

Sistema de detecção eletroquímica de esquistosomiasis como análises alternativa em substituição dos métodos clássicos

Ninoska Bojorge, Mariana Fortes, Andrea Medeiro Salgado, Belkis Valdman
Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, ninoska@eq.ufrj.br

RESUMO

Este trabalho apresenta uma aplicação da biologia molecular como ferramenta para a análise da estrutura proteica da Apirase (ATP-difosfatase) - uma proteína vegetal (*Solanum tuberosum*) usada como imunoreagente na detecção de anti-anticorpos de *Schistosoma mansoni* (Sm). Através do modelado por homologia entre a Apirase *homo sapiens* e a Apirase *Solanum tuberosum* se obteve um modelo hipotético que permitiu determinar os aminoácidos predominantes para a ligação covalente da proteína na superfície do transdutor do imunossensor de composto grafite-epoxi (GEC). O GEC foi modificado para seu uso para detectar a interação antígeno-anticorpo. A estratégia de modificação baseia-se na silanização do biocomposto. Primeiramente, o GEC foi tratado com peróxido de hidrogênio para favorecer a imobilização através da formação de uma camada hidrofílica. A seguir, o aminopropiltriétoxissilano (3-APTÉS) foi usado para funcionalizar a superfície tratada e formar grupos aminos, os quais foram posteriormente ativados com glutaraldeído para introduzir uma camada de grupos aldeídos. A efetividade da estratégia de modificação foi validada por imunossaios amperométricos de *S. mansoni*.

ABSTRACT

This work presents an application of molecular biology as tool for the analyses of the proteinic structure of the Apirase (ATP-difosfatase) - a vegetal protein (*Solanum tuberosum*) used as immunoreagente in the detection of anti-antibodies of *Schistosoma mansoni* (Sm). Through modulation for homologia between the Apirase *homo sapiens* and the Apirase *Solanum tuberosum* got a hypothetical model that allowed to determine predominant amino acids for the linking covalent of the protein in superficie of the transducer of the immunosensor of composite Graphite-Epoxy (GEC). The GEC was modified for its use to detect the interaction antigen-antibody. The strategy of modification was silanization of the biocomposite. First, the GEC was dealt with hydrogen peroxide to favor immobilization through the formation of a hydrophilic layer. To follow, aminopropyltriethoxysilane (3-APTÉS) was used to functionalize superficie treated and to form amino groups, which later had been activated with glutaraldehyde to introduce a layer of groups aldehydes. The effectiveness of the strategy of modification was validated by amperometrics immunoassays of *S. mansoni*.

Keywords: Apirase, Immunossensor, amperometric, vegetal protein

1. INTRODUÇÃO

No imunossaiio alternativo do projeto a proteína ATP-difosfohidrolase (ADPase, EC. 3.6.1.5) de *Solanum tuberosum* – proteína de origem vegetal – aqui referida como antígeno, foi utilizada para a construção de um imunossensor amperométrico para diagnósticos sorológicos da doença esquistossomose ou a detecção de anti-anticorpos de *S. mansoni*. Os anticorpos presentes em soros de pacientes com esquistossomose são capturados pelo antígeno imobilizado. O eletrodo de composto grafite-epóxi foi primeiramente tratado com glutaraldeído

para a imobilização do antígeno e a interação de afinidade foi monitorada por voltametria no potencial de -500 mV a $+500$ mV (versus eletrodo de referencia de Ag/AgCl) usando conjugado IgG-HRP e uma mistura de substrato ($H_2O_2 + TMB$). Neste caso, o elemento de reconhecimento bioquímico é provido da proteína Apirase e de seu respectivo conjugado etiquetado com a enzima peroxidase (HRP) que seletivamente catalisa a reação de um substrato para produzir um produto eletroativo. O transdutor amperométricos fornece a corrente medida, e através de uma relação previamente estabelecida entre o sinal do transdutor e a concentração analítica (curva de calibração) se permite quantificar o analito.

No imunoenensaio ELISA, o anticorpo conjugado (HRP-Ac) capturado sobre a superfície é medido usando uma mistura de substrato: 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é o substrato do HRP e o TMB serve como uma ponte eletroquímica ou mediador da transferência do elétron entre o eletrodo e o HRP [Fanjul-Bolado, P. et. al (2005); Mecheri, B., et .al. (2004)]. As interações de HRP, do TMB, e do H_2O_2 na superfície do eletrodo são ilustradas no esquema da figura 1.

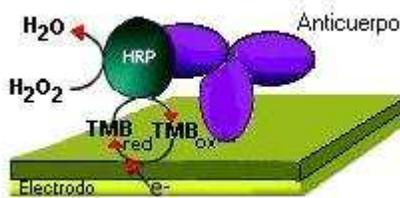


Figura 1. Ciclo catalítico da peroxidase

A reação enzimática do ciclo é como segue:



Neste processo o HRP está sendo convertido de sua forma original (ativada pelo H_2O_2) a sua forma oxidada (HRP_{ox}). A enzima é regenerada pelo TMB:



Na solução que contem suficientes concentrações de H_2O_2 e de TMB, a formação de TMB⁺ pode ser usada como uma medida da atividade do HRP. A detecção do imunossensor é baseada na eletroredução do TMB⁺ na superfície do sensor. No imunossensor aplica-se pulsos de potencial (versus o eletrodo da referência de Ag/AgCl) e a corrente medida é devido à seguinte reação:



A reação (1.3) gera a corrente da redução que é diretamente proporcional à concentração de TMB⁺ e, conseqüentemente, à quantidade de HRP-Ac capturado no sensor.

O TMB como substrato mediador do HRP em teste ELISA eletroquímico, obtido pela análise amperométrica do TMB oxidado, tem sido também amplamente usado como um substrato cromogênico da peroxidase de horseradish (HRP) em kits comercial de teste ELISA (Zhong T-S, et al., 2004)

2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2.1 REAGENTES

A proteína ATP-difosfohidrolase (ADPase, EC. 3.6.1.5) comumente chamada Apirase, foi usada nos imunoenaios para a detecção dos anti-anticorpos de *Shistosomiasis mansoni* e as amostras padrões de soros foram subministrado pela Profa. Eveline Vasconcelos, do departamento de Bioquímica do Instituto de Ciência Biológica da Universidade Federal de Juiz de Fora. O anticorpo conjugado foi obtido da Zymed Laboratory, sendo usado o anti-humano HRP-IgG bovina produzido em cabra, conjugado com a enzima peroxidase. Os reagentes 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), 3-Aminopropiltriétoxissilano (APTES), Glutaraldeído (GA) e a Glicina foram obtidos da Sigma-Aldrich. O pó de grafite da Fluka, EUA; a resina grafite-epóxi e o acelerador grafite-epóxi (resinas de Epóxi, 331) foram comprados de Epoxtec, Brasil. A etanolamina, Etanol absoluto e foi usado e as soluções tampões foram diariamente preparadas. O tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2, solução tampão de 0,1M carbonato de sódio (pH 9,2) foi usado. O tampão bloqueador continha caseína 2% e o Tween20 0,05% no tampão PBS (pH 7,2). O tampão de lavagem continha 0,05% de Tween20 no tampão PBS (pH 7,2). A solução tampão de carbonato de sódio (pH 9,2) foi usada para diluir a proteína do Apirase. Todos os produtos químicos restantes usados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água de Milli-Q.2.2

2.2 CONSTRUÇÃO DO ELETRODO

A superfície do compósito grafite-epóxi foi modificada segundo a técnica descrita por Sree P. et al. (1998), com as seguintes modificações: 1) Tratamento Térmico: 0.5 g do pó da grafite em pó foram aquecidos em um forno do ar quente a 100 -110 °C durante 2 h.. 2) Peroxidação: A matriz tratada termicamente foi suspensa numa solução do H₂O₂ 30% durante 96 horas na temperatura ambiente. O tratamento com o peróxido de hidrogênio introduz os grupos hidroxilas sobre a matriz (Willner I. e Katz E., 2000). Logo, esta matriz foi lavada 3 vezes com água de Milli-Q. Mais tarde, centrifugada a 10000 g por 20 minutos ou separada mediante sucessivas filtrações. O sobrenadante foi rejeitado e o pellet foi secado num dessecador e se procede então com a etapa seguinte. Etapa 3 – Preparação do compósito-elétrodo: - o pó de grafite peroxidado e seco é misturado manualmente com resina epóxi na relação de 60:40 (% w/w). A pasta resultante foi colocada no corpo cilíndrico do eletrodo feito de Teflon (~1.5 milímetros d. i.) e 3mm de profundidade, em contato com o fio elétrico. O compósito foi curado a 80 °C durante uma noite. Antes de cada uso, a superfície do eletrodo é umidificada com água Milli-Q e logo é lixado sequencialmente com papel lixa 400, 600, 1200 e 2000 até obter uma superfície lisa e brilhante e finalmente o compósito-eletrodo é aplicado um banho de ultra-som por 20 minutos. O contato elétrico é obtido ao inserir um arame de cobre (material elétrico empregado usualmente) na parte superior do eletrodo. No outro extremo foram mantidos aproximadamente 3 mm vazio para logo ser enchido com a pasta de carbono modificada (suporte de grafite com proteína imobilizada)

2.3 IMOBILIZAÇÃO DA PROTEINA

O protocolo de imobilização da proteína Apirase foi baseado no método de silanização com APTES e na ativação com GA (Cass e Ligeler, 1998). O procedimento consiste em: a) Submergir o eletrodo-compósito numa solução APTES 5 % em etanol durante 1h a temperatura ambiente; b) Enxaguar completamente a superfície silanizada com água Milli-Q e etanol, sequencialmente; c) O suporte é curado em um forno a vácuo a 80°C durante a noite; d) Submergir o suporte curado numa solução de 2.5% de glutaraldeído em tampão carbonato durante 2h a

temperatura ambiente; e) Enxaguar três vezes o suporte completamente com PBS; f) Inocular o suporte modificado numa solução contendo 5µg/ml de Apirase em tampão carbonato pH 9,2 durante a noite; g) Enxaguar completamente a proteína não ligada na superfície com tampão PBS; h) Para obstruir os grupos de aldeído que não se ligaram aos grupos terminais da proteína, o suporte é submerso em solução de etanolamina 0.2 M durante 1 h; i) O suporte é submerso numa solução de tampão bloqueador a fim de obstruir os locais hidrofóbico e hidrofílico livres na superfície do eletrodo e a fim de evitar ligações não específicas; m) o imunossensor é enxaguado com água Milli-Q e armazenado em tampão PBS a 4°C.

2.4 PROCEDIMENTO DO IMUNOENSAIO/IMUNOSSENSOR

Os ensaios indiretos ELISA foram realizados a fim determinar a resposta imune e/ou uma quantidade de anti-Apirase preliminar do anticorpo (SmAb) presente na amostra. O imunossensor com Apirase imobilizada é incubado em 200 µL da solução da amostra de soro que contem os anticorpos primários diluído em tampão PBS; a seguir o imunossensor enxaguado 3 vezes com tampão de enxágüe, submerge-se em tampão bloqueador e posteriormente é incubado como o anticorpo conjugado (HRP-IgG) (diluído 1:3000) na temperatura ambiente. Então, o imunossensor é enxaguado completamente com tampão de enxágüe para remover todo o anticorpo secundário não ligado. O eletrodo é colocado em uma célula eletroquímica com 4ml de tampão citrato 0.1 mol l-1, pH 5.5. Após a adição 100 µL de uma mistura de substrato da peroxidase -TMB e de H₂O₂ - (concentração final de 5 x 10⁻⁴ mol de I⁻¹ e de 1 x 10⁻³ mol de I⁻¹, respectivamente), o sinal amperométrico é medido. O sinal amperométrico é gravado a 100 mV/s de -500 mV a 1000 mV contra o eletrodo da referência de Ag/AgCl.

2.5 DETERMINAÇÃO DA REATIVIDADE NO IMUNOENSAIO AMPEROMÉTRICO

O controle negativo e as amostras de soros de pacientes não infectados com esquistossomiase previamente analisado a traves de técnicas convencionais (imunofluorescência indireto e ELISA), foram analisados pela metodologia proposta. As condições experimentais foram analisadas como segue: Ag (0,5 µL de solução em stock, 9,743 mg/ml), Ac (diluições sequenciais de 1:100 até a:3200) Ac* (1: 3000, solução stock 0,75 mg/ml), H₂O₂ (1 mol do × 10⁻³ L⁻¹) e TMB (5 mol × 10⁻⁴ mol L⁻¹). A reatividade inicial é obtida como as médias das intensidades obtidas com os soros negativos mais duas vezes o desvio padrão.

3. RESULTADOS

Os voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de grafite-epóxi em branco (sem adição covalente do imunoreagente) se realizaram em uma dissolução de ferrocianato, Fe(CN)₆³⁻/ Fe(CN)₆⁴⁻, e KCl 0,05 mol L⁻¹ a diferente velocidades de varredura de potencial.

As características de voltametria cíclica do imunossensor unicamente como compósito GEC são apresentadas na figura 2.

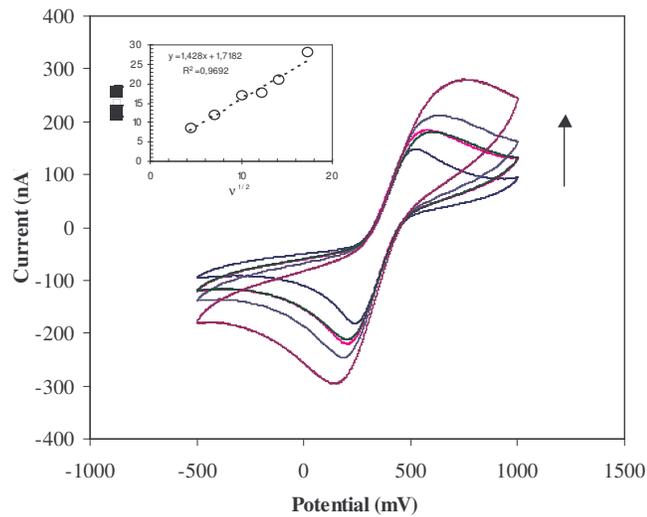


Figura 2 – Voltamogramas cíclico do eletrodo de composto GEC.

3.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE

O objetivo destes testes foi otimizar os parâmetros do procedimento do ensaio ELISA indireto. A concentração de Apirase imobilizada na superfície do transdutor foi fixada em $5\mu\text{g/ml}$, segundo a metodologia anteriormente. As variáveis otimizadas do imunoenensaio foram: 1) temperatura de incubação, 2) diluição do anticorpo conjugado com a peroxidase, 3) pH do tampão do meio revelador e 4) tempo de incubação.

3.1.1 – Efeito da Temperatura de incubação

O efeito da temperatura de incubação na resposta amperométrica do imunossensor foi examinado variando a temperatura entre 5 a $40\text{ }^\circ\text{C}$ e mantendo a diluição do Ac^* em 1:1000, pH 5,0 e tempo de incubação de 40 min.

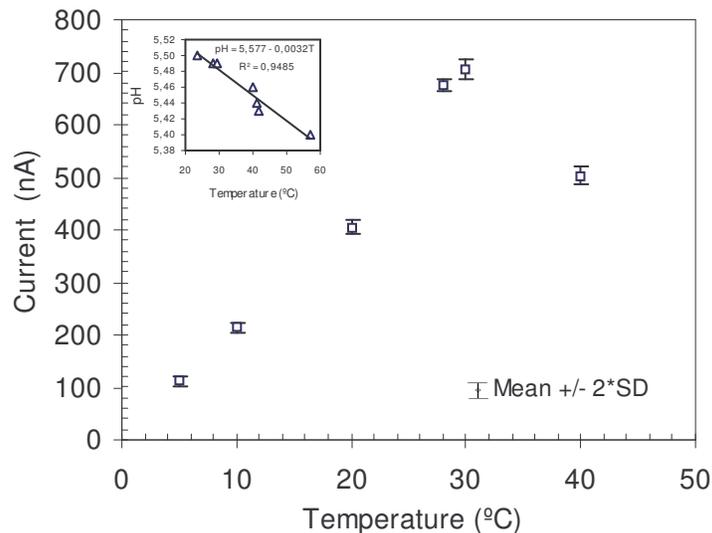


Figura 3 - Efeito da temperatura de inoculação

Segundo os testes realizados, foi encontrado que o sinal aumenta com um aumento da temperatura até 28 °C, e logo diminui a temperaturas mais altas (figura 3). O decremento do sinal a temperaturas mais altas pode atribuir-se ao efeito da temperatura no pH da solução da incubação, que diminui 0,0032 unidades de pH (vide sub-gráfico na Figura 3) com um aumento da temperatura da incubação que se dá a partir de 20 °C até 40 °C (ponto de deflexão). Para simplificar a operação se selecionou a temperatura ambiente (25 °C) como temperatura de incubação, a qual foi utilizada em todos os experimentos.

3.1.2 Efeito do pH

A figura 4 mostra um nível de resposta mais alto na faixa de pH entre 4,5 – 6,5. Sendo que, o pH ótimo meio é de 5,5. Nos experimentos com o imunossensor foram realizados com o tampão citrato 0,1M, pH 5.5.

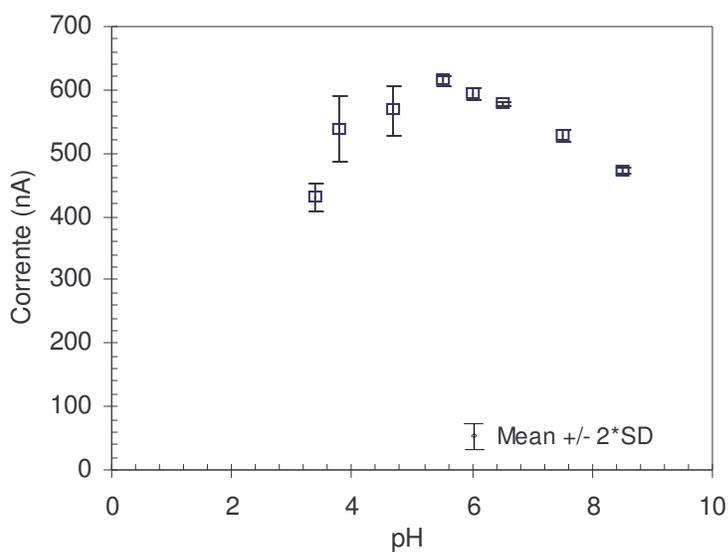


Figura 4.– Variação do pH do tampão citrato do imunossensor previamente inoculado em uma solução contendo o anticorpo conjugado com HRP a 25 °C.

3.1.3 – Efeito do anticorpo secundário

O efeito da concentração de Ac* foi investigado também. A resposta amperométrica do imunossensor também depende da quantidade do anticorpo conjugado (IgG-HRP anti-Apirase humana) empregado para detectar indiretamente a presença dos anticorpos primários presentes nas amostras de soros mediante a reação enzimática do HRP. A resposta ótima foi obtida incubando o imunossensor em várias soluções de IgG-HRP (stock solution: 0,75 mg protein mL⁻¹) da mais diluída à menor diluição (1:7000, 1:6000, 1:5000, 1:4000, 1:3000, 1:2000, 1:1000, 1:500) a temperatura ambiente. Na Figura 5 se observa que a resposta aumenta linearmente até 0,375 mg/mL de HRP-IgG em a solução e depois tende saturar. Uma concentração mais alta ou mais baixa de HRP-IgG conduz a uma diminuição da concentração da detecção de SmAc livre nas amostras de soro, porque os epítomos da superfície da proteína Apirase imobilizada no imunossensor são limitados. Por tanto, 100µL da solução final de HRP-IgG (0,75 mg/mL de HRP-IgG diluído em 1:3000) foi

utilizado rotinariamente para a incubação do conjugado nos ensaios. A concentração do substrato era fixada ($5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ de TMB e $1 \times 10^{-3} \text{ mol. l}^{-1}$, H_2O_2)

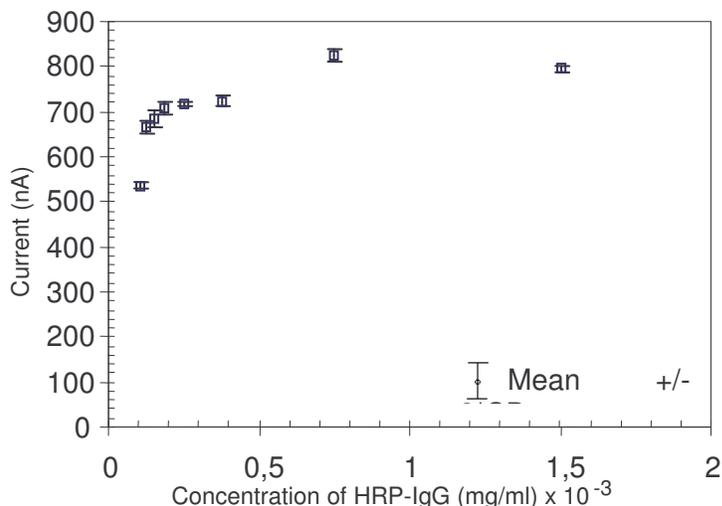


Figura 5 – Efeito da concentração do anticorpo conjugado a temperatura ambiente. Concentrações calculadas para diversas diluições de 0,75 mg/ml de IgG-HRP puro.

3.1.4 – Efeito do tempo de incubação

O efeito do tempo de incubação sobre o sinal amperométrico foi investigado. O tempo de incubação permite maximizar as interações entre Ag – Ac e Ag –Ac*. Durante a incubação do imunossensor na amostra, os anticorpos presentes na amostra se ligaram à Apirase imobilizada na superfície do imunossensor, o qual requer de um tempo para formar um imunocomplexo compacto. O efeito do tempo de incubação para a interação do Ag-Ac* é apresentado na Figura 6. O sinal amperométrico aumenta rapidamente com o tempo da incubação até 25 min, e após 45 min se estabiliza e depois diminui o valor. O que parece ser uma consequência dos efeitos totais da ação, entretanto que a concentração de SmAc livre diminui O tempo ótimo de incubação foi determinado em 30 minutos, para todos os experimentos.

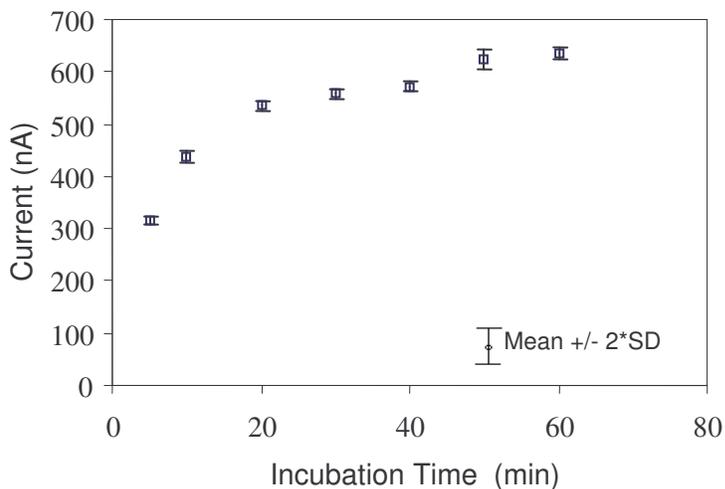


Figura 6 – Variação do tempo de inoculação do imunossensor contendo 5 µg/ml de Apirase incubado em diferentes tempos na solução tampão de citrato contendo HRP-IgG a 25 °C.

3.1.5 – Testes sorológicos com imunossensor

Após a otimização dos parâmetros experimentais, empregou-se para a prova sorológica ELISA um *pool* de soros positivos (n = 4) como controle positivo e 4 soros controles negativos para a esquistossomose na determinação do limiar de reatividade. Os soros padrões positivos e negativos foram previamente confirmados pelas técnicas convencionais em sorologia (ELISA e imunofluorescência indireta), proveniente de uma soroteca e sem identificação dos pacientes correspondentes às amostras foram cedidas pelo Laboratório de Análises de Proteínas do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas – UFJF. O limiar de reatividade foi determinado a partir de médias das intensidades amperométricas das amostras de soros negativos acrescida de duas vezes o desvio médio das intensidades amperométricas.

Procedeu-se os ensaios alternativos com as amostras padrões na determinação dos anti-anticorpos da Apirase empregando o imunossensor segundo a metodologia descrita anteriormente. Os soros foram diluídos na proporção 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200. De acordo a Tabela 1 todos os soros de pacientes infectados com esquistossomiasse apresentaram uma intensidade de corrente maior que as respectivas medias das reatividades para cada diluição.

Tabela 1 – Soros positivos analisados com imunossensor

Diluição Soro	Ip /nA			
	1:100	1:400	1:1600	1:3200
1	2833,0 ± 42,4	2422,5 ± 50,2	2000,5 ± 111	1209,0 ± 25,3
2	2230,5 ± 38,9	1909,0 ± 210,7	1353,0 ± 253,5	915,3 ± 202,1
3	1531,3 ± 259	926,1 ± 202,1	550,6 ± 27,3	386,9 ± 67
4	1404,5 ± 115,6	652,8 ± 30,5	543,3 ± 17,9	417,7 ± 111,7

3.1.6 – Curva de diluição de soros positivos

Como mostrado, ao considerar o menor valor do controle negativo (diluição 1:100) da intensidade de corrente de 464,1 nA. A curva de diluição dos soros positivos (Figura 7) deu uma interpolação do valor da interrupção que conduz à sensibilidade amperométrica da reação até a diluição de 1:2400. Este fato demonstra a alta sensibilidade da metodologia proposta.

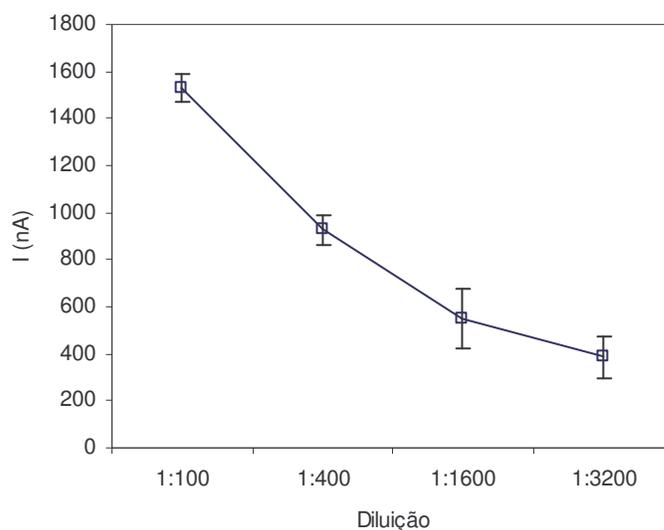


Figura 7– Efeito da diluição do anticorpo primário no imunossensor

4. CONCLUSÃO

Para demonstrar o uso de eletrodo de grafite-epoxi para a determinação de anti-anticorpo de *Schistosoma mansoni* em amostras de soros humano, 4 amostras com diferentes graus de infecção foram testadas. Observando-se que a intensidade amperométrica aumenta com o incremento do grau de infecção. Este resultado implica que a concentração ou diluição detectável de anti-SmAc proposto no sistema satisfaz os requerimentos de análises clínicas e seu uso para a determinação de anti-apirase em soro humano e avaliação da reatividade é factível. Por outro lado, o tempo da incubação para Ag-Ag e Ab-Ac* usando o método de ELISA que em média era per-noite e 2 h para cada interação, entretanto para o imunossensor foi reduzida a 45 min e 30 min., respectivamente. Além da redução no tempo de análise é importante forçar que todas as amostras que eram positivas usando o método de ELISA eram também positivas usando o imunossensor, assim reforça a validade do método proposto. Para a análise rotineira, a metodologia deve ser estandardizada e uma comparação detalhada das vantagens ou das desvantagens do ELISA em relação ao método do eletrodo será perseguida no futuro próximo.

REFERENCIAS

- Abdel-Hamid I., Ivnitiski D., Atanasov P. and Wilkins E., High sensitive flow-injection immunoassay system for rapid detection of bacteria, *Anal. Chim. Acta* 399 (1999), pp. 99–108
- Babacan S., Pivarnik P., Letcher S., Rand A.G., (2000), Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application, *Biosensors & Bioelectronics* 15, p.615–621. [
- Bancos de dados de estruturas de proteínas: <http://www.rcsb.org/pdb/>;
<http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/antibody/structure.html>
- Bizet K, Gabrielli C. and Perrot H., (1999), Biosensors based on piezoelectric transducers, *Analysis*, 27, N° 7.[PDF Full Text]

- Berson S.A, Yalow R.S. (1959); Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184: 1648–9.
- Cass T. and Ligeler F. S., *Immobilized Biomolecules in Analysis : A practical approach*, Oxford University Press 1998, Cap. 1 e 3
- Chao C.-C, Ma Y.-S., and Stadtman E. R., (1997) Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems, *PNAS*, 94: 2969 - 2974.
- Gorton, L. (1995), Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells, *Electroanalysis* Vol 7, Issue 1, 23-45 .
- Hennion M.C. and Barcelo D., (1998), Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: a review, *Anal. Chim. Acta* 362, pp. 3–34. Abstract | PDF (309 K)
- LaBaer J., (2005) So, You Want to Look for Biomarkers (Introduction to the Special Biomarkers Issue) *Journal of Proteome Research*, Published on Web 06/30/2005, 4, 1053- 1059.
- Lu B., Iwuoha E. I., Smyth M. R. and O'Kennede R., (1997), Development of an "electrically wired" amperometric immunosensor for the determination of biotin based on a non-diffusional redox osmium polymer film containing an antibody to the enzyme label horseradish peroxidase, *Analytica Chimica Acta*, Volume 345, Issues 1-3, 20, pp. 59-66. [HTML Full Text]
- Riccardi C.S., Costa P.I., Yamanaka H., (2002), Immunossensor Amperométrico, *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 2, 316-320.
- Steward M W . (1979); Antibody affinity: immunogenetic aspects and relationship to immune complex disease. *Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 13: 120–125.
- Seger D., Gechtman Z., and Shaltiel S., (1998), Phosphorylation of Vitronectin by Casein Kinase II Identification of the Sites and their Promotion Of Cell Adhesion And Spreading, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, No. 38, 24805–24813,
- Zhou Y.-M, Hu S.Q., Shem G. L, Qin Y. R., (2003a), An amperometric immunosensor based on an electrochemically pretreated carbon-paraffin electrode for complement III (C3) assay, *Biosensors and Bioelectronics* 18 473-481.
- Zhou Y.-M., Wu Z.-Y., Shem G.-L. and Yu R.-Q., (2003b), An amperometric immunosensor based on Nafion-modified electrode for the determination of *Schistosoma japonicum* antibody, *Sens. Actuators B: Chem.* 89 pp. 292–298. SummaryPlus | Full Text + Links | PDF (198 K)

Autorización y Renuncia

Los autores autorizan a LACCEI para publicar el escrito en los procedimientos de la conferencia. LACCEI o los editores no son responsables ni por el contenido ni por las implicaciones de lo que esta expresado en el escrito

Authorization and Disclaimer

Authors authorize LACCEI to publish the paper in the conference proceedings. Neither LACCEI nor the editors are responsible either for the content or for the implications of what is expressed in the paper.