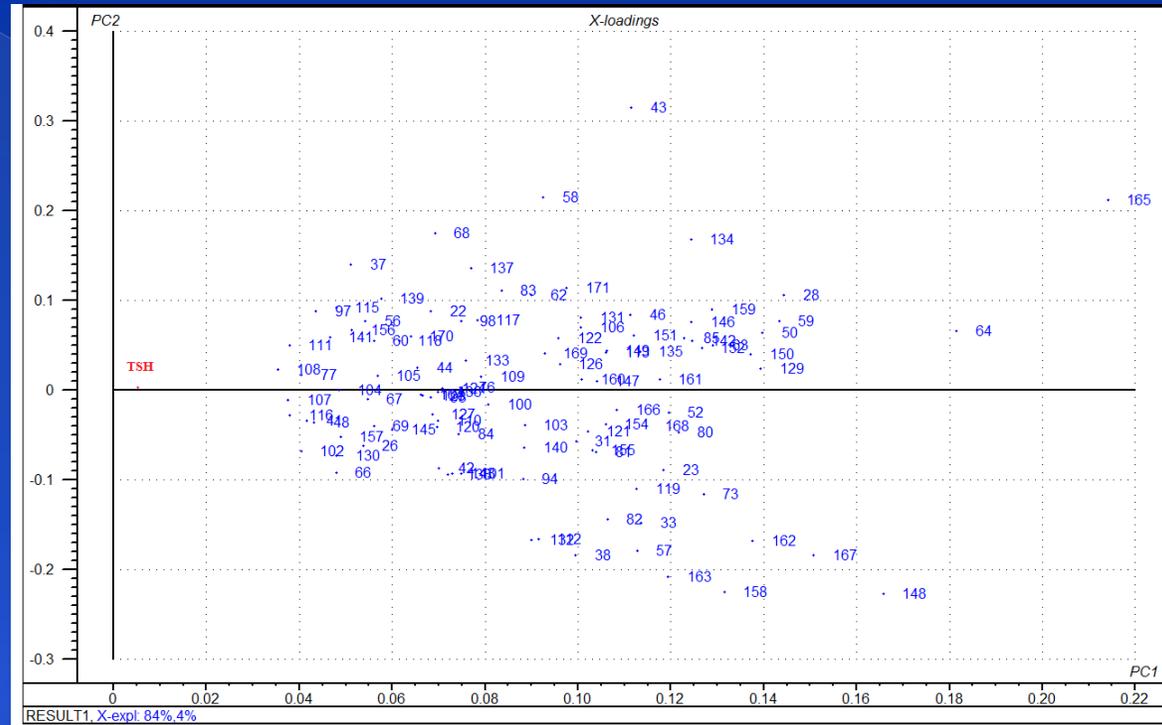


Figura 49 Análisis de PCA de los Espectros Raman de todas las muestras, incluyendo el TSH.

CONCLUSIONES

Tabla 8. Resultados con Raman y técnicas estándar

METODO TRADICIONAL O ESTANDAR	ESPECTROSCOPIA ÓPTICAS	METODO TRADICIONAL O ESTANDAR	ESPECTROSCOPIA ÓPTICAS
<p><u>Para Toxoplasma Gondii</u> Prueba de ELISA Para pruebas de anticuerpos 97.5% de sensibilidad y 98.5% para especificidad</p>	<p><u>Para Toxoplasma Gondii</u> se encuentra sensibilidad del 94% y una especificidad de 97%, además la identificación de los grupos funcionales de los anticuerpos.</p>	<p>Glucometro, análisis químico, con r^2 de 0.65</p>	<p>Espectroscopia NIR, $r^2= 0.9$ determinación del error en la predicción de concentración de glucosa 80.5mg/dL.</p>
<p><u>Prueba de Papaniolau:</u> Resultados de Patología</p>	<p><u>Prueba de Papaniolau:</u> Con Espectroscopia se validaron los resultados encontrando cambios en intensidad.</p>	<p>Microscopia Electrónica de Barrido para ver el Biofilm</p>	<p>Espectroscopia Raman, identificando los grupos funcionales que forman la matriz de exopolisacaridos</p>
<p><u>Prueba de Tamiz neonatal</u> Prueba de ELISA Para pruebas de anticuerpos</p>	<p><u>Prueba de Tamiz neonatal</u> Espectroscopia Raman, se encuentra un análisis de componentes principales de 84.4%</p>		

CONCLUSIONES

- ✓ Para la determinación de anticuerpos específicos en suero sanguíneo, Raman y el análisis de PCA fue factible determinar la presencia o ausencia de *Toxoplasma Gondii*, así como la identificación de los grupos funcionales del Biofilm.
- ✓ Los espectros Raman analizadas del las muestras de cuello uterino mostraron cambios en la intensidad Raman, indicando cambios con el crecimiento celular, validando con los resultados de patología.
- ✓ Los resultados del Tamiz neonatal, nos muestran que la Espectroscopia Raman es una técnica factible para la determinación de TSH, como una herramienta de apoyo a diagnóstico.

AGRADECIMIENTOS



REFERENCIAS:

- [1]. Cesar Mello, Diorginis Ribeiro, Fábio Navaes (2005). Rapid Differentiation among bacteria that Cause gastroenteritis by use of low-resolution Raman Spectroscopy and PLS discriminant analysis. *Anal Bioanal, Chem.* 383: 701-706.
- [2] O. Novoa- Farías, A.C. Frati Munari. (2015). “ Susceptibilidad de las bacterias aisladas de infecciones Gastrointestinales agudas a la rifaximina y otros agentes antimicrobianos en México. *Revista de Gastroenterología de México.* 81(1):3-10.
- [3] Min Ren, Mark A. Arnold. (2007). Comparison of multivariate calibration models for glucose, urea and lactate from near-infrared and Raman spectra. *Anal Bioanal Chem.* 387:879-888.
- [4] Snezana Uskokovic Markovic, Milena Jelicic Stankov, (2013). Raman Spectroscopy as a new Biochemical diagnostic tool. *J. Med Biochem* 32: 96-103.
- [5] Chanda Ranjit Yonzon, Christy L. Haynes.(2004). A glucose Biosensor based on Surface- Enhanced Raman Scattering: Improved Partition layer, temporal stability, reversibility, and resistance to serum protein inference. *Anal chem* 76, 78-85.
- [6] X.F. Ling, Y.z. xu, s.F. Weng, W.H.Li, X.U. zhi, R.M. Hammaker, W.g. Fateley, F.wang, x.S zhou, R.D. soloway, j.R. Ferraro and J.G. Wu, “investigation of normal and malignant tissue sample from the human stomach using fourier transform Raman spectroscopy” *appl. Spectrosc* 56, 570-573(2002).

REFERENCIAS:

[7] Jasso Gutierrez L. (2008) Neonatología ppráctica. (7ª Ed.) México. Editorial el manual moderno S.A. de C.V.

[8] Velázquez A., Loera Luna, A., Aguirre B.E. (1994) Tamiz neonatal para Hipotirodismo congénito y Fenicetonuria. Salud pública, México. Vol 36 N° 3 p 249-256.

[9] Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Recuperado en Junio de 2019 Página Web. Disponible en:

<https://www.inegi.org.mx/temas/natalidad/>

GRACIAS POR SU ATENCIÓN !



raquel.avila@uaslp.mx