

Espectroscopía por bioimpedancia eléctrica sensible a concentraciones de ADN libre de marcaje o anclaje.

G. Ames-Lastra^{1*}, C. A. González-Díaz²

¹ Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, Ciudad de México, México.

² Escuela Superior de Medicina - Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

*bioing.ames@gmail.com

Resumen

Los países en vías de desarrollo tienen obstáculos en el acceso a servicios médicos de calidad debido a que hay alcance limitado a las nuevas tecnologías; tal es el caso de la medicina genética, donde las técnicas analíticas son complejas y costosas. En los años recientes, ha existido un interés por ofrecer alternativas a las técnicas convencionales; el desarrollo de genosensores ha llamado la atención en la última década por su instrumentación de bajo costo, su rapidez y su uso sencillo. En este trabajo, obtuvimos los espectros de bioimpedancia eléctrica, a partir de mediciones del parámetro de dispersión S21, en el rango de frecuencias de 2 a 100 MHz de 4 casos: 1) Productos totales de PCR para el gen ribosomal de la subunidad 16S extraídos de *Pseudomonas aeruginosa*. 2) Una dilución al 50% de los productos totales de PCR. 3) Productos endógenos extraídos de la misma célula, y 4) Agua destilada. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los casos en la gran mayoría del espectro, indicando su potencial uso en el diseño de un genosensor basado en mediciones de bioimpedancia eléctrica.

Palabras clave: ADN, Bioimpedancia, Espectroscopía, Genosensor, PCR..

1. Introducción

Los biosensores se han vuelto muy populares en los últimos 20 años. El desarrollo y la búsqueda de biosensores son de gran importancia en la vida diaria, ya que su aplicación puede tener un alto impacto social. Recientemente, el uso de biosensores ha aumentado y han sido populares en áreas como el análisis de alimentos, el medio ambiente y el monitoreo y diagnóstico de la salud [1, 2].

Las técnicas analíticas de detección genética convencionales generalmente toman numerosos y laboriosos pasos que requieren tiempo y dispositivos sofisticados de alto costo [1, 3, 4], lo que representa desventajas para el uso e implementación de estas tecnologías en países en vías de desarrollo. Por lo anterior, existe una necesidad de desarrollar equipos de detección genética rápidos, de bajo costo y que sean sencillos de utilizar para permitir la introducción de los avances en la medicina genética en los países subdesarrollados. Los biosensores de ácidos nucleicos (genosensores) son de gran interés debido a su gran potencial para obtener información relevante de secuencias específicas de manera rápida, simple y a un menor costo, en comparación con las técnicas tradicionales [1, 5].

La espectroscopía por bioimpedancia eléctrica (EBiS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que estudia la interacción de campos eléctricos alternos con un tejido biológico en un amplio rango de frecuencias. Esta técnica consiste en aplicar estímulos eléctricos (voltaje o corriente conocidos) a un material biológico y observar la corriente o el voltaje resultantes [6]. El estímulo puede aplicarse de distintas maneras, la mayoría de estudios por EBiS utilizan la inyección de corriente alterna para estimular el material bajo prueba (dentro de un rango definido de frecuencias) y medir el voltaje resultante en la muestra [7]. Así, se calcula la impedancia de la muestra para cada frecuencia. A la gráfica de impedancia contra frecuencia se le llama espectro de impedancia.

Se han reportado varios alcances para el desarrollo de genosensores utilizando las ventajas que las características electroquímicas del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la técnica EBiS ofrecen; se ha detectado la hibridación de ADN en un electrodo por medio de EBiS [4]. Otros alcances han utilizado otras técnicas electroquímicas como microarreglos eléctricos [8] o voltametría cíclica [5] para detectar la amplificación de ADN. El grupo de Diaz-Cartagena desarrolló un dispositivo que por medio de EBiS, detecta ciclo a ciclo la amplificación genética por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) [9]. Se reportan resultados prometedores, de cualquier manera, las tecnologías encontradas en la literatura presentan la desventaja de ser técnicas complejas pues algunos requieren de marcadores electroquímicos para la medición [9], o incluso la inmovilización de ADN de cadena simple en un electrodo para la detección de la hibridación con el ADN complementario (cADN) por medio de EBiS [10-14]. Sin embargo, se ha reportado que es posible realizar mediciones de EBiS en ADN sin ningún tipo de inmovilización o anclaje [15].

En este trabajo, realizamos un alcance empírico para determinar si los espectros de EBiS, obtenidos a partir de mediciones del parámetro de dispersión eléctrica S_{21} reportadas en un trabajo precedente [16], son sensibles a la concentración de ADN suspendido en agua destilada libre de etiquetas o inmovilización. Es decir, si es posible detectar distintas concentraciones de ADN por medio de mediciones de EBiS, para determinar su utilidad en el desarrollo de un genosensor por medio de mediciones de bioimpedancia eléctrica.

2. Metodología

2.1 Diseño experimental

Cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* se llevaron a cabo por medio de técnicas estándar. Se extrajeron los ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNA, por sus siglas en inglés) y se obtuvieron los productos endógenos de la célula, se realizaron sobre las muestras PCR cuantitativos por Retro Transcriptasa (RT-qPCR, por sus siglas en inglés) para la amplificación del gen ribosomal de la subunidad 16S. En este punto se tenían 4 casos: 1) Productos totales del PCR. 2) Una dilución a 50% de los productos totales de PCR. 3) Productos endógenos de la célula, y 4) Agua destilada. Se realizaron mediciones de los parámetros de dispersión eléctrica S_{21} sobre los casos. La metodología detallada se encuentra documentada en el trabajo precedente [16]. Los datos obtenidos se convirtieron a bioimpedancia (magnitud y fase) y los resultados se contrastaron con la medición de concentración de ADN en las muestras. Cada ensayo se realizó por triplicado.

2.2 Extracción y amplificación del gen de la subunidad ribosomal 16S

La metodología detallada de la extracción y amplificación del gen en cuestión se encuentra en [16]. Brevemente, una muestra de 2 mL de suspensión celular se usó para la extracción de mRNA totales y sus productos endógenos utilizando el kit comercial EZ-RNA and total RNA isolation kit (Biological Industries, USA). Al mRNA extraído y a los productos endógenos se les realizó RT-qPCR para la amplificación del gen de la subunidad ribosomal 16S. Los reactivos utilizados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Cantidad de los reactivos para PCR. Datos extraídos de [16].

Reactivos	Cantidad para una reacción, μL
PCR mix	12.5
Cebador delantero	2.5
Cebador trasero	2.5
cDNA	7.5
Volumen total	25

Los ciclos de temperatura para el PCR se detallan en la Tabla 2. Se midió la concentración de ADN de los casos utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Tabla 2: Parámetros de termociclado del PCR. Datos extraídos de [16].

Paso	Temp (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	30 sec
Desnaturalización	95	5 sec
Union del cebador	55	10 sec
Extensión	72	30 sec
Extensión final	72	5 min

2.3 Mediciones de parámetros S21 y conversión a EBiS

La metodología empleada para la medición de parámetros S21 se encuentra reportada detalladamente en [16]. Brevemente, el sistema para las mediciones de los parámetros S21 se implementó utilizando cubetas de electroporación de 2 mm de distancia entre electrodos, como contenedor de las muestras, conectado a un sistema Vector Network Analyzer (modelo N9923A, Keysight Inc. CA, USA) para las mediciones eléctricas. El parámetro S21 se midió en el rango de frecuencia de 2 a 100 MHz con incrementos logarítmicos y se convirtieron a impedancia por medio de la ecuación 1, como lo indica el fabricante del equipo.

$$Z_t = Z_o * \frac{2(1-S_{21})}{S_{21}} \quad (1)$$

Donde, Z_t es la impedancia de transmisión, en este caso la impedancia de la muestra, Z_o es la impedancia del sistema en ausencia de excitación (50 ohms, proporcionada por el fabricante) y S_{21} es el valor del parámetro S21 medido por el sistema.

De la conversión de los datos de S21, se obtuvieron los espectros de bioimpedancia (magnitud y fase) con respecto a la frecuencia de la señal de excitación.

2.4 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas ANOVA con la media de las mediciones de cada frecuencia para verificar si existen diferencias estadísticas en las muestras. Después, se realizaron pruebas Tukey post hoc para cada frecuencia en las que la prueba ANOVA arrojó diferencias significativas. El valor de referencia para determinar significancia estadística fue de $\alpha=0.05$. Todos los cálculos y análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software RKWard.

3. Resultados

Los resultados de la medición de concentración de ADN se muestran en la Tabla 3. Se observa que el caso con mayor concentración de ADN son los productos totales de PCR, la dilución es aproximadamente al 50%, el grupo de los productos endógenos tiene menor concentración que los dos casos anteriores y el agua destilada no contiene material genético.

Tabla 3: Concentración de ADN de los casos. Datos extraídos de [16].

Casos	Concentración (ng/ μ l)
Productos totales de PCR	1859.6
Dilución al ~50%	876.1
Control	368
Agua destilada	0

La Fig. 1 muestra el promedio del espectro de bioimpedancia (magnitud) de los casos con sus desviaciones estándar y las respectivas concentraciones de ADN. El caso de agua destilada presentó mediciones con dos órdenes de magnitud por arriba de los demás casos en una gran parte del espectro. Se observa una relación inversa entre la concentración y la magnitud de bioimpedancia de los casos. Se aprecia que la dispersión de los datos es baja. Se presentaron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) entre todos los casos en el rango de frecuencias de 2 hasta 75.5 MHz; en esta última las diferencias entre los productos totales y la dilución fueron solo significativas ($p = 0.03$). En el rango de 77 a 79 MHz las diferencias entre los productos totales y la dilución pierden significancia estadística. La significancia estadística se recupera entre todos los casos para frecuencias superiores.

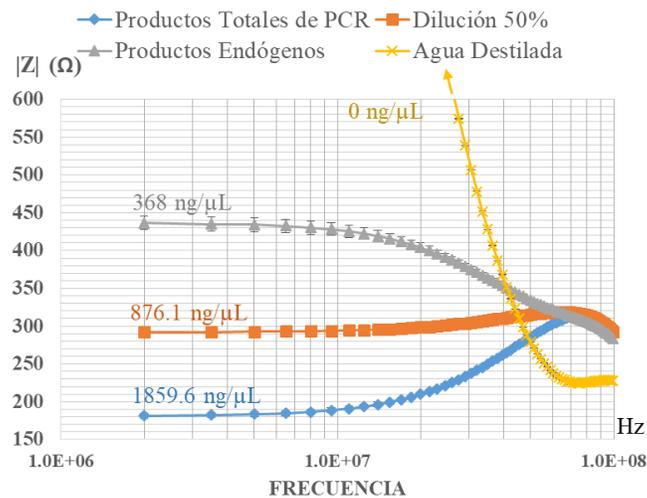


Fig. 1. Magnitud del espectro de bioimpedancia de los casos con sus concentraciones de ADN respectivas.

En la Fig. 2 se muestran los promedios del espectro del ángulo de fase con sus desviaciones estándar. A los 2 MHz, se presentaron diferencias significativas entre los productos totales y la dilución, y las diferencias entre los demás casos fueron altamente significativas. Para frecuencias superiores, todos los casos presentaron diferencias altamente significativas entre ellos. Se observa una relación directa entre la concentración de ADN y el ángulo de fase.

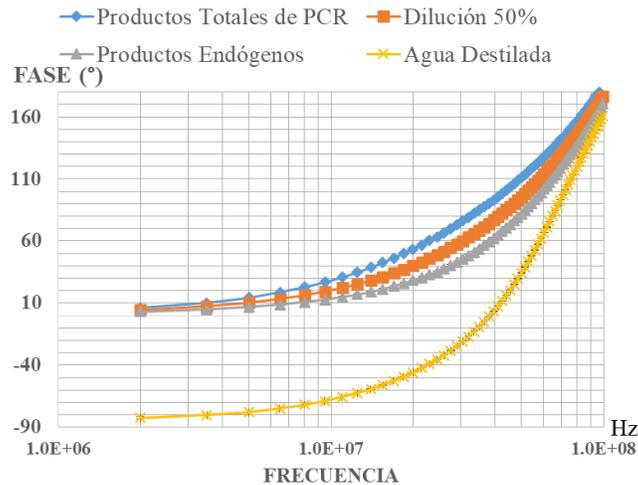


Fig. 2. Ángulo de fase del espectro de bioimpedancia de los casos.

4. Discusión y conclusión

En la Fig. 1, los espectros de magnitud de bioimpedancia presentaron diferencias en todo el espectro. En las frecuencias más altas, las diferencias entre los casos son menos evidentes, aun así, resultaron significativas. Esto puede deberse a la baja dispersión que presentaron las mediciones. Sin embargo, en el rango de frecuencias de 2 a 40 MHz, las diferencias están mayormente pronunciadas y los valores parecen estar relacionados con la concentración de ADN de cada uno de los casos, siendo posiblemente éste el rango de frecuencias más adecuado para la detección de concentraciones de ADN por medio de mediciones de bioimpedancia. La magnitud de bioimpedancia presenta una relación inversa con la concentración de ADN, lo cual puede deberse a que las moléculas de ADN tienen carga negativa, por lo que la cantidad de moléculas eléctricamente cargadas diluidas el medio, tiene un efecto directo aumentando la conductividad y afectando las propiedades eléctricas de la muestra. Además, como la dispersión gamma resulta de la relajación del dipolo de la molécula de agua y ésta se presenta en frecuencias altas [6], como las seleccionadas para este estudio, creemos que existe una interacción cinética entre las moléculas de agua y el ADN, teniendo efecto en la bioimpedancia de la muestra en función de la concentración de ADN.

La fase presentó diferencias significativas en todo el espectro. Las diferencias aparecen más pronunciadas en el rango de frecuencias de 10 a 50 MHz y parecen estar relacionadas con la concentración de ADN. Sin embargo, el comportamiento de la fase resulta inesperado, pues si se piensa en la cubeta de electroporación como un capacitor de placas paralelas donde el medio dieléctrico es el agua destilada, al agregar moléculas cargadas al medio, se esperaría que la característica dieléctrica del agua destilada disminuyera, como se observó en la magnitud, y así el efecto capacitivo de la muestra disminuiría. Sin embargo, ocurrió lo contrario, a mayor concentración de ADN, mayor fue el ángulo de desfase. Creemos que nuestros resultados se deben a que las características eléctricas de la cubeta de electroporación están introduciendo capacitancias parásitas a la medición, interfiriendo con la medición de fase de las muestras. Más estudios son necesarios para confirmar nuestros hallazgos y entender mejor el fenómeno de la bioimpedancia eléctrica de las moléculas de ADN.

En este trabajo, se comprobó que las mediciones de EBiS de muestras de ADN, son sensibles a la concentración de ADN, por lo que resulta posible el uso de la bioimpedancia como parámetro sensible en el diseño de un biosensor de ADN libre de etiquetas o inmovilización, disminuyendo potencialmente

el costo y la complejidad de la técnica, comparada con las técnicas analíticas convencionales. Como trabajo a futuro se propone implementar estudios similares donde se realicen mediciones a distintos genes, para determinar si la longitud del gen en cuestión tiene efectos en la bioimpedancia del sistema.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés para este trabajo.

Agradecimientos

Las mediciones del parámetro S21 sobre las muestras se realizaron en la “Porter School of Environmental and Earth Sciences” de la Universidad de Tel Aviv, Israel, como parte de la estancia sabática de CAGD financiada por el Instituto Politécnico Nacional y CONACYT. GAL es estudiante de maestría en el programa de Posgrado en Ingeniería Biomédica de la Universidad Autónoma Metropolitana y recibió apoyo económico por parte de CONACYT (CVU: 821204).

Referencias

- [1] V. Kavita, “DNA Biosensors - A Review.” *J Bioengineer & Biomedical Sci* vol. 7, no. 2, 222 April, 2017.
- [2] M. Koets, T. van der Wijk, J.T.W.M. van Eemeren, A. van Amerongen and M. W. J. Prins, “Rapid DNA multi-analyte immunoassay on a magneto-resistance biosensor.” *Biosens. Bioelectron.* vol 24, no. 7, pp. 1893-1898, March, 2009.
- [3] D. Zhang, Y. Yan, Q. Li, T. Yua, W. Cheng, *et al.* “Label-free and high-sensitive detection of Salmonella using a surface plasmon resonance DNA-based biosensor.” *J. Biotechnol.* Vol. 160, pp. 123– 128, 2012.
- [4] C. Luo, H. Tang, W. Cheng, Y. Li, D. Zhang, *et al.* “A sensitive electrochemical DNA biosensor for specific detection of Enterobacteriaceae bacteria by Exonuclease III-assisted signal amplification.” *Biosens. Bioelectron.* vol 48, pp. 132–137, Oct., 2013.
- [5] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa and C. Adley, "Design of a real time biorecognition system to detect foodborne pathogens-DNA biosensor," In: *IEEE SAS*, New Orleans, LA, USA, 2009, pp. 38-42.
- [6] F. Simini and P. Bertemes-Filho, “Electrical Impedance Spectroscopy” in *Bioimpedance in Biomedical Applications and Research*. 1st ed, Cham, Switzerland: Springer, 2018, ch. 2, pp. 5-27.
- [7] P. Bertemes-Filho, “Characterization using and impedance spectroscopy probe.” Ph.D. Thesis, dept. Med. Phys. Clin. Eng. TUOS. Sheff, Eng. 2002.
- [8] B. Elsholz, A. Nitsche, J. Achenbach, H. Ellerbrok, L. Blohm, *et al.* “Electrical microarrays for highly sensitive detection of multiplex PCR products from biological agents.” *Biosens. Bioelectron.* Vol. 24, no. 6, pp. 1737-1743, Sept. 2009.
- [9] D. Díaz-Cartagena, R. Gomez-Moreno, L. Cunci, E.M. Diaz-Diaz, R. Cunci, *et al.* “Real-Time Impedimetric detection of DNA amplification by PCR using electrochemical impedance spectroscopy.” *SMEQ MTS ABSTR*, Cun, Q. Roo, México, 2014, no. 658.
- [10] J. Kafka, O. Pänke, B. Abendroth and F. Lisdat. “A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy.” *Electrochim. Acta.* Vol. 53, no. 25, pp. 7467–7474, Oct, 2008.

- [11] K. V. Chávez-Baldenebro, A. R. García, M. Gómez-López, N.M. Pérez-Vielma, J. Delgado J, *et al.* “Biosensor de ADN complementario basado en mediciones de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica.” Mem. XL Natl. Conf. of Biomed. Eng. Monterrey, México, 2018, pp. 450-453.
- [12] L. Ribovski, V. Zucolotto and B. C. Janegitz, “A label-free electrochemical DNA sensor to identify breast cancer susceptibility.” *J. Microchem.* Vol. 133, pp. 37–42, Jul, 2017.
- [13] A. A. Ensafi, M. Tabei, H. R. Rahmani and T. Khayamian, “Sensitive DNA impedance biosensor for detection of cancer, chronic lymphocytic leukemia, based on gold nanoparticles/gold modified electrode.” *Electrochim. Acta.* Vol. 56, no. 24, pp. 8176–8183. Oct, 2011.
- [14] C.A. Marquette, I. Lawrence, C. Polychronakos and M.F. Lawrence, “Impedance based DNA chip for direct Tm measurement.” *Talanta.* Vol. 56, no. 4, pp. 763–768, Mar, 2001.
- [15] M. Hanbin, R.W.R. Wallbank, C. Reza, L. Jahao, Y. Suzuki, *et al.* “An impedance-based integrated biosensor for suspended DNA characterization.” *Sci. Rep.* Vol. 3, no. 2730, Sept, 2013.
- [16] R. Gnaim, J. Sheviriyov, A. Golberg, G. Ames, M. Oziel, *et al.* “Label-Free cDNA Detection Based on Radiofrequency Scattering Parameters: A New Approach for an Inexpensive Gene Sensor.” *J. Med. Devices.* Vol.14, no. 1: 014502, Jan, 2020.