

Análisis de la Correlación de Concentración de ADN vs Bioimpedancia Eléctrica para asistir diagnóstico COVID-19

A. Hernández^{1,3}, I.A. Castillo^{2,3} y C.A. González³

¹ Universidad Politécnica de Gómez Palacio, Durango, México.

² Instituto Tecnológico de Hermosillo, Sonora, México.

³ Instituto Politécnico Nacional-Escuela Superior de Medicina, CDMX, México
cgonzalezd@ipn.mx

Resumen

La diseminación mundial del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 introdujo la necesidad urgente de crear técnicas rápidas para su detección con el objetivo de asistir el diagnóstico de la enfermedad Covid-19. En este trabajo se estudió la relación que guardan diferentes concentraciones de ADN con sus propiedades eléctricas asociadas a bioimpedancia eléctrica como fundamento de un biosensor para detección de genes. Se estimó la función que caracteriza la correlación ADN vs Bioimpedancia eléctrica a través del método de regresión por mínimos cuadrados, así como el diseño de una interfaz gráfica para albergar dicha función y sincronizar el sistema biosensor. Los resultados indican que a través de una función lineal es factible determinar la concentración de ADN a partir de mediciones de bioimpedancia eléctrica, y que dicha función sería posible programar como núcleo de una interfaz gráfica biosensor-usuario. Estudios adicionales asociados a características no lineales de la relación ADN vs bioimpedancia eléctrica aún son necesarios, sin embargo, los resultados preliminares indican factibilidad de emplear la técnica propuesta para la detección de genes, y eventualmente utilizarse en la detección de SARS-CoV-2 para asistir el diagnóstico de COVID-19.

Palabras clave: ADN, Bioimpedancia eléctrica, Biosensor, Covid-19, Sars-Cov-2.

1. Introducción

La propagación del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 y la declaración de la Organización Mundial de la Salud de tal expansión como pandemia, introdujo la necesidad urgente de técnicas rápidas para detectar el virus [1]. La elevada tasa de contagios incrementó la investigación y el número de ensayos serológicos para asistir el diagnóstico de Covid-19 [2]. Las técnicas rápidas más utilizadas para detectar el virus son aquellas basadas en anticuerpos, sin embargo, estas pruebas no proporcionan una total fiabilidad debido a su baja sensibilidad y baja especificidad. Para obtener diagnósticos confiables suele recurrirse a técnicas complejas y costosas como lo es la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) la cual difícilmente se encuentran disponibles en centros de atención de la salud de primer y segundo nivel [1-2].

Los avances recientes en el desarrollo de biosensores sensibles y específicos han abierto nuevas oportunidades para tecnologías basadas en el reconocimiento de ácidos nucleicos, y se están desarrollando para el ensayo de pruebas rápidas, simples y económicas de enfermedades tanto genéticas como infecciosas. Los biosensores de ADN y los chips genéticos son de gran interés debido a su potencial para obtener información específica de secuencias de ADN [3]. Actualmente, los biosensores electroquímicos se utilizan como una alternativa rápida y económica del método de RT-PCR [3]. En investigaciones recientes, los biosensores son utilizados para la identificación y caracterización genética

de enfermedades como la salmonela, el papiloma humano o el cáncer de mama [4-6]. SARS-CoV-2 puede ser detectado por técnicas de medicina genética como lo son los biosensores de ácidos nucleicos. Asimismo, los biosensores basados en impedancia eléctrica tienen un potencial significativo para su uso como dispositivos de detección sencillos y económicos, debido a su tamaño, rapidez y funcionamiento libre de marcado [7].

El fundamento biofísico de nuestra propuesta se centra en la hipótesis de que corrientes inducidas a frecuencias centradas en la parte baja de la banda de dispersión gama promueven el efecto dipolo de la molécula de agua e interactúan con la carga electronegativa de la molécula de ADN, tal interacción es una función de la concentración de ADN y se correlaciona con cambios en las propiedades de permitividad y conductividad eléctrica volumétrica de la muestra, lo anterior puede ser asociado a cambios en bioimpedancia para detección de genes (secuencia específica de ácidos nucleicos). En este trabajo presentamos un análisis de correlación ADN vs bioimpedancia eléctrica como primer paso para definir la viabilidad del fundamento técnico del biosensor propuesto, adicionalmente diseñamos el bosquejo general de una interfaz gráfica usuario-biosensor con la capacidad de albergar un algoritmo de correlación ADN vs bioimpedancia en un entorno amigable con el posible usuario final. El trabajo representa una primera aproximación para contribuir con el desarrollo de un biosensor susceptible de detectar un gen característico del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 y su potencial utilidad para asistir el diagnóstico de COVID-19.

2. Metodología

El desarrollo de este trabajo se divide metodológicamente en 2 secciones: 1.- Función de correlación ADN vs Bioimpedancia eléctrica, y 2.- Interfaz gráfica usuario-biosensor.

2.1 Función de correlación

El parámetro de dispersión S21 (coeficiente de transmisión en sentido directo) permite analizar la eficiencia de transmisión y reflexión de energía en un medio como una función de su contenido, en este caso el analito (muestra con contenido de ADN) es visto como una línea de transmisión con propiedades eléctricas que determinan también su bioimpedancia. Se estimó la función que caracteriza la correlación de diferentes concentraciones de ADN con el parámetro de dispersión S21 asociado a bioimpedancia eléctrica, a través de un análisis de regresión lineal. Se emplearon datos experimentales obtenidos en estudios previos [8], parámetros de dispersión S21 (magnitud y fase) medidos para diferentes concentraciones de ADN del gen de la subunidad ribosomal 16S característico de los microorganismos *S. epidermis* y *P. aeruginosa*, medidos a una frecuencia de 10 MHz [8- 9]. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Datos experimentales de concentración de ADN y parámetros S21 en distintas muestras [8].

Muestras	S21 Magnitud 10 MHz (dB)	[cDNA] (ng/μl)
	<i>x</i>	<i>y</i>
<i>S. epidermis</i> (G+)	0.379	1383.4
<i>S. Epidermis</i> 50% disolución (G+)	0.276	730.0
Control (G+)	0.259	285.0
<i>P. aeruginosa</i> (G-)	0.355	1859.6
<i>P. aeruginosa</i> 50% disolución (G-)	0.256	876.1
Control (G-)	0.189	368.0

En el presente estudio se consideró la magnitud del parámetro S21 para analizar las propiedades eléctricas del ADN asociadas a bioimpedancia eléctrica (columna x) medido a diferentes concentraciones de ADN (columna y). Se determinó la ecuación lineal que modela a los datos mediante el método de ajuste por mínimos cuadrados descrito por Espinosa *et al.* en 2016 [10]:

$$y = a + bx \tag{1}$$

Donde:

$$a = \frac{\sum y - b\sum x}{n} \tag{2}$$

$$b = \frac{n\sum xy - \sum x\sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2} \tag{3}$$

n = corresponde al número de datos.

El coeficiente de correlación r nos indica el grado de dependencia entre las variables x y y , con:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2} \sqrt{\sum (y - \bar{y})^2}} \tag{4}$$

2.2 Interfaz gráfica

El diseño de la interfaz gráfica se orientó para albergar el algoritmo de correlación de concentración de ADN vs bioimpedancia eléctrica y a su vez sincronizar el sistema biosensor, de tal forma que mediciones de bioimpedancia eléctrica se muestren al usuario final como su equivalente concentración de ADN presente en la muestra. El principio de funcionamiento de la interfaz gráfica se ilustra en el diagrama de flujo de la Fig. 1.

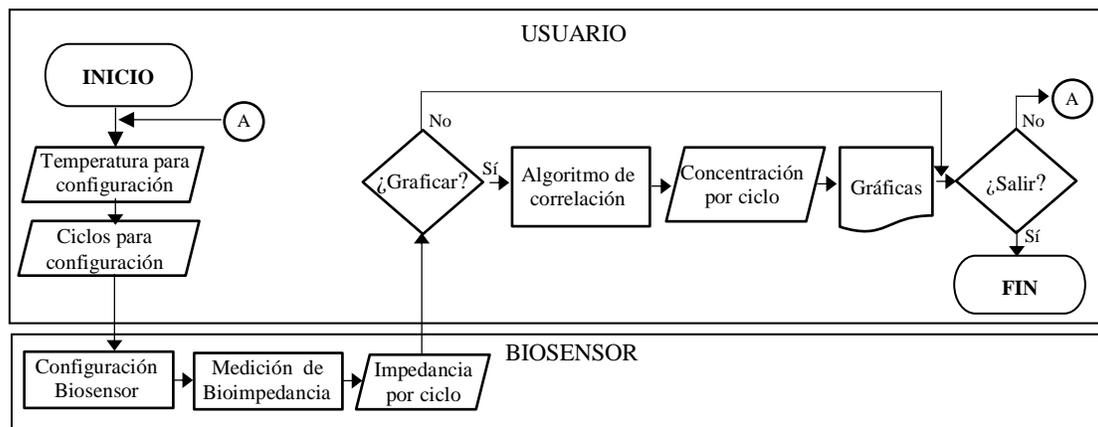


Fig. 1. Diagrama de flujo que representa el funcionamiento de la interfaz gráfica usuario-biosensor.

Tomando como base el diagrama anterior, la interfaz gráfica iniciará con una ventana en la que el usuario podrá introducir los parámetros de configuración del sistema biosensor, tales como temperaturas y número de ciclos para la reacción PCR y la amplificación del gen de interés en la muestra, dichos datos serán enviados al microcontrolador del biosensor mediante comunicación serial para dar inicio a la amplificación y medición de los parámetros de bioimpedancia. En la salida del biosensor se tendrán los valores de impedancia por cada ciclo de amplificación.

Al recibir las mediciones de bioimpedancia eléctrica por ciclo, el programa comienza la interpretación de los datos introduciéndolos a la función de correlación estimada en la subsección previa, la cual se encargará de transformarlos de impedancia/ciclo a concentración/ciclo. Para finalizar, los valores obtenidos hasta este punto son mostrados en una segunda ventana que contiene dos gráficos: un gráfico de barras de concentración y una gráfica de correlación.

La implementación del código que genera la interfaz gráfica de usuario se programó en lenguaje Python versión 3.8.3 con el apoyo del IDE Visual Studio Code, utilizando Windows 10 como sistema operativo.

3. Resultados y Discusión

3.1 Resultados

El algoritmo de correlación, obtenido a partir de la regresión lineal, corresponde a la siguiente ecuación:

$$y = -1,198.992 + 7,407.266x \quad (5)$$

Los coeficientes $-1,198.992$ y $7,407.266$ definen la recta. El coeficiente $7,407.266$ es la pendiente de la recta; el cambio medio que se obtiene en la concentración de ADN (y) por cada unidad de bioimpedancia eléctrica (x) le corresponde un incremento de $7,407.266$ de concentración de ADN (y). La Fig. 2 muestra los datos experimentales de concentración de ADN por cada unidad de bioimpedancia eléctrica respecto a los datos estimados por la ecuación (5).

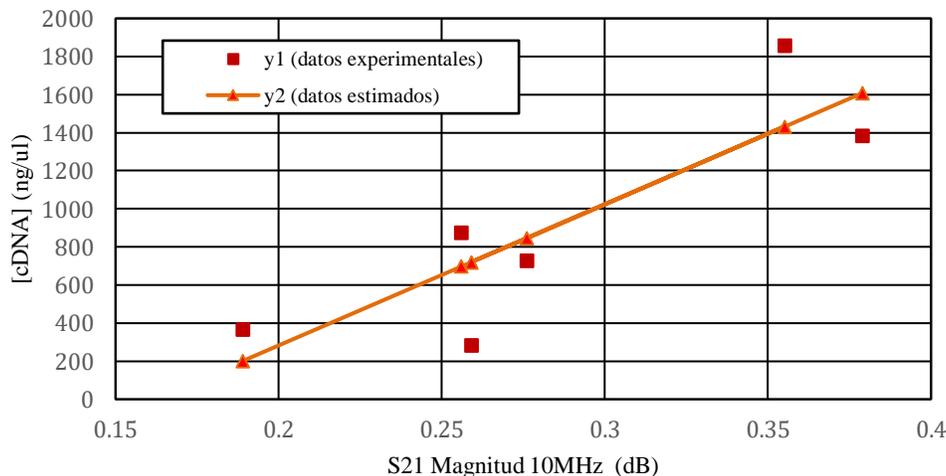


Fig. 2. Gráfico de dispersión de x vs y de datos experimentales y estimados mediante la función de correlación (y_1 : datos experimentales, y_2 datos estimados).

Por otro lado, el coeficiente de correlación obtenido fue de $r=0.854$ indicando que existe una correlación positiva, es decir, las dos variables se correlacionan en sentido directo.

Con relación a la interfaz de usuario implementada, los resultados se muestran en la Fig. 3 y 4, donde se presentan las dos fases principales del presente trabajo: los datos para configurar el biosensor y los gráficos que se reflejaran como resultado, respectivamente.

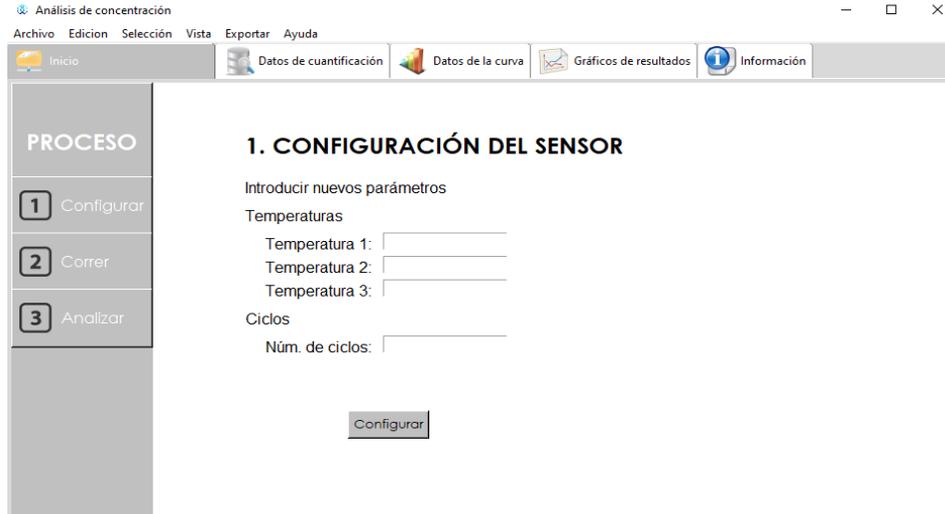


Fig. 3. Ventana inicial de la interfaz gráfica, aquí se solicitan datos necesarios para la configuración del biosensor.

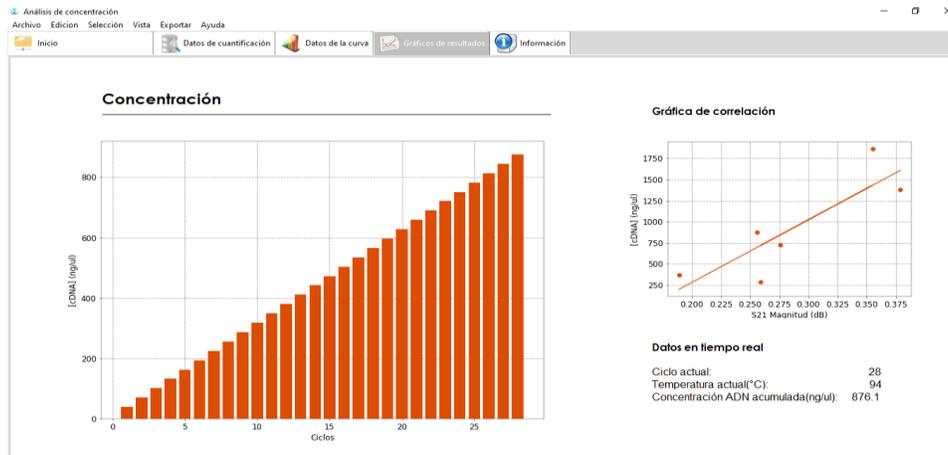


Fig. 4. Ventana de gráficos de la interfaz, muestra los resultados que arroja el algoritmo de correlación entre ADN y Bioimpedancia eléctrica. Para efectos de representación gráfica los datos presentados representan la simulación de un proceso de amplificación de ADN por PCR.

3.2 Discusión

Teniendo en cuenta el resultado de la ecuación 4, entre los datos de concentración de ADN y parámetros de dispersión S21 de las muestras existe una correlación positiva y significativa estadísticamente. Lo anterior, quiere decir que es posible utilizar la bioimpedancia eléctrica para estimar la concentración de ADN presente en una muestra. Sin embargo, la función de correlación presentada en este trabajo se limitó a trabajar solamente con los parámetros de magnitud S21, por lo que para una aproximación más exacta es necesario considerar también la fase S21, la complejidad en cuanto al número de pares de bases nitrogenadas, la concentración de la muestra, así como el número de datos disponibles. Un análisis del error de estimación es necesario para una mejor caracterización del algoritmo de correlación concentración de ADN vs Bioimpedancia Eléctrica, sin embargo tal análisis no está dentro del alcance del presente trabajo.

En tanto a la interfaz gráfica, cumple su principio de funcionalidad al albergar la función de correlación ADN vs Bioimpedancia eléctrica, así como crear una comunicación amigable entre el usuario y el biosensor, además de presentar los resultados de una forma atractiva para el usuario. Sin embargo, para una versión en extenso del proyecto es necesario implementar un diseño de interfaz más apegado al de un equipo de laboratorio en el cual se visualicen todos los datos medidos por el biosensor con sus respectivos tiempos, temperaturas, ciclos entre otros parámetros importantes, además de brindarle al usuario herramientas de análisis de datos más eficientes y la posibilidad de crear un entorno personalizado.

4. Conclusión

El presente trabajo demostró que a través de una función lineal es factible determinar diferentes concentraciones de ADN del gen de la subunidad ribosomal 16S, basándose en las mediciones de sus propiedades eléctricas asociadas a bioimpedancia. Por lo tanto, la técnica propuesta es susceptible de emplearse para una eventual detección de genes característicos del virus SARS-CoV-2 como una alternativa para asistir el diagnóstico rápido de la enfermedad Covid-19.

Declaración de conflictos de interés

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

Agradecimientos

AH e IAC agradecen la paciencia, tiempo y dedicación del Dr. César Antonio González Díaz en la tutoría y realización del presente trabajo. Se agradece al Ing. Ángel Eduardo Gaxiola Javier por su asesoría en lo que concierne a la interfaz gráfica de usuario. A la M. en C. Janeth Alejandra Soto Muñoz por su asesoría en cuanto al análisis de correlación. Y a la Academia Mexicana de Ciencias por el apoyo recibido para realizar este proyecto de investigación como becarias del programa “XXX Verano de la Investigación Científica”.

Referencias

- [1] Pang J, Wang MX, Ang IYH, *et al.* Potential Rapid Diagnostics, Vaccine and Therapeutics for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV): A Systematic Review. *J. Clin. Med.* 2020; 9(3):623
- [2] Meza JM., Estrada AD., Chabusa CB., *et al.* Utilidad de pruebas de cadena de polimerasa, pruebas rápidas y tomografías en pacientes con Covid-19. *J. Am Health.* 2020; 3(2):32-29.
- [3] Kavita, V. DNA biosensors-a review. *J. Bioeng. Biomed. Sci.* 2017; 7:222.
- [4] Zhang, D., Yan, Y., Li, Q., *et al.* Label-free and high-sensitive detection of Salmonella using a surface plasmon resonance DNA-based biosensor. *J. Biotechnol.* 2012;160(3-4):123-128.
- [5] Zhang W., Li S., Li X., *et al.* PEG-PtS2 nanosheet-based fluorescence biosensor for label-free human papillomavirus genotyping. *Microchim Acta.* 2020;187(7):408-415
- [6] Mu X., Meng-Ying L., Cheng-Long C., *et al.* Employing Label-free Electrochemical Biosensor Based on 3D-Reduced Graphene Oxide and Polyaniline Nanofibers for Ultrasensitive Detection of Breast Cancer BRCA1 Biomarker. *Electroanalysis* 2020; 32:1-12.
- [7] Kivirand K, Min M, Rinken T. Challenges and Applications of Impedance-Based Biosensors in Water Analysis in “Biosensors for Environmental Monitoring” [Online]. United Kingdom: IntechOpen; 2019[Consultado 28 Agu 2020]. 2-4. Available: 10.5772/intechopen.89334.
- [8] Gnaim R., Sheviriyov J, Golberg A., *et al.* Label-Free cDNA Detection Based on Radiofrequency Scattering Parameters: A New Approach for an Inexpensive Gene Sensor. *J Med Device.* 2020;14 (1): 014502
- [9] Ames G., Gnaim R., Sheviriyov J., *et al.* Impedance Measurements Sensitive to Complementary DNA Concentrations. In: Bertemes-Filho P. (eds) 17th International Conference on Electrical Bioimpedance. ICEBI 2019. IFMBE Proceedings, vol 72. Springer, Singapore. 2020. 154-157.
- [10] Espinosa A, Espinosa C, Rodríguez M. Comparativo de los Métodos de Mínimos Cuadrados y Eliminación de Gauss-Jordan para la Resolución de Sistema de Ecuaciones en el tema de Regresión Lineal. *Conciencia tecnológica.* 2016;(52): 42-50.