



*5° Encuentro de Jóvenes Investigadores – CONACYT
12° Coloquio de Jóvenes Talentos en la Investigación
Acapulco, Guerrero 4, 5 y 6 de octubre 2017
Memorias*

DETECCIÓN DE TRANSCRITOS A TRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA DE BIOIMPEDANCIA ELÉCTRICA

Arianne Ruby García Sánchez (Becaria)
Facultad de Ciencias Químicas-Biológicas de la UAGro
Programa AMC
garciasanchezarianne@gmail.com
Area II: Biológicas, Biomédicas y Químicas

Dr. César Antonio González Díaz (Asesor)
Profesor-Investigador del IPN
cgonzalezd@ipn.mx

Resumen:

La detección de transcritos a través de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica para identificar marcadores moleculares de la obesidad infantil es fundamental debido a que esta patología es un problema de salud mundial. Las técnicas actuales de detección demandan equipos y personal especializados. Son necesarias técnicas que permitan la detección de marcadores moleculares de manera rápida, económica y simple. En este estudio se presenta el desarrollo de un biosensor de detección de transcritos basado en mediciones de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica y se evalúa su potencial utilidad en la detección de un gen característico de la obesidad. Los resultados indican la factibilidad técnica de la detección de transcritos a través de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica.

Palabras clave: Bioimpedancia, biosensor, cADN.

Introducción:

La prevalencia de la obesidad infantil en las últimas décadas ha aumentado en todo el mundo, considerándose así, un problema de salud pública (Onis, *et al.*, 2010). Datos actuales asocian a la obesidad infantil con el desarrollo de diversas patologías en la edad adulta como hipertensión, cardiopatías, resistencia a la insulina y algunos tipos de cáncer (Reilly y Kelly, 2012). La patogenia de la obesidad es claramente compleja, involucrando interacciones múltiples entre factores sociales, ambientales y genéticos (Xia y Grant, 2013). El aumento de la prevalencia de la obesidad puede atribuirse en parte a la ingesta de alimentos con alto contenido calórico y al estilo de vida relativamente sedentario de los tiempos modernos, lo que ahora se considera una enfermedad pudo haber sido una ventaja en tiempos más primitivos (Xia y Grant, 2013), cuando el alto gasto de energía a través de la actividad física era un modo de vida. Así, aquellos con un genotipo llamado ahorrador tenían una ventaja de supervivencia debido a un uso más eficiente de calorías (Xia y Grant, 2013; Prentice, 2005).

En la actualidad diversos estudios han identificado el genotipo ahorrador como factor de riesgo para desarrollar obesidad (Lazar, 2005; Prentice, 2005). Dentro de este genotipo existen genes con mayor asociación al desarrollo de obesidad los cuales, en su gran mayoría ya están identificados y caracterizados. Estos genes se denominan marcadores moleculares (Ayub, *et al.*, 2014). Algunos marcadores moleculares de la obesidad son los genes de los transportadores de glucosa, el receptor de insulina, las interleucinas, entre otros (Bouchard, 1995; Petrasova, *et al.*, 2014).

Países como Estados Unidos han implementado a sus análisis de rutina el denominado *genetic testing*, un amplio diagnóstico molecular en el cual los pacientes y las familias se basan para el manejo de la atención de la salud, el pronóstico de enfermedades y la planificación familiar, y se benefician personalmente cuando se proporciona una respuesta a sus problemas de salud (Katsanis y Katsanis, 2013). Una técnica utilizada con este fin es la PCR blanco, la cual detecta una mutación específica de alelos. Tiene alta sensibilidad, especificidad, un tiempo de análisis no mayor a una semana, pero su costo aproximado es de \$400 dólares por alelo, siendo poco útil para la detección oportuna de anomalías genéticas (Katsanis y Katsanis, 2013). Otra técnica utilizada para el análisis genético es la secuenciación completa (WGS) ofrece la ventaja de determinar la ubicación exacta de los nucleótidos de un genoma, pero se ha demostrado que tiene baja sensibilidad, especificidad, un tiempo de análisis mayor a un mes y un costo mayor a los \$2000 dólares (Katsanis y Katsanis, 2013).

México enfrenta grandes retos de salud pública, en la actualidad ocupa el primer lugar en obesidad infantil por lo que es necesario implementar nuevas medidas preventivas, haciendo uso de la tecnología e información que se está generando a nivel mundial. Es necesaria la implementación de técnicas de análisis genéticos individualizados a bajos costos, rápidos y

simples de reproducir. Una propuesta a esta problemática es la detección de transcritos a través de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica.

La espectroscopia de bioimpedancia eléctrica estudia las propiedades eléctricas de los tejidos biológicos cuando la corriente fluye a través de ella (Khalil, *et. al.*, 2014). Se fundamenta en la ley de Ohm, donde se relaciona la impedancia con la intensidad y el voltaje: $\text{impedancia} = \text{voltaje} / \text{intensidad}$ (Sánchez-Iglesias, *et. al.*, 2012). Cuando la corriente eléctrica alterna circula por un medio, la impedancia depende en parte de la facilidad del medio para conducir la corriente, y es proporcional a la resistividad o mala conductividad del medio. Si el circuito eléctrico contiene además condensadores (sistemas constituidos por placas separadas por un medio aislante, en los que se acumula la carga eléctrica, que se libera cuando el sistema se satura), la impedancia también depende del número de condensadores que tenga que atravesar la corriente y de la facilidad de carga y descarga de éstos (capacidad). El componente de la impedancia (Z) debido a la mala conductividad del medio se denomina resistencia (R) y el componente debido a la acción de los condensadores recibe el nombre de reactancia capacitiva (Xc) o simplemente reactancia (Sánchez-Iglesias, *et. al.*, 2012). Por lo tanto, la bioimpedancia representa la oposición de un medio biológico al paso de una corriente alterna, y tiene los componentes de resistencia y reactancia. La resistencia está condicionada por la resistividad de los diferentes tejidos a la conducción de la corriente eléctrica (Sánchez-Iglesias, *et. al.*, 2012).

Si bien la obesidad se puede prevenir con cambios alimenticios y actividad física, son necesarios métodos de análisis con la capacidad de determinar el riesgo y/o susceptibilidad genética a desarrollar obesidad, así, una de las claves es la identificación de la mutación causal y caracterización de los genes que participan en su desarrollo, de forma tal que se pueda inferir la predisposición antes de que se manifieste la enfermedad. Sin embargo, identificar estas mutaciones demanda un conjunto de técnicas complejas, así como equipo y profesionistas de la salud altamente especializados. El desarrollo de biosensores para identificar marcadores moleculares es fundamental para la implementación de nuevas técnicas que permitan la detección de mutaciones genéticas de manera rápida, económica y simple. En este estudio se presentan la evaluación de la potencial utilidad de mediciones de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica en la detección de transcritos, para el efecto se presenta en términos generales, el desarrollo de un biosensor de ADN complementario basado en mediciones de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica, y se evalúa su potencial utilidad en la detección de un gen característico de obesidad. La perspectiva de aplicación clínica es que el análisis de transcritos a través de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica podría atender la creciente problemática de análisis genéticos en México relacionados a la obesidad de manera económica rápida y simple.

Materiales y Métodos:

Descripción de la Propuesta Tecnológica

El desarrollo del biosensor está basado en dos fundamentos:

1) Anclaje o inmovilización de cADN en una superficie de oro funcionalizada y embebida en un cristal de cuarzo, a su vez el cADN tiene la capacidad de hibridarse con una secuencia de oligonucleótidos específica, característica del gen interlucina-1 beta (IL-1 β) asociado a obesidad, y 2). La estimación de cambios de bioimpedancia eléctrica multifrecuencia como una función de la modificación de componentes moleculares y estructurales en la superficie de oro funcionalizada.

Descripción del sistema biosensor de cADN



Figura 1 Diagrama a bloques del diseño del sistema biosensor cADN.

El sistema biosensor de cADN está constituido por cuatro módulos: 1) Bomba de infusión, 2) Interfaz eléctrico-iónica, 3) Medidor de bioimpedancia ScioSpec y 4) Computadora Personal. La Bomba de infusión tiene adaptada una jeringa de insulina, esta realiza la infusión controlada de los analitos hacia la interfaz eléctrico-iónica por medio de un tubo capilar. La interfaz eléctrico-iónica alberga el cristal de cuarzo con superficie de oro funcionalizada, en éste módulo se realiza el proceso de anclaje de cADN e hibridación, así como la interconexión de los electrodos para medición de bioimpedancia.

El módulo Sciospec™ (ScioSpec, ISX-3, Alemania) es el instrumento que nos permite la interacción con el módulo interfaz eléctrico-iónico, inyecta una diferencia de potencial y a la vez mide la corriente para estimar la impedancia del sistema. La PC es el último módulo, en éste se realiza la programación del módulo ScioSpec y almacenamiento de los datos en formato manipulable (Fig. 2).

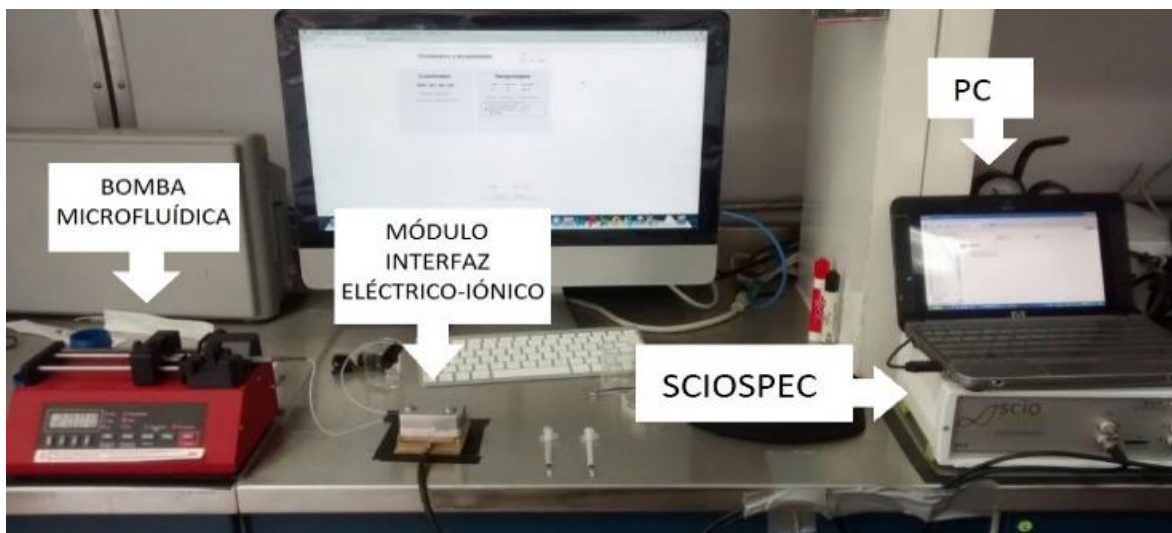


Figura 2 Descripción gráfica de los componentes del sistema del biosensor del cADN.

Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se obtuvo una muestra de sangre (5 mL) de 30 niños obesos y se clasificaron de acuerdo al IMC. El protocolo fue aprobado por el comité de ética e investigación de la Escuela Superior de Medicina-Instituto Politécnico Nacional (ESM-CE-01/03-12-2013).

Funcionalización e hibridación del cristal de cuarzo

Se utilizaron cristales de cuarzo recubiertos con una película fina de oro de 100 nm, con un diámetro 14 mm, espesor 0,3 mm y pulido ópticamente (Biolin Scientific Inc., EE.UU). El reactivo utilizado para la química superficial sobre oro fue 6-mercapto-1-hexanol (MCH). El reactivo para la química de la superficie se adquirió de Sigma Aldrich, México de grado molecular y se usó sin purificación adicional. Detalles adicionales respecto a la técnica de funcionalización e hibridación se detallan en “Funcionalización Específica para el Anclaje Covalente de ADN sobre Sustratos de Oro” (Perez-Vielma, 2015).

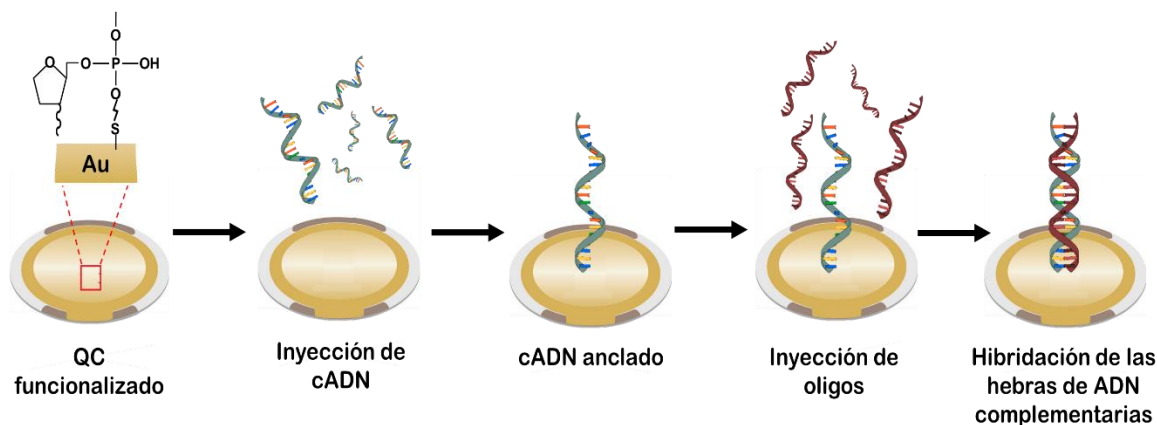


Figura 3 Esquema de cristal de cuarzo con superficie de oro funcionalizada y representación del anclaje de cADN e hibridación.

Diseño de oligonucleótidos.

Las secuencias del oligonucleótido utilizado se diseñaron en el software de Roche Diagnostics (<https://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>). Los pares de oligonucleótidos utilizados para la identificación de los fragmentos de IL-1 β fueron 5'-CTGTCCTGCGTGTGAAAGA-3' (forward) y 5'-TTGGGTAATTTTGGGATCTAC-3' (reverse).

Mediciones de espectroscopia de bioimpedancia

Las medidas de espectroscopia de bioimpedancia fueron realizadas a través de un espectrómetro ScioSpec ISX3 controlado por medio de un PC personal (HP mini 110-1100), se programó para realizar mediciones en un rango de frecuencias de 100Hz a 1MHz en 126 pasos logarítmicamente espaciados. Mediciones de bioimpedancia por triplicado se realizaron y almacenaron en sus componentes de resistencia y reactancia.

Diseño del experimento

El experimento para evaluar la potencial utilidad del sistema biosensor de cADN en la detección del gen de la citosina pro inflamatoria IL-1 β se describe como sigue: Los analitos se pasaron en un vehículo microfluídico a través de la interfaz eléctrico-iónica a fin de realizar el anclaje de cADN e hibridación con el oligonucleótido en cuatro pasos: 1) limpieza del sistema con agua purificada (agua Mili-Q), 2) anclaje de cADN en la superficie de oro funcionalizada, 3) hibridación del cADN con el oligonucleótido y 4) barrido de residuos con agua Mili-Q y medición de la bioimpedancia eléctrica multifrecuencia en la superficie de oro resultante. Cada paso de infusión de analitos se realizó en 12 minutos segmentados por un tiempo de relajación de 30 minutos (ver Fig. 4).

A fin de evidenciar cambios en la bioimpedancia eléctrica como una función de la modificación de componentes bioquímicos y estructurales en la superficie de oro resultante,

el experimento se diseñó en tres ensayos independientes a fin de generar las siguientes condiciones: A) Control.-sin anclaje de cADN ni hibridación, solo se hizo pasar agua Mili-Q en los cuatro pasos de anclaje hibridación, por lo que no existen cambios estructurales en la superficie funcionalizada. B) Gen IL-1 β .- anclaje de cADN e hibridación, se hizo pasar cADN y el oligonucleótido específico, por lo que existen cambios estructurales en la superficie funcionalizada debido a la complementación de ADN, y C) Control Negativo.- anclaje de cADN pero no hibridación, se hizo pasar cADN y un oligonucleótido inespecífico, por lo que existen cambios estructurales en la superficie funcionalizada debido solo al anclaje de cADN (ver fig. 4). Cada ensayo se realizó por triplicado. Al obtener las mediciones tanto de las partes resistivas como las reactivas se procedieron a determinar la magnitud y fase de cada uno, posterior a esto se realizó un promedio de las tres mediciones para magnitud y fase.

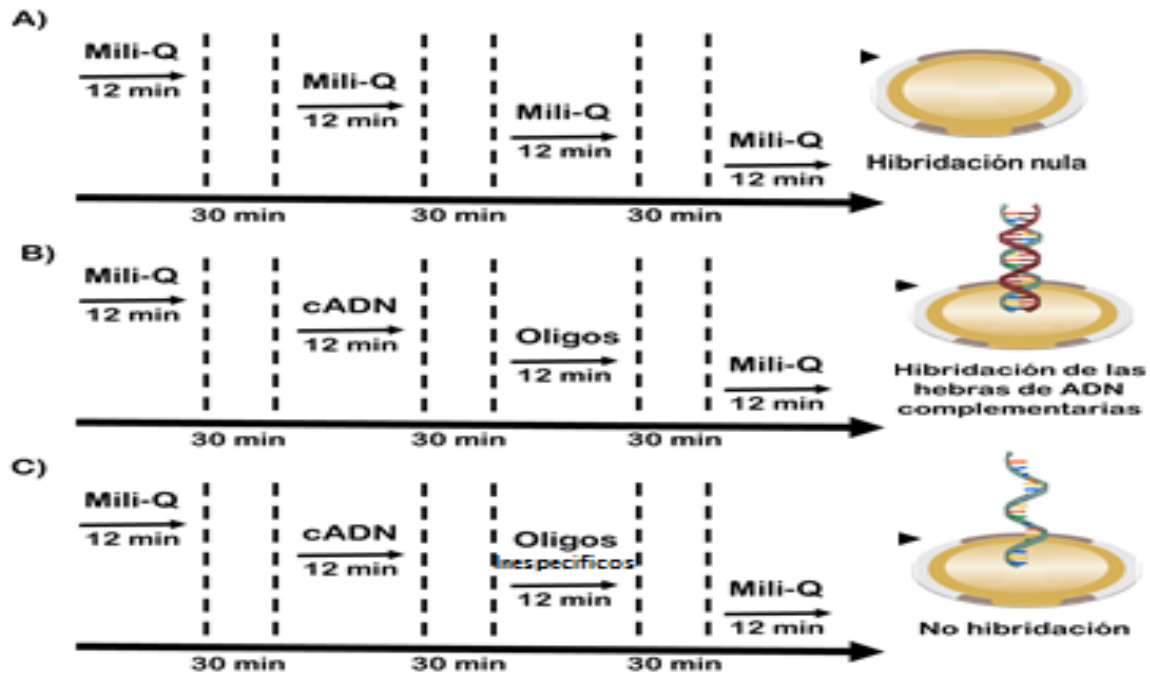


Figura 4 Diseño del experimento.- Cristales de cuarzo funcionalizados en el módulo interfaz eléctrico-iónico y se procedió infundir los analitos correspondientes. A) Control: Inyección de agua Mili-Q en todos los casos. B) Gen (IL-1 β): Inyección de agua Mili-Q, cADN, oligos específicos y barrido con Mili-Q. C) Control negativo: Inyección de agua Mili-Q, cADN, oligos inespecíficos y barrido con agua Mili-Q.

Resultados:

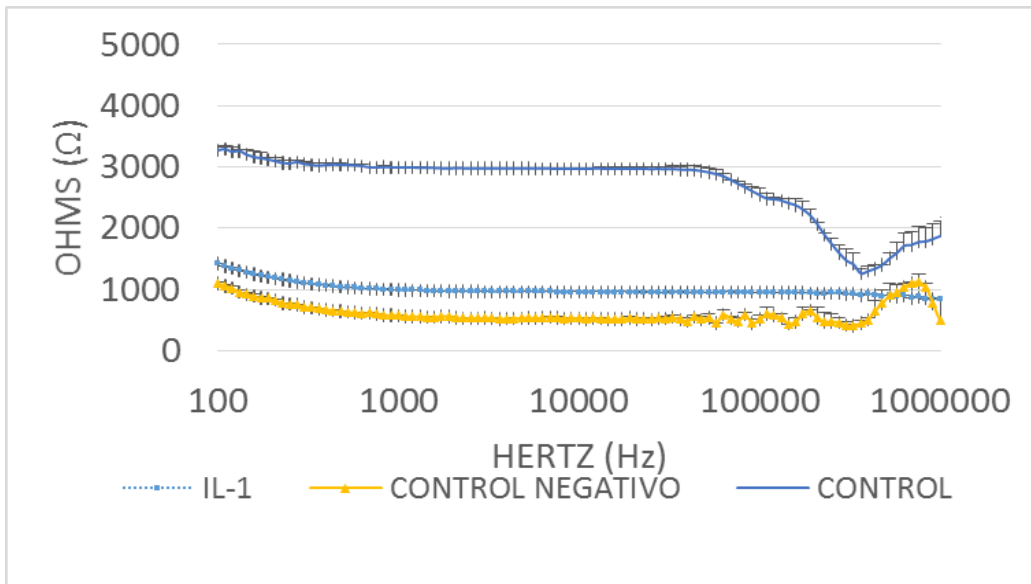


Figura 5 Espectros de Magnitud de Bioimpedancia Eléctrica resultantes en los tres ensayos: A) Control.- no anclaje de cADN o hibridación, B) Gen IL-1 β .- anclaje de cADN e hibridación de oligos específicos para el Gen IL-1 β , y C) Control Negativo.- anclaje de cADN pero no hibridación.

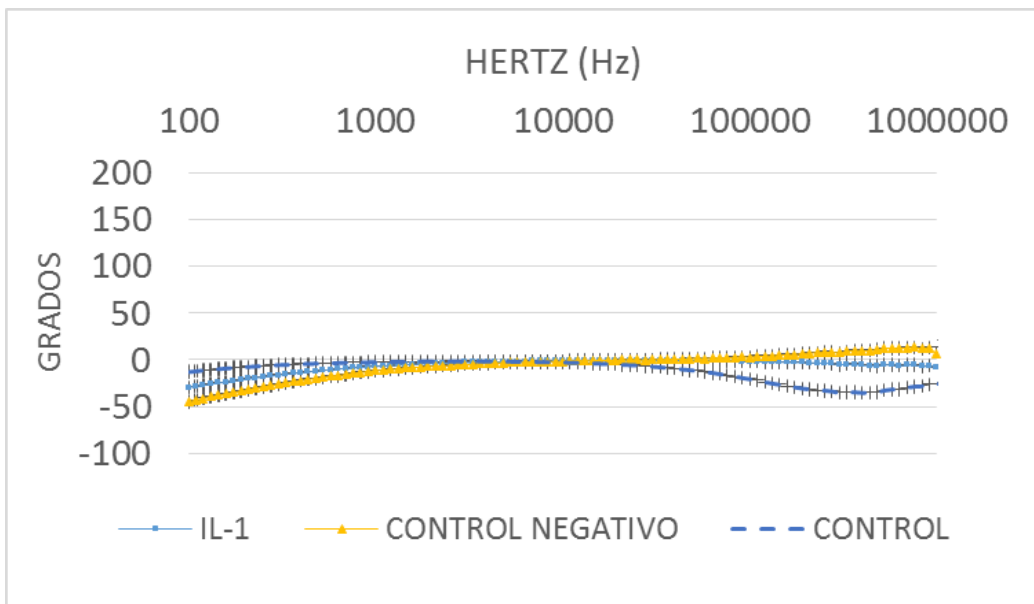


Figura 6 Espectros de Fase de Bioimpedancia eléctrica resultantes en los tres ensayos: A) Control.- no anclaje de cADN o hibridación, B) Gen IL-1 β .- anclaje de cADN e hibridación de oligos específicos para el Gen IL-1 β , y C) Control Negativo.- anclaje de cADN pero no hibridación.

En las figuras 5 y 6 se observan los espectros de bioimpedancia medido en magnitud y fase. Las muestras tienen un comportamiento visiblemente distinto. Se observa que la muestra denominada Gen IL-1 β y el control negativo muestran diferencias en los resultados debido a la hibridación de la muestra Gen IL-1 β .

Discusión y conclusiones:

Los cambios en las mediciones por bioimpedancia de condición a condición evidencian cambios estructurales sobre la superficie de oro, lo cual causa a su vez cambios en la conductividad eléctrica. Este cambio se atribuye a un incremento en la efectividad del intercambio eléctrico-iónico. Por lo que cuando se ancla el cADN observaremos un patrón característico a diferencia de cuando, además de anclarse, se hibrida. Los cambios diferenciables en la medición de la fase indican un cambio del componente reactivo del sistema y por lo tanto del efecto capacitivo en la interfaz eléctrico-iónica, causado por el cambio del contenido dieléctrico asociado a diferentes condiciones estructurales en la superficie. Por lo tanto, observamos cambios en la espectroscopia de bioimpedancia en las tres muestras (Control negativo, Gen IL-1 β y control negativo) debido a una modificación de la resistencia y reactancia de la interfaz eléctrico-iónico, aunque tales hipótesis aún son preliminares y las observaciones y hallazgos del presente estudio aún son materia de análisis y estudio en el grupo. Sin embargo, los resultados nos indican la factibilidad técnica de desarrollar un biosensor de marcadores moleculares a través de la inmovilización de cADN y su detección con mediciones de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica. Las observaciones demuestran que el sistema biosensor de cADN en desarrollo ofrece la posibilidad de detectar la hibridación del Gen IL-1 β .

Agradecimientos:

A la incansable labor del Dr. César Antonio González Díaz, para que sus educandos sean no sólo los mejores estudiantes, además personas comprometidas con la sociedad, el medio ambiente y el trabajo. Este estudio fue financiado en parte por el CONACYT a través del proyecto No. CB2012-180536. Las técnicas de funcionalización para inmovilización de cADN y biosensor basado en mediciones de bioimpedancia eléctrica están sustentadas en las solicitudes de patente IPN 2014MX/E/2014/057816 y González CA 2017MX/a/2017/010319, respectivamente. Los resultados del presente estudio han sido sometidos en co-autoría a las memorias del XL Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica - 2017.

Referencias:

Ayub Q., Moutsianas L., Chen Y., Panoutsopoulou K., Colonna V., Pagani L., Prokopenko I., Ritchie G., Smith C., McCarthy M., Zeggini E y Xue Y. Revisiting the Thrifty Gene Hypothesis via 65 Loci Associated with Susceptibility to Type 2 Diabetes. *The American Journal of Human Genetics* 94(2):176-185.

Bouchard C. (1995) The genetics of obesity: from genetic epidemiology to molecular markers. *Molecular Medicine Today* 1(1): 45-50.

Katsanis S. y Katsanis N. (2013) Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *Nature reviews* 14 415-426

Khalil S., Mohktar M. y Ibrahim F. (2014) The Theory and Fundamentals of Bioimpedance Analysis in Clinical Status Monitoring and Diagnosis of Diseases. *Sensors (Basel)* 14(6):10895-10928.

Lazar M. (2005) How Obesity Causes Diabetes: Not a Tall Tale. *Science* 407(5708): 373-375.

Onis M., Blossner M. y Borghi E. (2010) Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *American Society for Nutrition* 92(5):1257-1264.

Petrasova D., Bertkova I., Petrasova M., Hijova E., Marekova M., Babinska I., Jarcuska p., Pella. y Geckova A. (2014) Biomarkers associated with obesity and overweight in the Roma population residin in eastern Slovakia. *Central European Journal of Public Health* S18-21.

Prentice A. (2005) Early influences on human energy regulation: Thrifty genotypes and thrifty phenotypes. *Physiology and Behavior* 86(5):640-645.

Reilly J. y Kelly J.(2011) Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review. *International Journal of Obesity* 35 891-898.

Sanchez-Iglesias A., Fernández-Lucas M. y Teruel J. (2012) Fundamentos eléctricos de la bioimpedancia. *Nefrología (Madr)* 32(2).

Xia Q. y Grant S. (2013) The genetic of human obesity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1281(1): 178:190.