



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“DETERMINACIÓN DEL VIRUS PRRS A TRAVÉS DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS”

TESIS QUE PRESENTA

IBT. NATHAN ENRIQUE CARRILES VÁZQUEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

EN EL ÁREA TEMÁTICA DE:

MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. ROSA ELVIRA NUÑEZ ANITA

CODIRECTOR:

DR. LUIS ANTONIO ORTIZ FRADE

Morelia Michoacán abril 2025





DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El presente documento es producto del trabajo original de investigación de Nathan Enrique Carriles Vázquez, estudiante del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas y respetando siempre los más altos estándares éticos solicitados por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Todos los datos de la investigación reportada en el presente documento de tesis (excepto los indicados explícitamente en el texto), fueron obtenidos por Nathan Enrique Carriles Vázquez durante el periodo que fue estudiante de la Maestría en Ciencias Biológicas, bajo la Dirección de la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita y la Co-Dirección del Dr. Luis Antonio Ortiz Frade.

Morelia, Mich., a 16 de mayo de 2025

IBT. Nathan Enrique Carriles Vázquez



Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita



Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, UMSNH



AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la Dirección de la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita, así como de la Codirección del Dr. Luis Antonio Ortiz Frade del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica.

Agradecemos a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S.C.(CIDETEQ) por las facilidades en las instalaciones y materiales para la realización de este trabajo. Agradecimiento también al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas.

A la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo por parte de Ciencia Básica (A1-S-43236) y CONACYT Infraestructura (INFR 2015-255010), referente a la Unidad de Proteómica y Bioingeniería Celular. Además, agradecemos el financiamiento parcial por la **CIC-UMSNH 2023-2024**. También agradecemos el apoyo a Nathan Enrique Carriles Vázquez que consistió en la Beca Nacional CONHACYT 2023-2025 con No. de becario **1278266** y número de CVU 948582.

Dedico esta tesis a mis padres Yara Vázquez Mejía y Manuel Enrique Carriles Ángeles. El apoyo incondicional, la motivación a seguir adelante y la fuerza y persistencia para llegar hasta este punto fue el mejor regalo que me pudieron haber dado y la ambición para seguir adelante en mi vida son la mayor prueba de amor que un padre puede dar a un hijo.

Gracias, papá y mamá.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco al Dr. Luis Antonio Ortiz Frade por ser un pilar en este proyecto, su atención, enseñanza y confianza en mi persona para la obtención de mis resultados, la culminación de esta tesis y mi desarrollo como futuro investigador. Me brindó las herramientas necesarias para concretar esta etapa en mi vida.

Le estoy agradecido por su tiempo, paciencia y enseñanza a la Dra. Ricarda Cortez Vieyra, por las incontables horas de ensayo, las revisiones adicionales revisiones a escritos, carteles, presentaciones y asesorías en experimentos.

Agradezco al Dr. Alejandro Bravo Patiño y a la Dra. Ilane Hernández Morales por sus contribuciones tanto como profesores de asignatura como sinodales de mi comité tutorial, gracias a ustedes recibo las bases para seguir adelante en mi carrera como investigador.

Agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio, Alicia Gabriela Zamora Avilez, Luis Enrique Franco Correa, Francisco Pérez Duran, Fernando Calderón Rico y Roberto Ortega Flores por la enseñanza, las risas y el tiempo dedicado en el laboratorio. Los recuerdos y enseñanzas me acompañaran en la vida.

Un especial agradecimiento a Ararat Amezcua Arroyo y Xally Gerónimo Urtiz, mis mejores amigas, mis confidentes, mis comadres y cómplices de travesuras, gracias a ustedes y su apoyo es que pude llegar a este punto con tantas risas, pasando los tragos amargos y con recuerdos y anécdotas que siempre llevare en el corazón.

Por último, quiero dar el más grande de mis agradecimientos a la persona que se volvió una inspiración y modelo a seguir en mi vida científica. DRA. ROSA ELMIRA MUÑOZ AMTA. Le agradezco la confianza y la fe, los regaños y los aplausos, las risas y las lágrimas, de todo lo vivido estos 2 años. Más de una vez pensé que estaba perdiendo el tiempo, que cometía un error en esta decisión o que no estaba a la altura del reto, pero, usted no perdió la fe y la confianza en mí. Me enseñó lo que una persona necesita para estar al frente no solo de un proyecto de posgrado, sino dirigiendo y guiando un laboratorio para cumplir nuestros sueños y metas. Dra. Elvira, no solo le agradezco los conocimientos adquiridos, le agradezco su paciencia y tiempo y espero algún día ser un investigador tan bueno o mejor de lo que usted me demostró ser.

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	5
3.1. Agente etiológico del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino	5
3.1.1. Viremia del PRRSV	7
3.1.2. Técnica estándar en diagnóstico de PRRSV.....	8
3.2. Importancia de los biosensores en el análisis clínico	10
3.2.1. Biosensores electroquímicos	13
3.2.2. La preeminencia de los biosensores	14
3.3. El principio de interacción antígeno–anticuerpo en los inmunosensores	15
3.4. Electroquímica como herramienta de análisis	20
3.4.1. Espectroscopia de Impedancia Electroquímica	20
4. Justificación	26
5. Objetivo General.....	26
6. Objetivos específicos	26
7. Materiales.....	27
7.1. Materiales.....	27
Péptidos.....	27
Anticuerpos	28
Placa de ELISA.....	28
Antígeno PRRSV	28
Electrodos serigrafados de oro AuSPE BVT	29
Ferrocianuro de Potasio	29

Ferricianuro de Potasio	29
Amortiguador de fosfatos	29
N-acetil-L-cisteína	29
Carbodiimida (EDC).....	29
N-hidroxisuccinimida (NHS).....	29
8. Metodología.....	30
8.1 ELISA de Anticuerpo Policlonal PRRSV-GP5 frente péptidos derivados de la proteína GP5	30
8.2. Limpieza Electroquímica.....	32
8.3. Construcción de la monocapa autoensamblada	33
8.4. Activación de los grupos carboxilo	33
8.5. Acoplamiento del anticuerpo.....	34
8.6. Bloqueo de uniones inespecíficas.....	34
8.7. Interacción Ag-Ac a través de electroquímica.	35
8.8. Curvas de calibración	35
8.9. Análisis estadístico	36
9. Resultados.....	37
9.1. Evaluación del reconocimiento Ag-Ac del PRSSV, para validar el uso del Ac en la preparación de los biosensores.....	37
9.2. Limpieza y decapado electroquímica de los electrodos.....	38
9.3. Caracterización del Inmunosensor por EIE	40
9.4. Construcción de del circuito equivalente.....	46
10. Discusión	48
11. CONCLUSIÓN.....	51
12. Perspectivas futuras	51
13. Bibliografía	52

14. Anexo.....	57
ANEXO I.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de una partícula de PRRSV y su material genético.	5
Figura 2. Evolución de la carga viral frente al tiempo en una infección de PRRSV.	8
Figura 3. Estructura de básica de una Inmunoglobulina G.	16
Figura 4. Naturaleza de los determinantes antigénicos.	19
Figura 5. Representación esquematizada de un inmunosensor durante una EIE y su circuito equivalente.	23
Figura 6 Representación de eventos REDOX en la superficie de los electrodos con sus respectivos diagramas de Nyquist y un modelo de circuito equivalente que coincide con el perfil de EIE observado experimentalmente.	24
Figura 7 Relación de un esquema de una celda electroquímica con sus componentes y correspondiente identificación en un diagrama de Nyquist.	25
Figura 8. Esquema de acoplamiento del péptido sobre la placa del kit.	28
Figura 9. Diagrama de trabajo para la construcción de un inmunosensor.	32
Figura 10. Representación esquemática de la reacción de EDC y NHS sobre un grupo ácido carboxílico.	34
Figura 11. Biorreconocimiento de epítomos de PRRSV utilizando el Ac comercial policlonal PRRSV.	38
Figura 12. Perfil del oro de AuSPE de la marca BVT.	39
Figura 13. Análisis de EIE de AuSPE desnudos.	40
Figura 14. Análisis de EIE en diagramas de Nyquist durante la construcción del Inmunosensor.	41
Figura 15. Curva de calibración utilizando diferentes concentraciones de IgG anti-GP5.	42
Figura 16. Análisis de EIE en diagramas de Nyquist para la inmunodetección del antígeno PRRSV.	43
Figura 17. Análisis de R_{tc} medida en KOhms ($K\Omega$) de electrodos durante la preparación del biosensor y detección del Antígeno PRRSV.	44

Figura 18. Análisis de capacitancia medida en faradios ($10^{-7} \mu\text{F}$) de electrodos durante la preparación del biosensor y detección del antígeno PRRSV..... 45

Figura 19. Diagramas de circuitos equivalentes construidos para la interpretación de EIE.. 47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos empleados en el diagnóstico del PRRSV propuestos por la OMSA..	9
Tabla 2. Biosensores para la determinación del antígeno PRRSV	12
Tabla 3. Secuencia y análisis de los péptidos sintetizados por Gen Script.....	27
Tabla 4 Anticuerpos policlonales enlistados empleados en los experimentos	28

Lista de abreviaturas

Ac	Anticuerpo.
Ag	Antígeno.
AuSPE	Por sus siglas en inglés, electrodo serigrafiado de oro libre.
AuSPE-NAC	Por sus siglas en inglés electrodo serigrafiado de oro funcionalizado con NAC.
AuSPE-NAC-EDC/NHS	Por sus siglas en inglés electrodo serigrafiado de oro funcionalizado con NAC y entrecruzado por EDC Y NHS.
AuSPE-SAM	Por sus siglas en inglés electrodo serigrafiado de oro con SAM.
CE	Por sus siglas en inglés electrodo contador o contraelectrodo.
CDR	Por sus siglas en inglés electrodo región determinante de la complementariedad.
CV	Voltamperometría cíclica.
CRP	Complejo Respiratorio Porcino.
Ctr	Por sus siglas en inglés electrodo resistencia a la transferencia de carga.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
ADN	ácido Desoxirribonucleico.
DO	Densidad óptica.
DPI	Días post infección.
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).
EIE	Espectroscopía de impedancia electroquímica.
ELISA	Por sus siglas en inglés Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas.
Fab	Por sus siglas en inglés fragmentos de unión al antígeno.
Fc	Fragmento cristizable.
FN	Falso negativo.
FP	Falso positivo.
Fr	Regiones de armazón de entramado.
HRP	Por sus siglas en inglés peroxidasa de rábano picante.
H₂SO₄	Ácido sulfúrico.

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

Ig	Inmunoglobulina.
IgG	Inmunoglobulina G.
KDa	Kilo Dalton.
MLV	Por sus siglas en ingles virus vivo modificado.
MW	Por sus siglas en ingles peso molecular.
NAC	N-acetil-L-cisteína.
NHS	N-hidroxisuccinimida (NHS).
PBST	PBS Tween.
PCR	Por sus siglas en ingles Reacción en Cadena de la Polimerasa.
LE	Limpieza electroquímica.
OCP	Por sus siglas en ingles potencial de circuito abierto
ORF	Por sus siglas en ingles marco de lectura abierto.
POC	Por sus siglas en ingles punto de contacto.
PRRS	Por sus siglas en ingles Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino.
PRRSV	Por sus siglas en ingles Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino.
PCR	Por sus siglas en ingles Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RE	Por sus siglas en ingles electrodo de referencia.
RT-PCR	PCR con retrotranscriptasa inversa.
REDOX	Reacción de oxido reducción.
RNA	Por sus siglas en ingles ácido ribonucleico.
SAM	Por sus siglas en ingles monocapa autoensamblada.
TA	Temperatura ambiente.
VN	Verdadero negativo.
VP	Verdadero positivo.
WE	Por sus siglas en ingles electrodo de trabajo.

1. RESUMEN

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) es el agente causal de la enfermedad homónima, la cual, afecta a la industria porcina a nivel global debido a las pérdidas económicas asociadas. Actualmente, el método estándar de oro para el diagnóstico de la infección por PRRSV es la cuantificación de copias de ARN viral, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, este método implica el transporte de la muestra, por lo tanto, se retrasa la toma de decisiones. Los biosensores emergen como una alternativa viable respecto a la PCR, porque compiten en sensibilidad y especificidad, en disminución de costos por toma y transporte de muestra, así como kits y reactivos empleados, de igual forma presentan preeminencia en un menor tiempo de análisis de muestras, siendo beneficiado para una disminución del riesgo en la degradación o contaminación de la muestra, así como una temprana implementación de medidas de contención animal. Los biosensores están compuestos por un elemento de biorreconocimiento al que se unirá el analito de estudio y un transductor. La medición de la interacción antígeno-anticuerpo es inmediata y se cuantifica mediante espectroscopia de impedancia electroquímica. Objetivo: Desarrollar un biosensor electroquímico para la cuantificación del antígeno PRRSV. Metodología: Por un lado, se realizó un ensayo de ELISA directo para demostrar que el elemento de biorreconocimiento, es decir, el anticuerpo anti-PRRSV se une a epítomos específicos del antígeno PRRSV. Por otro lado, se utilizaron electrodos serigrafados con oro en los que se elaboró una monocapa autoensamblada formada por N-acetil-L-cisteína, seguido de los entrecruzadores carbodiimida e hidroxisuccinimida cuya función es la activación de los grupos carboxilo. Seguido del acoplamiento de un anticuerpo policlonal dirigido contra el PRRSV (PRRSV anti-GP5). Finalmente, para demostrar la unión antígeno-anticuerpo, se adicionó el antígeno PRRSV (MLV PRRS virus ®Cepa VR-2332). Resultados: Se demostró que el anticuerpo anti-PRRSV detectó epítomos específicos de la proteína GP5 del PRRSV, por lo tanto, dicho anticuerpo se utilizó como elemento de biorreconocimiento en la construcción del biosensor. La medición basal de la resistencia a la transferencia de carga y la capacitancia fue constante en los biosensores y se ajustó a un circuito equivalente. Se encontró una relación directa entre la concentración del anticuerpo

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

anti-PRRSV contra la resistencia a la transferencia de carga ($R^2= 0.93$); mientras que, fue inversa la relación entre la concentración del anticuerpo y la capacitancia ($R^2= 0.8$). Cuando se adicionó el antígeno, se encontró una relación inversa entre la concentración del antígeno PRRSV contra la resistencia a la transferencia ($R^2= 0.86$). También, fue directa la relación entre la concentración del antígeno PRRSV y la capacitancia ($R^2= 0.95$). Considerando todos los datos en conjunto, se sugiere que el prototipo de biosensores electroquímicos, fueron capaces de cuantificar de manera dependiente de la concentración el antígeno PRRSV.

Palabras Clave: Diagnóstico, Inmunosensores, Anticuerpos, Resistencia, Capacitancia

2. ABSTRACT

The porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the causative agent of the eponymous disease that bears its name, significantly impacting the global swine industry due the substantial economic losses it causes. The gold standard method for diagnosing PRRSV infection is quantifying viral RNA copies through polymerase chain reaction (PCR). However, this method involves sample transportation, which delays decision-making. Biosensors emerge as a viable alternative to PCR because they compete in sensitivity and specificity, reduce costs associated with sample collection and transportation, and the kits and reagents used. They also excel in offering shorter sample analysis time, benefiting from reduced risk of sample degradation or contamination and enabling the early implementation of animal containment measures. Biosensors consist of a biorecognition element that specifically binds to the analyte of interest, coupled with a transducer. The antigen-antibody interaction is detected in real time and quantified using electrochemical impedance spectroscopy. Objective: To develop an electrochemical biosensor for the quantification of PRRSV antigen. Methodology: A direct ELISA assay was first performed to demonstrate that the biorecognition element-specifically, the anti-PRRSV antibody-binds to specific epitopes of the PRRSV antigen. In parallel, screen-printed gold electrodes were functionalized with a self-assembled monolayer of N-acetyl-L-cysteine. This was followed by the application of carbodiimide and N-hydroxysuccinimide crosslinkers to activate carboxyl groups for covalent attachment. A polyclonal antibody against PRRSV (anti-GP5) was then immobilized on the electrode surface. Finally, the PRRSV antigen (MLV PRRS virus ®Strain VR-2332) was introduced to confirm the antigen-antibody binding interaction. Results: It was demonstrated that the anti-PRRSV antibody detected specific epitopes of the GP5 protein of PRRSV; consequently, this antibody was employed as the biorecognition element in the construction of the biosensor. The baseline measurement of charge transfer resistance and capacitance was consistent across the biosensors and fit an equivalent circuit. A direct relationship was found between the concentration of the anti-PRRSV antibody and charge transfer resistance ($R^2 = 0.93$), while the relationship between antibody concentration and capacitance was inverse ($R^2 = 0.8$). When the antigen was added, an inverse relationship was observed between the concentration of the PRRSV antigen and charge transfer resistance

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

($R^2 = 0.86$). Additionally, a direct relationship was found between the concentration of the PRRSV antigen and capacitance ($R^2 = 0.95$). Collectively, the results indicate that the electrochemical biosensor prototypes demonstrated the ability to quantitatively detect the PRRSV antigen in a concentration-dependent fashion.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Agente etiológico del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino

El Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV por sus siglas en inglés) es el agente etiológico del síndrome con el mismo nombre (PRRS). El PRRSV es un virus envuelto de ARN monocatenario de sentido positivo, pertenece a la familia *Arteriviridae*, género *Arterivirus* y junto con los coronavirus a la extensa familia de los *Nidovirales*. Posee 2 genotipos principales de las cuales se derivan la gran variedad de cepas circulantes, el PRRSV tipo 1 Lv (Lelystad) o cepa europea y el PRRSV tipo 2 VR-2332 o cepa americana. Ambos genotipos presentan una homología entre el 50% y 70%. El tamaño del genoma del PRRSV va de los 15 a 15.5 Kb, posee 12 marcos de lectura abierto (ORF) (**Fig. 1 B**), los cuales codifican para cuatro poliproteínas no estructurales (ORF1a, ORF1a', TF, ORF1b) que, después de ser procesadas se dividen en 17 proteínas encargadas de la replicación viral y 8 proteínas estructurales (ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5a, ORF5, ORF6 y ORF 7) entre las que destacan GP5 y M, las cuales interactúan entre sí para dar lugar al mayor heterodímero glicoproteico del virus, dichas proteínas representan más del 50% de las proteínas presentes en la envoltura viral (**Fig. 1 A**) (Luo *et al.*, 2023; Rossow, 1998)

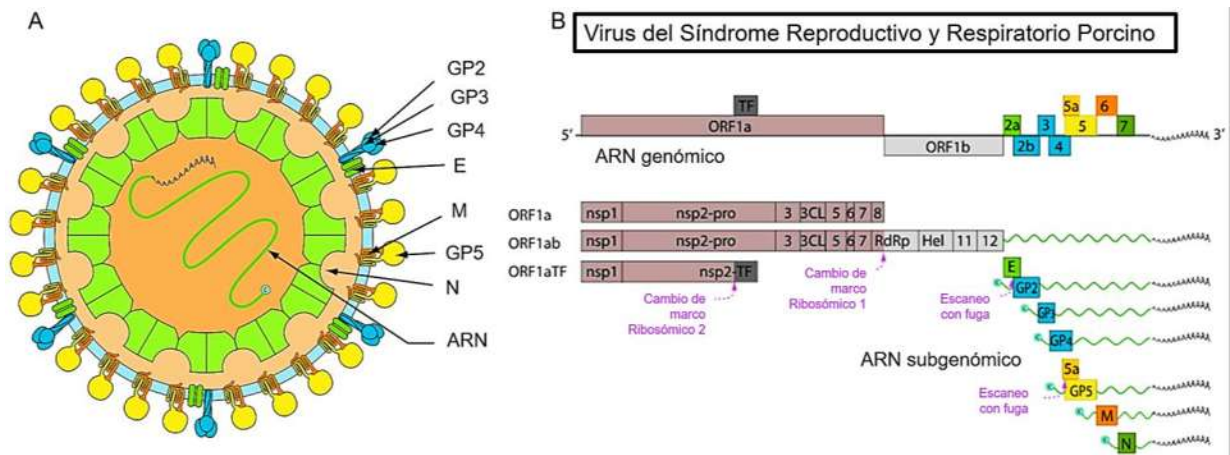


Figura 1. Estructura de una partícula de PRRSV y su material genético. A) representación de la estructura que posee el PRRSV, ejemplificando el heterotrimerio conformado por GP2, GP3 y GP4, la glicoproteína E y el heterodímero conformado por GP5-M así como la capside que recubre al ADN. B) Se muestran los 12 marcos de lectura abiertos. (Modificado de <https://viralzone.expasy.org/7776>)

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

El PRRS es una enfermedad reemergente de gran impacto productivo y económico, considerada enfermedad endémica de países productores de la industria porcina. Fue descrita por primera vez en el continente americano en el año de 1987, denominada como “la enfermedad misteriosa de los cerdos” o “la enfermedad de las orejas azules”. Dos años después fueron descritas enfermedades con sintomatologías semejantes en Asia. A inicio de los 90’s fue igualmente caracterizada en Europa, pero hasta 1991 que fue aislado el virus por primera vez en Lelystad Holanda, siendo considerada esta la cepa europea (genotipo 1 o variante Lv). Un año después fue aislado el virus en EE. UU., dando lugar a la cepa americana (genotipo 2 o variante VR-2332); ese mismo año PRRSV fue identificada por primera vez en México (Cola *et al.*, 2019; Dokland, 2010).

La enfermedad del PRRS es de rápida diseminación y posee un tropismo selectivo contra los macrófagos alveolares de cerdo. Sin embargo, recientes estudios demuestran que las células dendríticas, así como los monocitos, son permisivos al virus. Los cerdos que padecen esta enfermedad presentan un cuadro clínico diverso que varía acorde a la etapa de crecimiento, sexo y estado inmunológico de los mismos, pero en general se caracteriza por cianosis (coloración azul en las extremidades y orejas de los animales), anorexia, baja tasa en crecimiento y producción, y cuadro respiratorio generalizado. Ligada al Complejo Respiratorio Porcino (CRP), el PRRSV se puede presentar como una coinfección de otros microorganismos oportunistas como el virus de la influenza porcina (SIV), el circovirus porcino tipo 2 (PCV2), *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHYO) y *Pasteurella multocida* (PMULT). Dentro del cuadro reproductivo, la signología varía un poco de acuerdo con el sexo, en el caso de verracos, la infección provoca bajos índices de reproducción y baja calidad seminal, mientras que en las cerdas reproductoras pueden presentarse abortos, mortinatos y momificaciones de feto, y camadas débiles. En lechones neonatos la infección ocasiona una mortalidad de casi el 100% debido a que provoca inmunosupresión, haciendo a los lechones más susceptibles a infecciones del CRP (Maricruz López-Heydeck *et al.*, 2015).

Actualmente, PRRSV se encuentra diseminado por todo el mundo, teniendo gran prevalencia en México. Según el Servicio Nacional de Sanidad inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), entre el 2019 y 2020 se registraron 1390 focos de infección en el territorio

mexicano, siendo los estados con mayor confluencia Sonora con el 47% de los casos, Jalisco con el 27%, Guanajuato, Puebla y Sinaloa con el 15%, el 11% restante se distribuye en el resto del territorio nacional. Por su parte, el estado de Michoacán presentó una incidencia de alrededor del 7%, siendo en ese periodo registrados entre 41 y 110 casos conocidos. Las pérdidas económicas asociadas a PRSS en el país, se estiman de entre 80 y 120 millones de dólares al año, a consecuencia de deficiencias en el sistema de detección y control epidemiológico y zoonosanitario de cerdos infectados (Rossow, 1998; SENASICA, 2022)

3.1.1. Viremia del PRRSV

La infección de PRRSV se puede dividir en 3 etapas: infección aguda, persistencia y extinción. Cada una de ellas con eventos en la respuesta inmune, la viremia y cuadros clínicos propios. En la infección aguda, el pulmón es el sitio principal de la infección ya que se lleva a cabo una replicación viral masiva en macrófagos y células dendríticas de los pulmones y vías respiratorias altas, conduciendo a un estado de viremia entre 6 y 12 horas post infección. Como resultado, la viremia puede durar hasta las 6 semanas. La carga viral durante la infección aguda cambia a lo largo del tiempo tal y como podemos observar en la **Fig. 2**, en la que se presentan los mayores valores de replicación entre el día 15 y 20 registradas en muestras de suero, llegando hasta las 1×10^{26} partículas virales. Posteriormente se presenta la segunda etapa de la infección: la persistencia, durante la cual se disminuye la replicación viral hasta casi ser indetectable a los 40 dpi dentro de exudados. Posteriormente, en suero se presenta un rebote entre los días 65 y 70; sin embargo, después de los 80 dpi ya no es detectable en suero ni pulmones y no hay presencia de signos clínicos, pero la replicación se mantiene focalizada en órganos linfoides secundarios (tonsilas y ganglios linfáticos). Como consecuencia, los fluidos corporales como mucosas orales, nasales y el semen son vías eficientes de transmisión viral. Eventualmente la replicación viral disminuye de forma gradual y se extingue dando lugar a la última fase de la infección, la extinción, presentándose posterior a los 80 dpi. Se estima que la replicación del virus puede extenderse hasta 250 dpi, este largo periodo ocasiona reinfecciones y recombinación viral lo que establece una infección constante en las granjas(Lunney *et al.*, 2016).

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

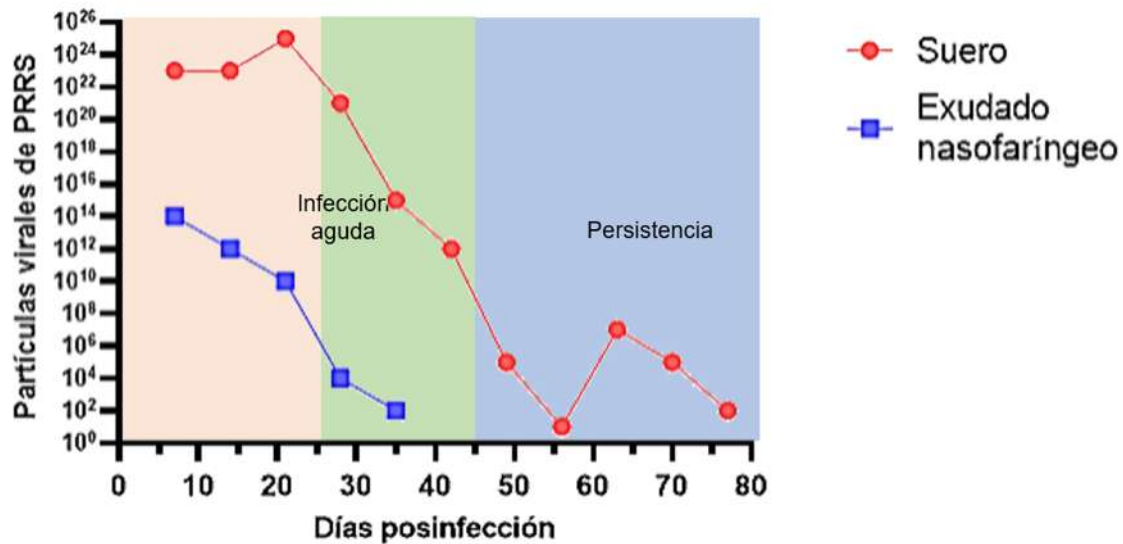


Figura 2. Evolución de la carga viral frente al tiempo en una infección de PRRSV. La evaluación se realizó en 60 cerdos desde el día 0 hasta el día 80 post infección. Modificado de Charpin *et al.*, 2012 y Lunney *et al.* (2016)

Una de las complicaciones en la erradicación del PRRSV es el control de la viremia en granjas infectadas, dado que los cerdos siguen propagando el virus incluso ya superado el periodo de infección, esto se debe a que el virus presenta una baja tasa de replicación en órganos linfoides secundarios, llegando a persistir hasta más de 200 días post infección (dpi), siendo incluso hasta años en función del tamaño de rebaño (se calcula que se toman alrededor de seis años para la eliminación de la infección en rebaños de alrededor de 120 cerdos) (Charpin *et al.*, 2012).

3.1.2. Técnica estándar en diagnóstico de PRRSV

Actualmente hay una gran cantidad de técnicas para el diagnóstico de la infección por PRRSV, divididas en diagnóstico directo, es decir, asociado a la identificación del agente infeccioso, y diagnóstico indirecto, el cual se refiere a los métodos asociados a la identificación de la respuesta inmune del hospedero, por lo general mediante la determinación de anticuerpos contra el agente infeccioso. Las técnicas más empleadas en el diagnóstico de la infección por PRRSV son: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el inmunoensayo absorbente ligado a enzimas (ELISA). Ambas pruebas tienen alta sensibilidad y especificidad, aunque exhiben algunas desventajas, entre ellas, el alto costo,

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

requieren equipo especializado, requieren personal altamente capacitado para realizar la prueba, los procesamientos de muestra van desde 8 hasta 20 días posteriores a la toma de muestra y requieren del traslado de la muestra bajo condiciones de refrigeración. (Wu *et al.*, 2023)

La Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA), enlista las técnicas directas e indirectas que han sido aprobadas para la determinación del antígeno o anticuerpos contra PRRSV y sus alcances aplicados en el control zoonosario dentro de la industria porcina (Organización Mundial de la Sanidad Animal, 2023) (Tabla 1).

Tabla 1. Métodos empleados en el diagnóstico del PRRSV propuestos por la OMSA. Modificada del Manual Terrestre de la OMSA.

Métodos	Propósito					
	Demostrar infección en la población.	Demostrar infección en animales individuales	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario tras la vacunación
Diagnóstico directo						
Aislamiento del virus	-	++	-	+++	-	-
RT-PCR	+++	+++	+++	+++	++	-
RT-PCR en tiempo real	+++	+++	+++	+++	++	-
IHC	-	-	-	++	-	-
ISH	-	-	-	++	-	-
Diagnóstico indirecto						
ELISA	+++	++	+++	++	+++	++
IPA	++	++	++	+	++	+++
IFA	++	++	++	+	++	+++

Donde: RT-PCR, Reacción en cadena de la polimerasa; IHC, Inmunohistoquímica; ISH, Hibridación *in situ.*, ELISA, Reacción Inmunoabsorbente Ligada a Enzimas, IPA, Inmunoprecipitación IFA, Inmunofluorescencia.

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

La facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ofrecen el servicio de diagnóstico clínico para la detección de PRRSV bajo las técnicas de ELISA y PCR, ambas con un costo de 180 y 750 pesos por muestra, respectivamente, y tiempo de entrega de resultados en promedio de 10 días, costos del año 2022. Por otro lado, en el mercado se presenta una gran variedad de kits fundamentados en el ensayo de ELISA, proporcionados por las marcas comerciales IDEXX, VETMAX, PrioCHECK, por mencionar algunas; sin embargo, hasta el momento no se ha presentado algún kit comercial que permita la detección del antígeno de PRRSV cuantitativo (Departamento de medicina y zootecnia de cerdos, 2022).

Otra alternativa poco conocida es la prueba de tira rápida de antígeno viral, que detecta, mediante Inmunocromatografía, partículas virales en la muestra a analizar. Esta prueba presenta el inconveniente de poca distribución global, siendo un producto exclusivo del mercado chino. Otra desventaja de este método de diagnóstico es que en principio es exclusivamente cualitativo, por lo que no permite realizar cuantificación del antígeno. La tira reactiva es comercializada por Green Spring bajo el código LSY-20012-2.

3.2. Importancia de los biosensores en el análisis clínico

El inicio práctico de los biosensores se remonta a 1962, cuando Leland Clark Jr. introdujo el electrodo amperométrico enzimático de glucosa, empleado en el análisis de los niveles de glucosa sanguíneos. Este invento dio pie al inicio de una de las líneas de investigación e innovación en las ciencias con mayor inversión a nivel mundial, llegando a 28.5 millones de dólares en el 2022 y se prevé que su valor llegue a los 38,905 millones en el 2030. La industria de los biosensores empezó a dar forma y utilidad a la vida cotidiana, con el objetivo de brindar pruebas de detección precisas, rápidas, confiables, sensibles, económicas y lo menos invasivas posibles, capaces de utilizarse bajo cualquier condición, situación y lugar (portabilidad), del menor tamaño posible (miniaturización) y capaces de acoplarse a instrumentos del uso diario (adaptabilidad), (Kokkinos *et al.*, 2016).

Un biosensor se define como un dispositivo de análisis autónomo e integrado constituido por un elemento de biorreconocimiento, basado en un receptor bioquímico, (enzimas,

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

anticuerpos, antígenos, péptidos, ADN, aptámeros, células vivas o partes de ellas), el cual se mantiene ligado a una interfaz o elemento transductor mediante una matriz de soporte. La suma de estos componentes es lo que da origen al transductor. El elemento transductor a su vez, puede ser de tipo electroquímico, óptico y/o mecánico. El biosensor, como su nombre lo indica, es el que, en función de su estructura, permite la detección y cuantificación de un analito de interés y el elemento transductor se encarga de captar y amplificar la señal que será mandada a la unidad encargada del procesamiento y la interpretación, el elemento electrónico (computadoras portátiles, tabletas o teléfonos inteligentes), para mostrar los datos en tablas y/o gráficas. Una importante ventaja del biosensor es que se basa en un sistema sin reactivos, y en la ausencia de pretratamientos a las muestras a analizar, esto gracias a la presencia de todos los componentes necesarios para la reacción dentro del transductor. (Wu *et al.*, 2023).

El principal objetivo y ventaja de un biosensor sobre los sistemas de detección y diagnóstico tradicional es que está diseñado para pruebas en el punto de contacto o prueba *in situ* de las muestras a diagnosticar, con el fin de ampliar las limitantes del análisis clínico dentro de laboratorios especializados y al público de interés, como, hospitales y centros de salud, entornos domiciliarios o centros de investigación, análisis y producción. Esto permite que los biosensores sean una tecnología más económica y portátil que el termociclador para PCR o el lector de placas para ELISA y su capacidad de acoplamiento de partículas de reconocimiento es muy amplia (Wu *et al.*, 2023).

Los biosensores poseen cualidades tales como selectividad y sensibilidad en la detección, comparable o superior con las técnicas convencionales. El inconveniente que presentan es, en muchos casos, en el elemento transductor, el cual, de una plataforma a otra presenta problemas en su miniaturización y, por ende, afecta la portabilidad o adaptabilidad a tecnologías alternativas. Esta desventaja no la presentan los biosensores de tipo electroquímicos, los cuales, requieren de elementos de biorreconocimiento acoplados a electrodos y transistores; poseen la ventaja de miniaturización y fácil integración a dispositivos, así como el escalamiento para la producción por lotes. Asimismo, las señales electroquímicas se compilan por medio de periféricos que pueden ser simples, portátiles, de

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

bajo costo y consumo eléctrico, permitiendo reunir los análisis en una tableta, computadora portátil o teléfono inteligente mediante una plataforma de análisis informático y el elemento electrónico (normalmente un potenciómetro), (Kokkinos *et al.*, 2016).

En la actualidad se están desarrollando cada vez más tecnologías que permiten detectar de una forma más rápida y precisa muestras cada vez más complejas. Para PRRSV, diversos grupos de trabajo han desarrollado diversos tipos de biosensores para su diagnóstico, la tabla 2 muestra algunos ejemplos de dichos trabajos:

Tabla 2. Biosensores para la determinación del antígeno PRRSV

Prueba	Tipo	Unidad mínima de detección	Autor
Biosensor basado en fluorescencia, utiliza CRISPR/Cas12a	Óptico	3×10^4 copias de DNA	Liu, <i>et al.</i> , 2021
Biosensor de aptámeros	Masa (Piezoeléctrico)	$1,87 \times 10^{10}$ Partículas	Kuitio, <i>et al.</i> , 2020
Biosensor de nanopartículas de oro y puntos cuánticos.	Óptico	3 partículas por microlitro	Stringer <i>et al.</i> , 2008
Biosensor de electro quimioluminiscencia de infrarrojo cercano.	Óptico	5.68×10^{-7}	Shao <i>et al.</i> , 2017

Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se desarrolló un inmunosensor enfocado en la detección de anticuerpos (Ac's) contra PRRSV (Franco 2021), el cual tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad de más del 95%. El inmunosensor fue construido utilizando péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV como elemento de reconocimiento, para cuantificar Ac's anti-PRRSV. Los cuales se generan en el individuo como resultado de una

infección natural o después de la vacunación. El inmunosensor midió los anticuerpos séricos de lechones naturalmente infectados y/o vacunados.

Esto muestra la gran relevancia que tiene el innovar en el diagnóstico clínico y diseñar una técnica de diagnóstico que sea única e innovadora, económica y portátil, que además sea fiable para el diagnóstico de partículas virales.

3.2.1. Biosensores electroquímicos

El principio de los biosensores electroquímicos se basa en una señal expresada por la transferencia de electrones en el transductor a través del proceso de biorreconocimiento. Las señales pueden incluir corriente (i), potencial (E), impedancia (Z'), conductividad, capacitancia (F), los cuales son interpretados bajo técnicas electroquímicas que serán detalladas en capítulos posteriores (Singh *et al.*, 2021).

Hay una gran diversidad de biosensores electroquímicos clasificados por su elemento de biorreconocimiento. Los biosensores catalíticos los cuales, emplean enzimas para correlacionar la actividad enzimática con variaciones de electrones que pueden ser interpretadas por el elemento transductor. Los biosensores de afinidad por su parte emplean una molécula que funge como elemento de biorreconocimiento y posterior captura del analito de interés. Entre las moléculas de captura más investigadas son ácidos nucleicos, aptámeros y Ac; estos últimos empleados en la construcción de inmunosensores, se fundamentan en el principio de la interacción Ag-Ac, permitiendo un reconocimiento altamente específico (Singh *et al.*, 2021).

De la misma forma, los biosensores electroquímicos se pueden clasificar en función del tipo de técnica electroquímica que lleven a cabo, siendo los más apropiados para el reconocimiento sensible y específico *in situ* con poco volumen de muestra, los sensores impedimétricos y voltamperométricos. Los sensores impedimétricos pueden detectar eventos de biorreconocimiento, midiendo las propiedades de resistencia y capacitancia sobre el electrodo de trabajo. Mientras que los sensores voltamperométricos, llevan a procesos redox presentes. La configuración más común para un biosensor electroquímico impedimétrico está

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

basada en un sistema de tres electrodos compuestos por, el electrodo de trabajo (WE), al cual se le realiza el acoplamiento del captador biológico para el biorreconocimiento del analito; un contraelectrodo (CE), el cual, se encarga de medir las variaciones del flujo de electrones o las cargas del medio de análisis, funcionando de una forma semejante a un circuito eléctrico y por último, el electrodo de referencia (RE), el cual funciona como referencia de potencial a aplicar al medio, (Grieshaber *et al.*, 2008); (Kokkinos *et al.*, 2016)

3.2.2. La preeminencia de los biosensores

Se puede entender como preeminencia todo aquello que al ser comparado cumple con una cualidad de superioridad; por lo que, al referirse a la preeminencia de los biosensores, se interpreta que presentan ventajas sustanciales o características. Aparte de una alta sensibilidad y especificidad, los biosensores poseen cualidades como: miniaturización, adaptabilidad, portabilidad y se pueden realizar en el sitio que se requiere. Se describe con más detalle a continuación:

- Sensibilidad: este término tiene dos definiciones, dependiendo de la perspectiva o análisis en cuestión, siendo una en función del analito y otra en función de la validación de una técnica diagnóstica. La primera definición “la relación entre la señal obtenida de un sistema de medición y la correspondiente concentración de analito” y la segunda, sensibilidad analítica, hace referencia al porcentaje o proporción en que una técnica diagnóstica es capaz de determinar una muestra verdadera positiva (VP) como positiva, sobre diagnósticos falsos negativos (FN). Siendo empleada la siguiente fórmula para calcularla: (Martín Conejero & Martín Conejero, 2023; Ola *et al.*, 2015)

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{(VP + FN)}$$

Fórmula para obtener la sensibilidad analítica de una prueba diagnóstica.

- Especificidad: Al igual que sensibilidad, la especificidad posee dos definiciones en función del análisis a realizar, la primera hace alusión a la habilidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz y el otro concepto denominado especificidad analítica, hace referencia al porcentaje o proporción de muestras verdaderas negativas (VN=) que dieron un análisis negativo, frente a las muestras que dieron un falso positivo (FP) (Martín Conejero & Martín Conejero, 2023; Ola *et al.*, 2015), calculada con la siguiente ecuación:

$$\textit{Especificidad} = \frac{VN}{(FP + VN)}$$

Fórmula para obtener la especificidad analítica de una prueba diagnóstica.

- Pruebas realizadas en el punto de contacto, hace referencia a las pruebas diagnósticas capaces de realizarse *in situ* o en el punto de cuidado o contacto (Wu *et al.*, 2023).

Los biosensores poseen las mismas cualidades de diagnóstico a las pruebas de diagnóstico tradicionales, sumando la particularidad de ser miniaturizados (dispositivos pequeños incluso tan pequeños como un celular) por lo cual los volúmenes de muestra requeridos serían menores y el dispositivo sería portátil.

3.3. El principio de interacción antígeno–anticuerpo en los inmunosensores

Los inmunosensores tal y como se explicó anteriormente, se basan en la interacción Ag-Ac, siendo este complejo el elemento de biorreconocimiento ligado al elemento transductor. Los Ac's son proteínas sintetizadas por los vertebrados en respuesta a partículas extrañas denominadas antígenos (Ag's). Los Ac's pertenecen a un grupo muy diverso de proteínas, a su vez son altamente específicos en su función de reconocimiento de Ag's. Cabe destacar que, aunque todos los Ac's, también llamado inmunoglobulinas (Ig), presentan la misma cualidad de detección de Ag's, los Ac's de tipo IgG son la más comúnmente empleados,

debido a que son las de más fácil purificación y son de fácil producción a nivel industrial (Kulkarni-Kale *et al.*, 2014).

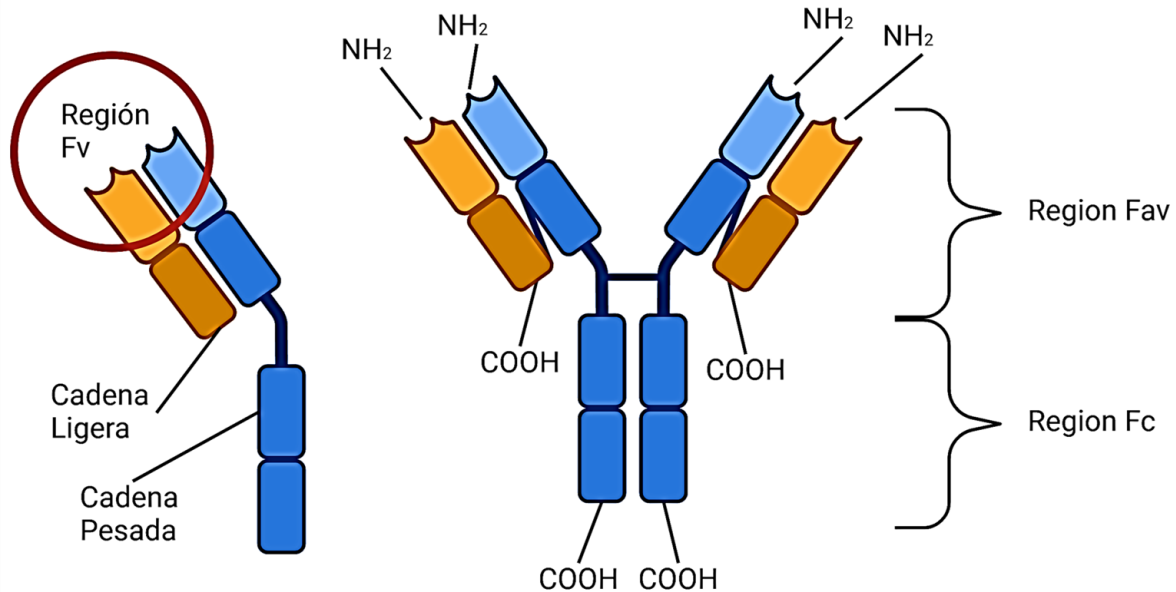


Figura 3. Estructura de básica de una Inmunoglobulina G. Diseñado en BioRender.com

Las IgGs, al igual que el resto de los Ac's, poseen una estructura básica simétrica compuesta por 2 cadenas ligeras (L) y 2 cadenas pesadas (V), unidas por puentes disulfuro. Las Ig presentan una forma semejante a una Y, la cual se encuentra dividida en dos partes, la parte superior denominada como región Fab (Fragmentos de unión al Ag) o región variable, la cual se encuentra presente tanto en la cadena ligera como la cadena pesada y la región Fc (Fragmento cristalizante) o región constante **Fig. 3**. La Fab se encarga del reconocimiento del Ag. Por el contrario, la Fc determina la clase del Ac (que puede ser G, A, M, D y E) y posee funciones biológicas implicadas en la respuesta humoral. También las Ig son el punto de anclaje a la superficie de trabajo en algunos inmunoensayos. Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas se encuentran yuxtapuestas, formando un punto de unión con el Ag y al presentar un par de cada una, poseen por ende dos puntos de anclaje al Ag. Las regiones variables presentan secuencias de aminoácidos únicas, derivadas de clones de linfocitos B, únicos y exclusivos para dicho patrón. Las cadenas ligeras tienen un peso de 24 KDa y las cadenas pesadas de entre 55 y 70 KDa (Abbas *et al.*, 2008).

La región variable de las IgGs está distribuida en tres subregiones, llamadas regiones hipervariables por cada cadena (tres regiones para la cadena ligera y tres regiones para la cadena pesada), representando solo el 15 o 20% total de toda la región Fab. Las 6 regiones hipervariables están juntas, orientadas hacia el exterior y tienen una estructura tridimensional idónea para formar una superficie de unión al Ag, siendo complementaria a la estructura tridimensional del Ag que fueron diseñadas, por lo que también es apropiado denominar a las regiones hipervariables como regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Cada región perteneciente tanto a la cadena ligera, como a la cadena pesada, reciben el nombre de CDR1, CDR2 y CDR3. Los CDR's constan de 10 aminoácidos. Sin embargo, el CDR3 suele ser el más variable de los tres. A su vez la región variable de los Ac's está compuesta por regiones más conservadas, las cuales son denominadas regiones Fr o regiones de armazón de entramado. Estas regiones Fr son las encargadas de dar soporte y estructura a la región hipervariables, siendo las que contienen el dominio Ig de la región variable (Kapingidza *et al.*, 2020).

La interacción Ag-Ac se lleva a cabo gracias a las interacciones moleculares entre el epítipo procedente del Ag y a las regiones hipervariables o CDR's, tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada del Ac. Los estudios demuestran que los residuos de aminoácidos de las CDR's forman múltiples contactos con los epítopos del Ag, siendo más amplio y característico con la CDR3. También se ha demostrado que las regiones conservadas pueden estar involucradas favoreciendo la interacción, esto a su vez permitiendo que algunas CDR's queden fuera de dicha interacción ((Kulkarni-Kale *et al.*, 2014).

La interacción Ag-Ac ha sido ampliamente estudiada y explotada por el área clínica, la cual emplea este principio en las técnicas de inmunodetección como la ELISA o la IHC, por lo cual la demanda de anticuerpos para diagnóstico sigue en crecimiento. De forma comercial se producen principalmente dos clases de anticuerpos, los Ac monoclonales y Ac policlonales. Los anticuerpos policlonales se caracterizan por poseer más de un epítipo de reconocimiento, normalmente son obtenidos *in vivo*, mediante la inmunización de un organismo, con un antígeno específico que posea los epítopos de interés, con el fin de

producir una respuesta humoral sostenida para obtener títulos altos de anticuerpos, los cuales, son extraídos del suero del animal inmunizado mediante columnas de captura. Poseen ventajas como la detección de más de un epítipo, presentando una mayor afinidad al antígeno de interés, tolerancia a mutaciones del antígeno, ya que, al reconocer más de un epítipo, siempre habrá interacción del Ac por el Ag y son más económicos y fáciles de obtener frente a los monoclonales, pero poseen la desventaja de presentar reacción cruzada con otros antígenos no deseados. Por el contrario, los Ac's monoclonales se obtienen mediante el aislamiento e inmortalización de una única clona celular de linfocito B que produce un tipo específico de Ac, el cual está diseñado para reconocer un único epítipo. Las ventajas de los Ac's monoclonales son que permiten una homogeneidad en la producción, son altamente específicos para un exclusivo epítipo y su cuantificación es más sensible que de los Ac's. Por el contrario, los Ac's monoclonales son mucho más caros y su producción es más tardada (Lipman *et al.*, 2005).

Por su parte, los antígenos (Ag's), son molécula que son reconocidas como elementos extraños por el sistema inmune de un organismo y que pueden ser reconocidos por los anticuerpos y CTR de los linfocitos T, puede ser casi cualquier tipo de molécula biológica, por ejemplo, azúcares, lípidos, y hormonas, así como macromoléculas, por ejemplo, fosfolípidos, ácidos nucleicos y los más abundantes, las proteínas. Cabe aclarar la diferencia entre Ag e inmunógeno, ya que un Ag es cualquier molécula que pueda ser reconocida por los Ac's, pero para ser catalogada como inmunógeno, esta debe desencadenar una respuesta inmune.

Los Ag's son reconocidos específicamente por los anticuerpos mediante una interacción altamente selectiva en una región específica llamada, "determinante o epítipo" la cual puede tener una extensión de entre 6 y 12 aminoácidos. La clasificación de Ag's se puede dar en función de la cantidad de epítipos presentes en su estructura o dependiendo de la forma en que estos interaccionan con el Ac. En la primera clasificación, si se repite el mismo epítipo se denomina monovalente, pero si presenta más de un epítipo diferente se denomina polivalente. En la segunda clasificación, puede haber principalmente tres tipos de determinantes en la interacción con un Ag: lineales, tridimensionales y neo-antigénicos (**Fig.**

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

4). Los determinantes lineales se caracterizan por ser una secuencia de no más de seis aminoácidos. Cuando los determinantes lineales se encuentran de forma extendida o en la parte naturalmente expuesta de una proteína, son de fácil acceso para los Ac's. Por otro lado, los determinantes tridimensionales se presentan cuando en la estructura plegada de la proteína la secuencia de aminoácidos se presenta por una conformación yuxtapuesta expuesta al medio. Los determinantes neo-antigénicos se caracterizan por ser cercanos a regiones de modificación, por ejemplo, regios de fosforilación o proteólisis, los cuales después de sufrir un cambio estructural y/o conformacional, dejan accesible una región de reconocimiento específica para dicho producto (Abbas *et al.*, 2008).

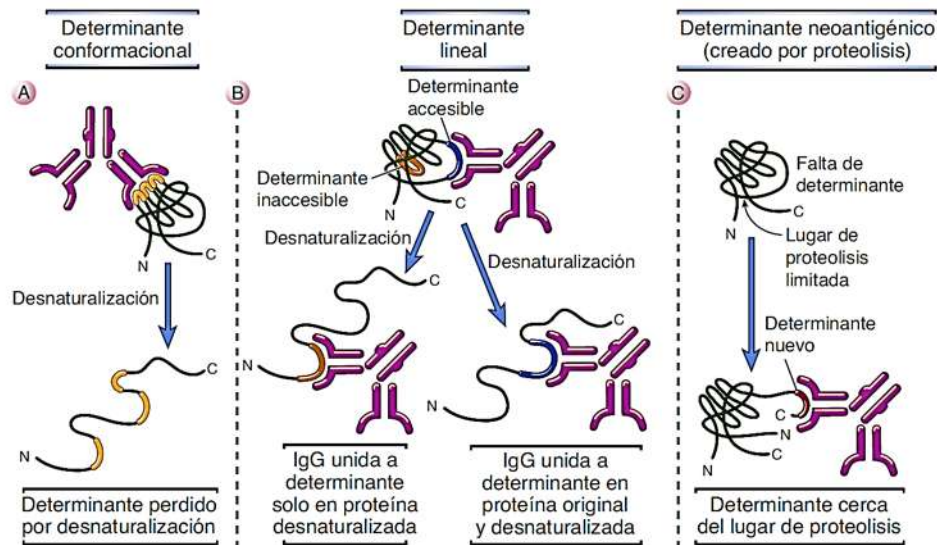


Figura 4. Naturaleza de los determinantes antigénicos. Tipos de reconocimiento que puede desempeñar un Ac al interactuar con su Ag (Abbas *et al.*, 2008).

La cualidad del anticuerpo de reconocer una gran variedad de antígenos de una forma específica permite el reconocimiento de agentes de gran tamaño y diversidad como antígenos virales. Los anticuerpos, reconocen y se unen a antígenos específicos en la superficie de la partícula viral. Estos antígenos son generalmente proteínas o glicoproteínas que forman parte de la cápsida o la envoltura del virus. La unión entre el anticuerpo y el antígeno es altamente específica, similar a una llave en una cerradura.

3.4. Electroquímica como herramienta de análisis

Los biosensores electroquímicos se basan en los principios de la electroquímica y sus técnicas para la determinación mediante variaciones en la relación materia–energía del medio en que se desarrollan. Para comprender mejor dicho proceso hay que entender que la electroquímica es una rama de la química encargada del estudio de la relación entre la materia y la energía eléctrica y las transformaciones que ambas sufren en función de la otra. Dicha relación se basa en la transferencia de electrones dentro del medio de estudio, estas transferencias son descritas por reacciones de Oxido–Reducción (redox).

La interface en un sistema electroquímico se compone por el electrodo y el electrolito, entre los cuales se realiza el intercambio heterogéneo de electrones, este intercambio puede brindar información muy importante como eventos redox, o analizar la resistencia, capacitancia e impedancia de la interface en función de la composición del electrodo o el electrolito, esto permite el empleo de técnicas como la voltamperometría cíclica (CV) o la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) como herramientas en técnicas electroanalíticas, permitiendo la detección y cuantificación de analitos en una muestra, siendo ampliamente utilizadas en inmunosensores (Bard *et al.*, 2001; Magar *et al.*, 2021).

3.4.1. Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

La espectroscopia de impedancia es una técnica ampliamente utilizada en diversas áreas dentro de la ciencia y la industria, ya que permite analizar procesos de corrosión, modificaciones en la interfaz electrodo/electrolito, caracterización y cuantificación de moléculas y estudio de recubrimientos en superficies, siendo ampliamente utilizada en la petroquímica y metalurgia. Actualmente ha tenido un gran impacto como técnica electroanalítica, aplicada a inmunosensores, ya que, a diferencia de otras técnicas como la cromatografía, ELISA o PCR, esta técnica es más sencilla y fácil de miniaturizar, además de ser económica, permitiendo diseñar ensayos en masa (Magar *et al.*, 2021).

La EIE se basa en el estudio de las características de impedancia de la interfaz electrodo-solución, mediante la aplicación de potenciales sinusoidales a distintas frecuencias, donde los valores de impedancias registradas cambian dado las interacciones entre el analito y el

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

biorreceptor. El objetivo es comprender el comportamiento de un sistema en función del desfase de frecuencia lo que permite obtener información sobre:

- Procesos capacitivos: procesos en los que el sistema almacena energía en forma de carga eléctrica semejante a un capacitor clásico, el cual está integrado por una separación entre las cargas correspondientes al electrodo y la doble capa (Cdl), siendo afectada por los componentes del inmunosensor.
- Procesos resistivos: procesos en los que el sistema se opone al movimiento de la carga eléctrica, descrito mediante la oxidación o reducción o de migración.
- Procesos de difusión de masa: procesos en los que iones o moléculas empleadas como sondas, son desplazadas hacia el electrodo en función de sus cargas, también llamado como impedancia de Warburg.

Cada uno de estos eventos ocurren en diferentes puntos de un sistema, y están ligadas a las condiciones experimentales, como son: el rango de frecuencias empleadas, la composición de la interfase, la presencia de sales REDOX y por ende la composición tanto de los electrodos como de la misma solución de lectura. Para que el sistema puede ser interpretado se emplea una herramienta que es inherente a la técnica, los circuitos equivalentes, como el que se ve representado en la **Fig. 5.**, en la que, los procesos electroquímicos pueden ser representado por un elemento de un circuito eléctrico, permitiendo así diseñar circuitos que sean equivalentes a los procesos llevados a cabo durante el ensayo de impedancia. Estos circuitos se diseñan con el objetivo de simular los procesos bioelectroquímicos que se están llevando a cabo en la superficie del electrodo, dentro de un software que permite analizar y recopilar los datos de interés.

Los componentes más comunes empleados para representar dichos eventos son las resistencias, los capacitores y los elementos de Warburg. El circuito por excelencia para describir procesos de impedancia ideales es el circuito de Randels, el cual se ve representando en la parte inferior de la **Fig. 5.**, es uno de los modelos más simples y comunes para describir los procesos en la interfaz electroquímica, en este circuito, la resistencia de la solución (R_s) está en serie con la combinación en paralelo del capacitor (Cdl) y de la resistencia ligada a la

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

transferencia de carga entre el electrodo y la solución (R_{ct}), y el elemento de Warburg (Z_w) está en serie con R_{ct} . Este circuito es útil para analizar y comprender los procesos electroquímicos en la interfaz electrodo-electrolito. En muchos de los casos, la impedancia no se comporta de una forma ideal, y para compensar esto se emplea otro tipo de componente, el elemento de fase constante (EFC). Esto se debe a que la falta de uniformidad y rugosidad de la superficie, e incluso a la porosidad, ocasiona que cada área submicroscópica da lugar a su propia combinación de resistencia-capacitor, pero la lectura macroscópicamente es la suma de todas estas contribuciones. Esto se ve graficado como semicírculos no simétricos y pendientes mayores a 45° . Por lo que un EFC representa una variedad de eventos, con comportamientos entre resistor y capacitor.

En el diagrama de la **Fig. 5** se observan los eventos electroquímicos que rodean a la EIE y las regiones donde se efectúan. El rectángulo azul abarca el capacitor dentro del sistema, el cual está compuesto por la doble capa dieléctrica entre las cargas del electrodo (esferas azules) y cargas de la solución (esferas naranjas). El rectángulo verde implica la resistencia de la transferencia electrónica, la cual toma lugar en procesos de oxidación o reducción del par REDOX disuelto en el medio (esfera roja), este dependiente de la matriz del inmunosensor, estrechamente relacionado con el capacitor. El rectángulo rosa describe los procesos de difusión de masa, donde iones son atraídos por efecto de la carga, hacia el electrodo, descrito como impedancia de Warburg. El rectángulo morado representa la resistencia intrínseca de la solución en la cual esta sumergida el electrodo, aunque por una representación más simple se detalló al extremo derecho, cercano al contraelectrodo, esta resistencia se ve involucrada con la integridad misma de la solución, afectando la comunicación de ambos electrodos. Dado el caso que la R_{tc} y la C_{dl} suceden al mismo tiempo, pero en diferentes puntos del sistema, estas se grafican en paralelo dentro de un circuito equivalente. (Randviir & Banks, 2022).

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

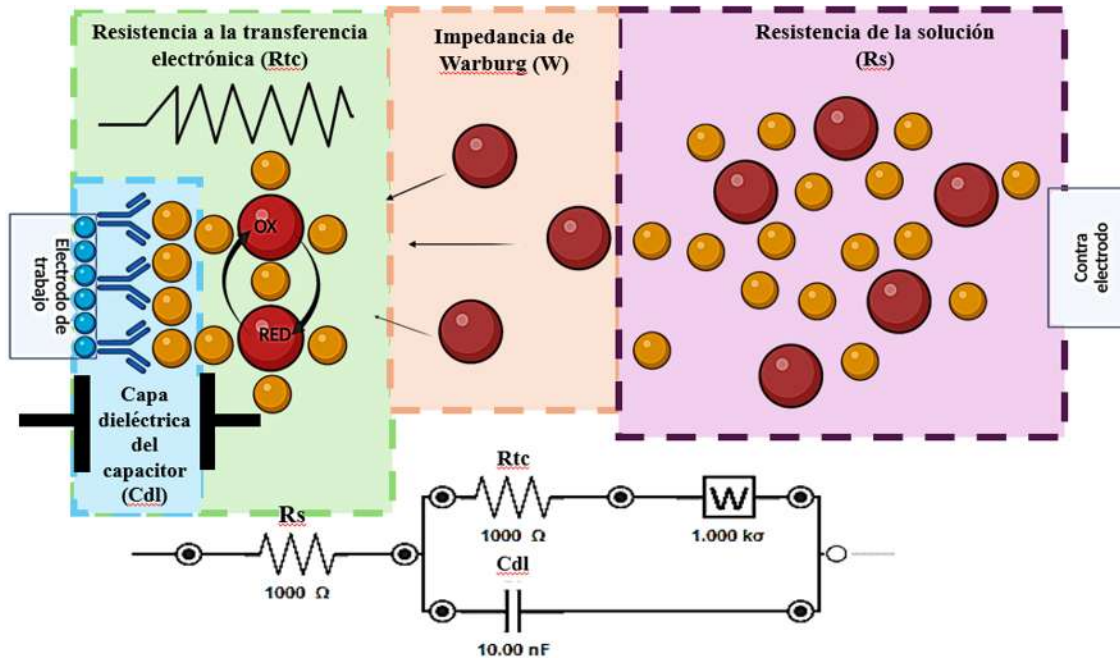


Figura 5. Representación esquematizada de un inmunosensor durante una EIE y su circuito equivalente. Diseñado en BioRender.

Las modificaciones en la superficie del electrodo afectan dramáticamente las señales obtenidas por EIE, por lo tanto, la EIE se usa ampliamente para monitorear interacciones Ag-Ac. En principio, si el electrodo al cual se le acoplo un anticuerpo se incubaba en un medio que contiene un antígeno complementario, el complejo Ag-Ac unido alterará la señal electroquímica, ya que, hay más elementos que interviene en el paso de una sonda redox a la superficie del electrodo; en consecuencia, la R_{tc} , siendo un indicador de que el material agregado tiene una mayor o menor resistencia respectivamente, la **Fig. 6** permite comprender mejor esto al observar cómo los diagramas de Nyquist van cambiando con cada modificación. Para la detección analítica, si este cambio de R_{tc} es proporcional a la concentración del antígeno dentro del medio de incubación, entonces el EIE se puede utilizar analíticamente. Normalmente, en aplicaciones de sensores, las frecuencias aplicadas se encuentran entre los 100 KHz y 1 Hz y la perturbación de voltaje a corriente alterna es pequeña, de 10 mV de amplitud, para obtener una respuesta lineal, lo que simplifica el análisis de los espectros. (Brett, 2022; Asav, 2021).

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

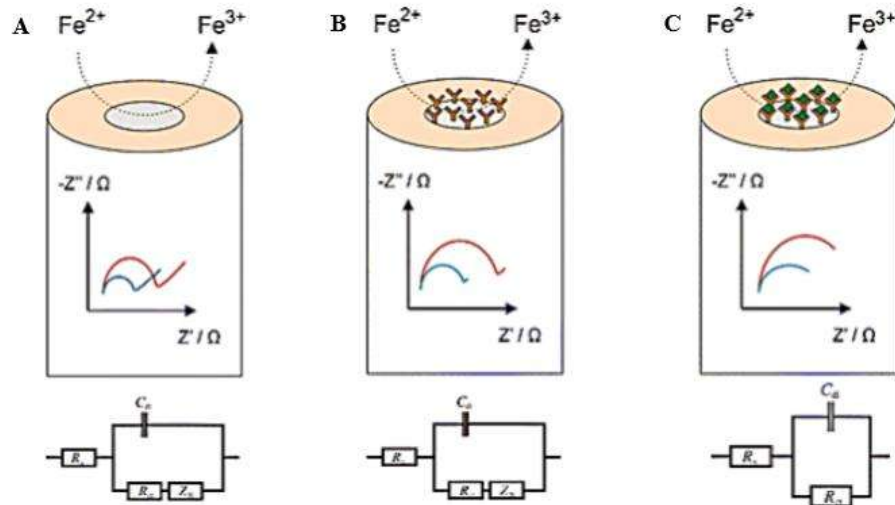


Figura 6 Representación de eventos REDOX en la superficie de los electrodos con sus respectivos diagramas de Nyquist y un modelo de circuito equivalente que coincide con el perfil de EIE observado experimentalmente. A) Electrodo desnudo interactuando con una sonda REDOX. B) Electrodo modificado con un Ac el cual interactúa con una sonda REDOX. C) Electrodo modificado con un Ac unido a un Ag el cual interactúa con una sonda REDOX. Los diagramas azul y rojo corresponden a diferentes concentraciones de sonda REDOX y sus correspondientes circuitos equivalentes. Modificado de Randviir & Banks, 2022.

Un ejemplo, los alcanotioles, disminuyen la permisividad con que los electrones pasan de la superficie del electrodo de trabajo a la sonda REDOX, debido a esto la R_{tc} aumenta, sin embargo, al ir modificando la monocapa autoensamblada (SAM), la resistencia se ve alterada nuevamente (Brett, 2022). Por ende, la forma de un diagrama de Nyquist depende de la matriz del electrodo (material del electrodo y las modificaciones que se le realicen) y de la respuesta impedimétrica que tiene lugar en la superficie de este o en la solución. Por lo tanto, se podrían generar diferentes curvas de diagrama de Nyquist. Gracias a esto se puede realizar la caracterización de las modificaciones de superficie mediante la evaluación del área electroactiva o la presencia de especies electroactivas o mediante la evaluación de la tasa de intercambio de electrones y ser empleada como técnica diagnóstica o de detección cuantitativa (Magar *et al.*, 2021) El diagrama de Nyquist es una de las más comunes formas de graficar los experimentos de EIE. Este tipo de diagramas se grafican enfrentado una impedancia real “ Z' ” (eje x) frente a una impedancia imaginaria “ Z'' ” (eje y). el diagrama de Nyquist se compone por puntos los cuales corresponden a un valor de impedancia en una frecuencia de onda específica. El diagrama de Nyquist se forma cuando hay procesos

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

Faradaicos dentro de una solución electrolítica con una sonda REDOX, donde se observan una transferencia de electrones, por lo que es mayormente empleada para analizar procesos resistivos, obteniendo datos como la R_s , R_{ct} y Z_w . Encontrando las frecuencias más altas a la izquierda del diagrama, correspondiente al semicírculo y la R_{ct} , por el contrario, las frecuencias más bajas a la derecha corresponden a la impedancia de Warburg. Dentro del diagrama la R_s es el punto de inicio del gráfico, la R_{ct} es proporcional al diámetro de un semicírculo y la Z_w se ve descrita por una pendiente a 45° , tal y como se observa en la **Fig. 7**. A partir de los diagramas de Nyquist se determinan y conectan los elementos del circuito equivalente de acuerdo con la forma del diagrama. En este punto hay un debate entre los autores sobre la construcción del circuito, mientras que estipula que se debe desarrollar un circuito bajo una base teórica para determinar si el proceso es correcto o no, con la finalidad de minimizar la ambigüedad, otros estipulan que los datos experimentales son lo primero y más importante y que en función de los datos colectados, se hace la construcción del circuito. Por lo tanto, la curva EIE es el dato más importante que se debe obtener primero, y luego se evalúan las características de la superficie a partir del ajuste de la simulación del circuito eléctrico. Por fines prácticos, esto último es lo más descrito en la bibliografía. (Magar *et al.*, 2021; Randviir & Banks, 2022).

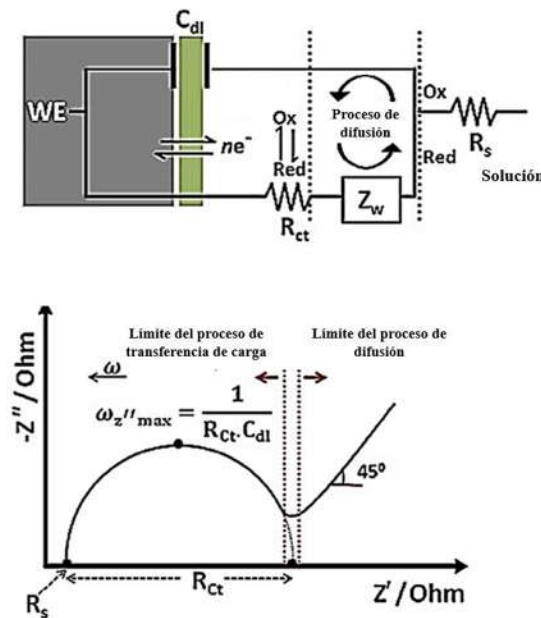


Figura 7 Relación de un esquema de una celda electroquímica con sus componentes y correspondiente identificación en un diagrama de Nyquist.

4. JUSTIFICACIÓN

La técnica estándar de oro para el diagnóstico del PRRSV, consiste en la cuantificación de copias de ARN viral, empleando la técnica de PCR con transcripción inversa. Este método es ampliamente utilizado porque presenta ventajas tales como, alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, implica algunos retos, requiere transporte de la muestra, el tiempo de procesamiento es de uno a dos días y el personal para realizarlo requiere adiestramiento.

Así mismo, las técnicas para detección de antígenos virales, midiendo cuantitativamente la presencia de la partícula viral han tenido un gran auge a partir de la pandemia de COVID-19. Los biosensores, emergen como una opción viable para la cuantificación de biomoléculas. Por lo cual, proponemos diseñar una tecnología inédita que permita el diagnóstico cuantitativo del antígeno PRRSV mediante un prototipo de biosensor electroquímico.

5. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un biosensor electroquímico para cuantificar el antígeno PRRSV.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el biorreconocimiento de un anticuerpo anti-GP5 y de antígenos peptídicos de PRRSV.
2. Funcionalizar electrodos serigrafiados.
3. Determinar la relación entre la concentración de antígeno/ anticuerpo y las variables de resistencia a la transferencia de carga (RTC).

4. Determinar la relación entre la concentración de antígeno/ anticuerpo y la capacitancia de los biosensores.

7. MATERIALES

7.1. Materiales

Péptidos

Se diseñaron tres péptidos a partir de la proteína GP5 denominados: GP5B1, GP5B2 y GP5B3. El péptido GP5B3 está constituido por la mezcla de epítomos neutralizantes de los péptidos GP5B1 y GP5B2. A su vez se diseñaron dos péptidos más, PNEU1 y PNEU2, basados en epítomos neutralizantes exclusivamente. Los péptidos diseñados presentaron las siguientes características: alto grado de homología entre cepas (GP5-B del 93-100% para el PRRSV tipo 1, 96-100% para PRRSV tipo 2 y 94-100% para HP-PRRSV. Para GP5-B3, la cobertura de la consulta fue del 77 al 96 % para el PRRSV tipo 1, del 92 al 96 % para el PRRSV tipo 2 y del 90 al 96 % para el HP-PRRSV) y una longitud de entre 27 y 33 aa (Perez-Duran *et al.*, 2024).

Los péptidos fueron obtenidos por síntesis química en la empresa Gen Script (Piscataway, New Jersey, USA). Se diseñaron a partir de un análisis *in silico* utilizando los protocolos *B Cell Epitope Prediction Tools* de la *Immune Epitope Data Base* IEDB (Perez Duran, 2020; Zamora Avilés, 2021). En la siguiente tabla se presentan la secuencia y el peso molecular de los péptidos derivados de GP5

Tabla 3. Secuencia y análisis de los péptidos sintetizados por Gen Script.

Péptido	Secuencia	Tamaño	MW
GP5B1	SSSNLQLIYNLTGKVEVEGHLLI-DLKRVVLC	30 aa	3364.93
GP5B2	TPVTRVSAEQWGRPGKVEVEGHLLI-DLKRVVLC	32 aa	3573.15
GP5B3	SSSNLQLIYNLTTPVTRVSAEQWGRPC	27 aa	3044.42
PNEU1	SSSNLQLIYNLT	12 aa	1375.53
PNEU2	TPVTRVSAEQWGRP	14 aa	1583.75

Anticuerpos

Se adquirieron anticuerpos comerciales que fueron empleados para la construcción del biosensor, la determinación de inmunorreactividad frente a los péptidos y el virus atenuado MLV PRRSV FOSTERA (Tabla 4).

Tabla 4 Anticuerpos policlonales enlistados empleados en los experimentos

Descripción	Hospedero	Etiqueta	Casa comercial
Anti-PRRSV-GP5	Conejo		Bioss Antibodies bs-4504R
Anti-rabbit IgG- HRP	Cabra	HRP	Cell Signalling #7074.

Placa de ELISA

Para la prueba de ELISA se utilizó el kit comercial (Takara Peptide Coating Kit, No. Cat. MK100). El Kit permite unir eficientemente proteínas de bajo peso molecular o péptidos sintéticos que son de difícil adsorción en placas comunes, por medio de la unión de los grupos carboxilo (-COOH) libres en los péptidos a los grupos amino (-NH₂) del fondo de la superficie de la microplaca (**Fig. 8**).

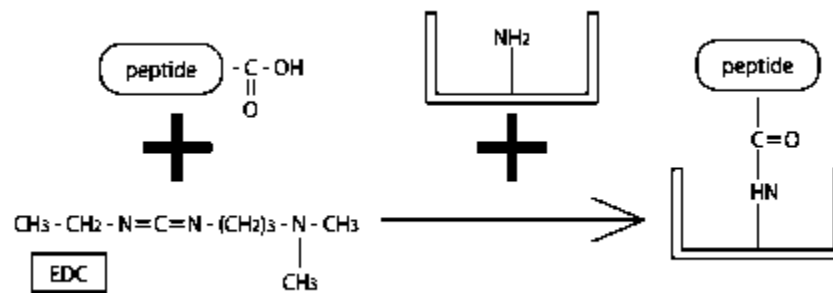


Figura 8. Esquema de acoplamiento del péptido sobre la placa del kit. La flecha indica el fondo de la placa forrada con carbodiimida, el símbolo + indican la adición de los componentes de la reacción. Un grupo amino (NH₂) libre que reaccionará con el extremo carboxilo del péptido. Tomado de Takara Bio Inc. Manual peptide coating kit.

Antígeno PRRSV

El virus vacunal modificado de la cepa P129 fue obtenido de la casa comercial Foster Zoetis con el No. Cat. Reg. B-1196-247. Se realizaron alícuotas en tubos de 1 ml con 30 mg cada

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

uno, se mantuvo almacenada a 4°C. Se suspendió en la solución proporcionada por el proveedor incluida en el producto

Electrodos serigrafiados de oro AuSPE BVT

Electrodos con disco de oro (de 1 mm) como electrodo de trabajo, un contraelectrodo de platino y un pseudo-electrodo de referencia de plata, sobre una superficie de cerámica. Modelo AC1 W1R1. Marca BVT, modelo AC1

Ferrocianuro de Potasio

Ferrocianuro de Potasio $K_3[Fe(CN)_6]$, J. T. Baker® de pureza del 98.8%).

Ferricianuro de Potasio

Ferricianuro de Potasio pentahidratado ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 5H_2O$, J.T Baker®, pureza del 98%).

Amortiguador de fosfatos

Amortiguador de fosfatos (pH= 7.2) y 0.15 M de Cloruro de Sodio (Thermo Scientific®).

N-acetil-L-cisteína

Se emplea como molécula de funcionalización para la construcción del inmunosensor N-Acetil-L-cisteína de la marca Sigma-Aldrich con número de catálogo A7250-50G

Carbodiimida (EDC)

1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (Aldrich Chemistry®, 97% de pureza).

N-hidroxisuccinimida (NHS)

N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma Aldrich®, 98% de pureza).

8. METODOLOGÍA

8.1 ELISA de Anticuerpo Policlonal PRRSV–GP5 frente péptidos derivados de la proteína GP5

Se realizó un ensayo ELISA indirecto utilizando el Takara Peptide Coating Kit, No. Cat. MK100. Se realizó la preparación de la placa acorde las especificaciones del proveedor.

Los péptidos se suspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, con la finalidad de que el péptido se encuentre en forma lineal durante su acoplamiento a la placa, para que finalmente quedara a una dilución de $4\mu\text{l}$ de péptido por ml de DMSO, reemplazando al buffer de reacción provisto en el kit. También el reactivo de acoplamiento incluido en el kit se disolvió en DMSO, de esta manera el protocolo que se utilizó para la detección de Ac's contra los péptidos fue el siguiente:

Se depositaron $50\mu\text{l}$ de péptido-DMSO en cada pocillo de la placa de reacción provista por el kit, posteriormente se agregaron $10\mu\text{l}$ de reactivo de acoplamiento a cada pocillo con péptido-DMSO, se mezcló y se dejó incubando por 12 h a 4°C . Transcurrido el tiempo de incubación, se desechó la solución. Se realizaron 3 lavados con agua. Para el bloqueo de uniones inespecíficas se utilizaron $200\mu\text{l}$ de buffer de bloqueo el cual fue preparado con Buffer PBS Tween 0.05% y gelatina de pescado al 0.05% e incubó por 2 h a TA. Transcurrido el tiempo de incubación se desechó la solución vertiendo, y golpeando vigorosamente sobre una toalla de papel. Se realizaron 3 lavado con $100\mu\text{l}$ de agua tridestilada.

En este punto se realizó la incubación con el Ac primario para probar su inmunorreactividad frente a los péptidos. Se preparo el PRRSV–GP5 Polyclonal Antibody a una concentración 1:1000 en PBS Tween 0.05% y se adicionaron $100\mu\text{l}$ por pocillo, se incubo durante 2h a TA. Posterior a la incubación se desechó la solución vertiendo y golpeando vigorosamente sobre una toalla de papel. Se realizaron 3 lavados con $100\mu\text{l}$ de agua tridestilada y en cada lavado. Se adicionó el Ac secundario (Goat Anti-rabbit IgG - HRP) a una concentración de 1:1300 en PBS/Tween 0.05% (PBST) y se dejó incubar nuevamente 2 h a TA en oscuridad. Se realizaron 3 lavados con PBS/Tween 0.05%, se depositaron $100\mu\text{l}$ de sustrato ABTS y se

realizaron lecturas a una densidad óptica de 415 nm cada 5 minutos, detectando el pico máximo estable a los 15 minutos.

8.1. Construcción del inmunosensor.

Se utilizaron electrodos serigrafiados de oro (AuSPE) de la marca BVT, la construcción se llevó a cabo mediante la formación de una monocapa autoensamblada (SAM), siguiendo los pasos planteados en el esquema de la **Fig. 9**, el cual consta del acoplamiento inicial de N-acetil-L-cisteína (NAC), mediante su grupo tiol, el cual formaría un enlace tiol-metálico entre el átomo de azufre del aminoácido y átomos de oro de la superficie del WE. Posteriormente se incubó con una solución de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), con la cual se obtuvo la activación del grupo carboxilo del NAC mediante la adición de un grupo NHS-éster reactivo a aminas y permitió la unión con algún donador de aminas primarias en este caso el Ac anti-GP5. Se realizó un bloqueo de uniones inespecíficas mediante una molécula inerte, BSA. Construido el inmunosensor, se realizaron ensayos de inmunodetección frente al antígeno de PRRSV un (MLV, Foster®). Durante la construcción del inmunosensor se caracterizaron las modificaciones por EIE, en conjunto para tener bajo diferentes técnicas un registro de los eventos presentes en los electrodos con cada tratamiento.

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

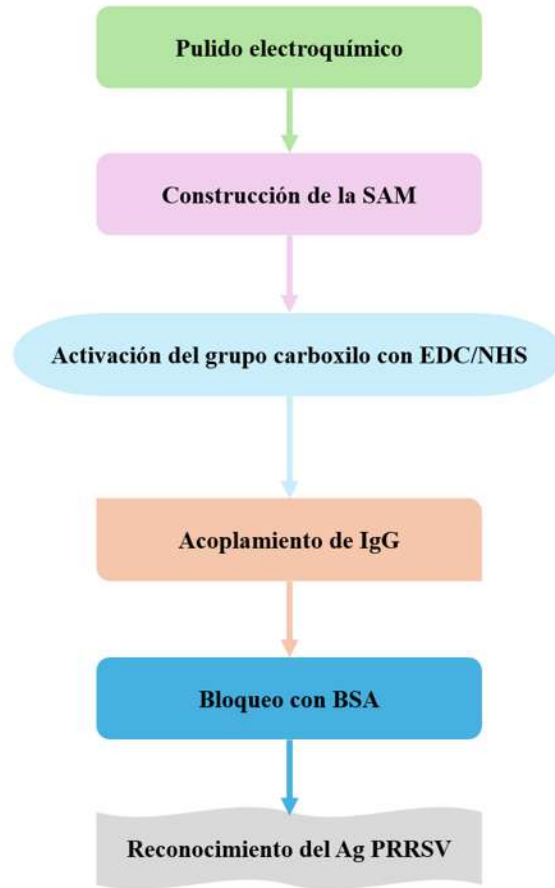


Figura 9. Diagrama de trabajo para la construcción de un inmunosensor.

Para las lecturas electroquímicas se empleó el potenciostato PalmSens 4 de la marca Metrohm. Como sonda se empleó una mezcla equimolar de ferricianuro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$) y ferrocianuro de potasio ($K_4[Fe(CN)_6]$) al 5 mM, disuelto en buffer PBS pH 7. Para la caracterización del biosensor se empleó la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) aplicando una perturbación sinusoidal de potencial con frecuencias de 1Hz a 100 KHz y perturbación de amplitud de 0.1 V frente al potencial de circuito abierto.

8.2. Limpieza Electroquímica

Se preparó una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 10 mM en agua desionizada. Se sumergieron los electrodos y se realizaron dos series de experimentos de VC. En la primera se aplicó una VC una ventana de potencial de -0.2 a 1.3 V a una velocidad de barrido de 0.1 V/s, obteniendo el perfil de oro. En la segunda serie se utilizó una venta de potencial de 0.75 a 0.2 v a misma velocidad de barrido con 10 ciclos. Ambas lecturas fueron enfrentadas en su

potencial de inicio (0.0 y 0.2 V respectivamente) contra el OCP. (Bertok *et al.*, 2016; Tkac & Davis, 2008).

8.3. Construcción de la monocapa autoensamblada

Posterior a la limpieza electroquímica, los electrodos serigrafiados de oro (AuSPE), fueron limpiados con agua desionizada y se dejaron secar. Para la funcionalización del electrodo se preparó una solución de N-acetil-L-cisteína al 25 mM, en buffer PBS pH 7.2. Con ayuda de una pipeta de 10µl se colocaron sobre la superficie del electrodo de trabajo 1.5 µl, cuidando de no contaminar el RE ni el CE y se dejó incubar por 2 h. Posteriormente fueron lavados con PBS por goteo para eliminar residuos de moléculas no unidas, y se dejaron secar al ambiente secados, se leyeron por CV y EIE y desechados.

8.4. Activación de los grupos carboxilo

Para la activación del grupo carboxilo se empleó una reacción en conjunto de carbodiimida e hidroxisuccinimida, para lo cual se prepararon por separado las soluciones equimolares al 0.2 M, en buffer PBS pH 7.2 , ya preparadas se mezclaron en relación 1:1. Con ayuda de una pipeta de 10µl se colocaron sobre la superficie del electrodo de trabajo 1.5µl de la solución recién preparada, cuidado de no contaminar el RE y se dejó incubar por 2 h a TA, posteriormente fueron lavados con PBS por goteo para eliminar residuos de moléculas no unidas, se leyeron por CV y EIE y desechados. La **Fig. 10** describe la reacción realizada sobre el grupo carboxilo de NAC con la reacción EDC/BHS. La carbodiimida reacciona con un grupo carboxilo, el cual se desprotona y se le incorpora un nuevo grupo funcional enlazado con el oxígeno, un ortoacilisourea intermediado, este grupo funcional en sí mismo ya es capaz de reaccionar con un grupo amino, permitiendo un enlace amina, sin embargo, este intermediario es inestable por lo que, si la reacción no se efectúa, se hidroliza el o-acilisourea intermediario. Por esta razón se emplea en conjunto la hidroxisuccinimida, la cual, sustituye este grupo funcional por un NHS éster amina reactivo, el cual es mucho más estable e igual permite un enlace amida con una amina primaria.

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

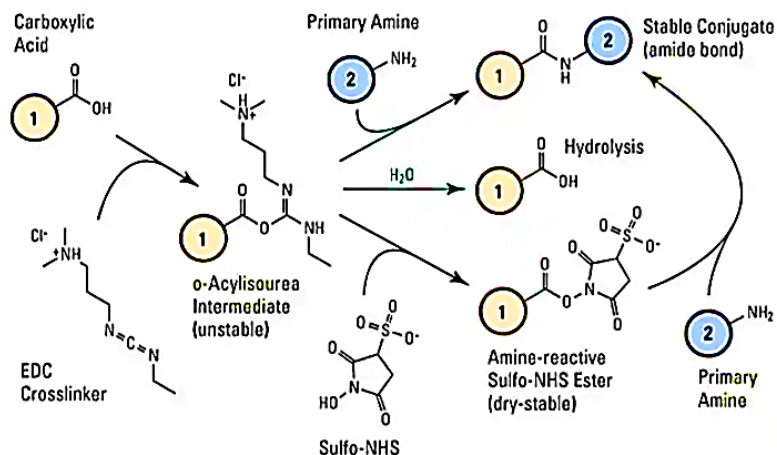


Figura 10. Representación esquemática de la reacción de EDC y NHS sobre un grupo ácido carboxílico. El EDC reacciona con el grupo carboxilo, generando un nuevo grupo funcional, un orto-acilisourea intermediario, el cual es inestable, ya que si no entra en contacto con una amina primaria, es hidrolizado, por lo que a la reacción se debe acoplar un segundo reactivo, la NHS, la cual reacciona con el grupo intermediario desplazando la carbodiimida y formando una amina reactiva NHS éster, la cual es más estable y al interaccionar con un grupo amino, forma un enlace amida permitiendo la unión entre 2 moléculas de interés

8.5. Acoplamiento del anticuerpo

Con la SAM apropiada se procedió al acoplamiento del anticuerpo como molécula de biorreconocimiento. Se preparó una dilución a partir del stock de anticuerpos comercial IgG anti GP5, la cual se encontraba a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 10 ng/ml en PBS. Con ayuda de una pipeta de 10 μl se colocaron sobre la superficie del electrodo de trabajo 1.5 μl de la solución recién preparada, cuidado de no contaminar el RE y se dejó incubar por 1 h a TA, posteriormente fueron lavados con PBS por goteo para eliminar residuos de moléculas no unidas y fueron secados al ambiente, se leyeron por CV y EIE y desechados.

8.6. Bloqueo de uniones inespecíficas

Se procedió a realizar el bloqueo de uniones inespecíficas, para lo cual se empleó albumina de suero bovina (BSA) al 0.1 M, en PBS pH 7.2. Con ayuda de una pipeta de 10 μl se colocaron sobre la superficie del electrodo de trabajo 1.5 μl de la solución recién preparada, cuidado de no contaminar el RE y se dejó incubar por 1 h a TA, posteriormente fueron lavados con PBS por goteo para eliminar residuos de moléculas no unidas y evitar arrastrar

las modificaciones, fueron secados sobre una toalla de papel, se leyeron por CV y EIE y desechados.

8.7. Interacción Ag-Ac a través de electroquímica.

Para determinar la interacción Ag/Ac en el sistema del biosensor se disolvió un vial de 30 mg del antígeno de PRRSV (MVL PRRSV Foster®) en 15 μ l de PBS obteniendo una concentración final de 2 mg. Se depositó la solución en 3 inmunosensores construidos. Con ayuda de una pipeta de 10 μ l se colocaron sobre la superficie del electrodo de trabajo 1.5 μ l de la solución recién preparada, cuidado de no contaminar el RE y se dejó incubar por 1 h a TA, posteriormente fueron lavados con PBS por goteo para eliminar residuos de partículas virales no unidas y evitar arrastrar las modificaciones, fueron secados sobre una toalla de papel, se leyeron por CV y EIE.

8.8. Curvas de calibración

Se realizaron dos curvas de calibración en las cuales se comparó la variación de R_{tc} y capacitancia, a diferentes concentraciones de IgG, como control de construcción del inmunosensor y en la detección del antígeno PRRSV. Se prepararon las soluciones de Ac anti-GP5 y del Ag PRRSV y se incubaron tres electrodos por cada concentración, se midieron por EIE y obtuvieron los datos correspondientes, ajustados a los circuitos que describieran mejor el comportamiento.

Curva de calibración del Ac

Para la curva de calibración de IgG, se prepararon tres soluciones a diferente concentración de anticuerpo, 5ng, 10 ng, 20 ng y 40 ng, se utilizaron 12 electrodos activados por EDC/NHS y se dividieron en 4 grupos de 3 electrodos. Un grupo se dejó en PBS, y el resto de los grupos fueron incubados por 1 h a TA con una de las 3 diluciones. Fueron leídos por EIE y se ajustaron a un circuito equivalente para la posterior recolección de datos de R_{tc} y capacitancia y el diseño de una regresión lineal de los datos. Se descartaron datos que no correspondieran con la respuesta observada.

Curva de calibración del Ag PRRSV

Para la curva de calibración se prepararon cinco soluciones a diferente concentración del Antígeno PRRSV, de acuerdo con 30ng, 60 ng, 120 ng, 240 ng y 500 ng, se construyeron 18 inmunosensores y se dividieron en 6 grupos de 3 inmunosensores cada uno. Un grupo se dejó en PBS y el resto se incubaron por 1h a TA con una de las 5 soluciones. Fueron leídos por EIE y se ajustaron a un circuito equivalente para la posterior recolección de datos de Rtc y capacitancia y el diseño de una regresión logarítmica de los datos.

8.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y construcción de graficas de barras y curvas de calibración se empleó el programa GraphPad Prisms V9.

Para la evaluación de las inmunorreactividad del anticuerpo comercial anti-GP5 frente a péptidos derivados de la proteína GP5 se realizó un análisis ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey para realizar comparación de medias entre las medias, de cada grupo, n=3.

Para el análisis de Rtc y capacitancia al comparar las lecturas durante la construcción del inmunosensor se realizaron análisis ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey para realizar comparación de medias entre las medias, de cada grupo, n=4.

Los niveles de significancia de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ se consideraron estadísticamente significativos, los datos presentan la media \pm DE.

Las curvas de calibración se analizaron mediante regresión logarítmica, se presenta el coeficiente de determinación (R^2). Los niveles de R^2 se expresan de 0.7 al 1, demostrando una correlación fuerte, mientras que la R^2 de 0.3 a 0.6 representan una correlación moderada y los datos presentan correlación débil con $R^2 \leq 0.3$.

Para la construcción de los circuitos equivalentes y obtención de los datos se empleó el programa PsTrace 5.10.

Para el ajuste de los diagramas de Nyquist y ajuste de los perfiles del oro se utilizó el programa OriginPro 2018.

9. RESULTADOS

9.1. Evaluación del reconocimiento Ag-Ac del PRSSV, para validar el uso del Ac en la preparación de los biosensores

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se había utilizado un Ac comercial para la detección del Ag PRRSV en cultivos celulares. Por lo tanto, resultó importante determinar la utilidad del Anticuerpo comercial como parte del control de calidad de los componentes de los biosensores (Zamora Avilés, 2021).

El Ac policlonal PRRSV-GP5 (bs-4504R) reconoce antígenos peptídicos de PRRSV, los cuales se han descrito como epítomos de Linfocitos B (Pérez-Duran *et al* 2024). Sin embargo, resultó importante determinar la utilidad de este Ac para la construcción de los biosensores. Por lo que se evaluó el reconocimiento de varios péptidos diseñados contra la proteína GP5 a través de un ensayo de ELISA indirecto. PRRSV-GP5 reconoció los péptidos GP5-B, GP5-B1, GP5-B2, GP5-B3, PNU-1, pero no reconoció al péptido PNU-2 (**Fig. 11**). Cabe destacar que los péptidos GP5-B, GP5-B1 y GP5-B2 mostraron un mayor reconocimiento por el Ac PRRSV-GP5, en comparación con los péptidos GP5-B3 y PNU-1.

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

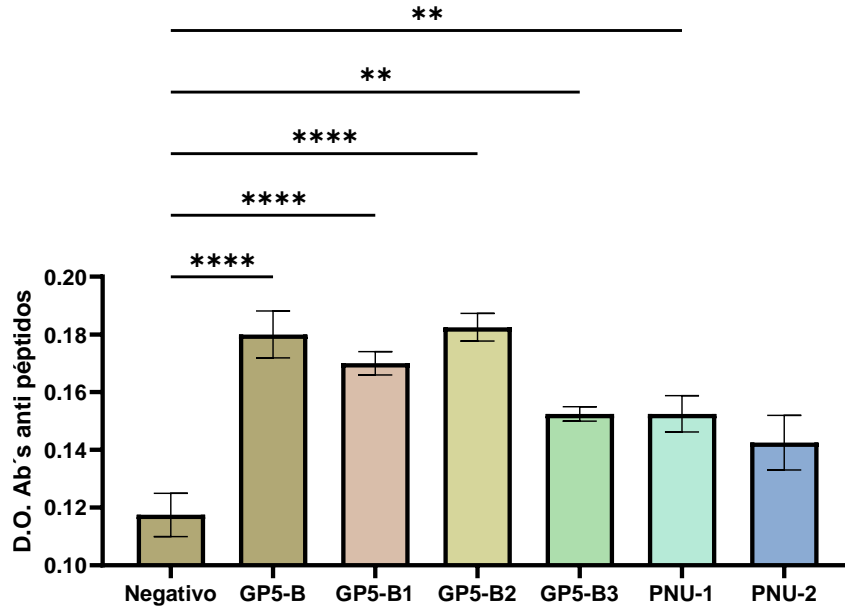


Figura 11. Biorreconocimiento de epítomos de PRRSV utilizando el Ac comercial policlonal PRRSV. El número de asteriscos representa diferencia significativa (* $p < 0.05$, ** $p < 0.0022$; **** $p < 0.0001$). ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey, los datos presentan \pm S.E.M.

Estos resultados indican una alta afinidad del anticuerpo policlonal contra epítomos específicos de la proteína GP5. Con estos datos se propone que el Anticuerpo policlonal PRRSV-GP5 reconoce preferentemente los epítomos localizados en los péptidos GP5-B \geq GP5-B2 \geq GP5-B1 \geq GP5-B3 \geq PNU-1 \geq PNU2. Por lo tanto, el Ac anti GP5 de PRRSV, se utilizó en la construcción de los biosensores para detectar el antígeno PRRSV.

9.2. Limpieza y decapado electroquímica de los electrodos

Mediante la limpieza electroquímica se obtuvo el perfil del oro de los electrodos. Los picos registrados corresponden a la formación de una película de óxidos de oro (A) y reducción de óxidos (C), característicos de los electrodos planos de oro. Los picos registrados en el voltamperograma corresponden a la formación de una película de óxidos de oro (A1) y evolución de oxígeno (A2). Por otro lado, los picos C1 que corresponden a los procesos catódicos. Los voltamperogramas presentaron una mínima variación (**Fig. 12**) permitiendo interpretar que, los electrodos poseen una superficie homogénea, con mínimas variaciones. Estas pequeñas variaciones se pueden ligar a la porosidad y rugosidad del serigrafado, así

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

como la cristalografía de los átomos de oro y por ende una accesibilidad a interactuar con el medio, en este caso la formación de óxidos de oro.

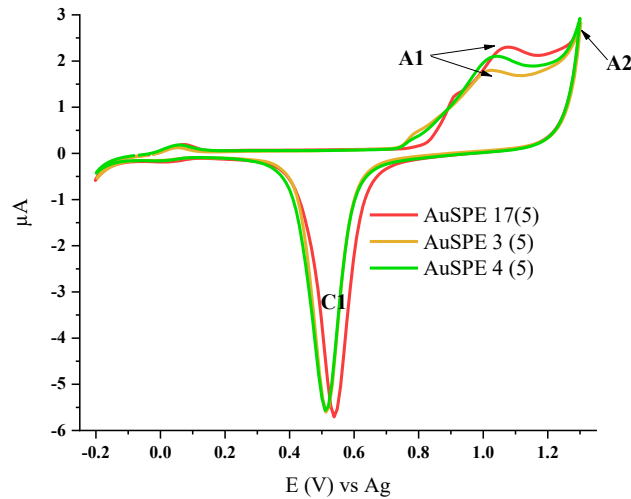


Figura 12. Perfil del oro de AuSPE de la marca BVT. Se presenta el ciclo 25 del escaneo de 3 AuSPE. Se obtuvieron en una solución en H₂SO₄ 10 mM. A1) Formación de capas de óxido de oro en la superficie del AuSPE. A2) Evolución del oxígeno presente en la solución. C1) Reducción de la película de óxido de oro en la superficie del AuSPE. Las condiciones de lectura fueron, ventana de potencial de -0.2 a 1.3 V, velocidad de barrido de 100 mV/s y saltos de potencial de 10 mV.

La **Fig. 13** muestra 3 diagramas de Nyquist correspondientes a 3 electrodos respectivamente, posteriores a la limpieza electroquímica, el comportamiento observado es la impedancia registrada por cada electrodo al ser leídos en la solución sonda. Al realizar el ajuste con el circuito equivalente (**Fig. 19 B**) se observó que los procesos capacitivos y de difusión no eran ideales, por lo que se puede decir que la variación de R_{tc} presente entre cada electrodo se debe a una heterogeneidad en la superficie de los electrodos. Por el contrario la capacitancia de los electrodos desnudos no presentó una variación entre sus datos.

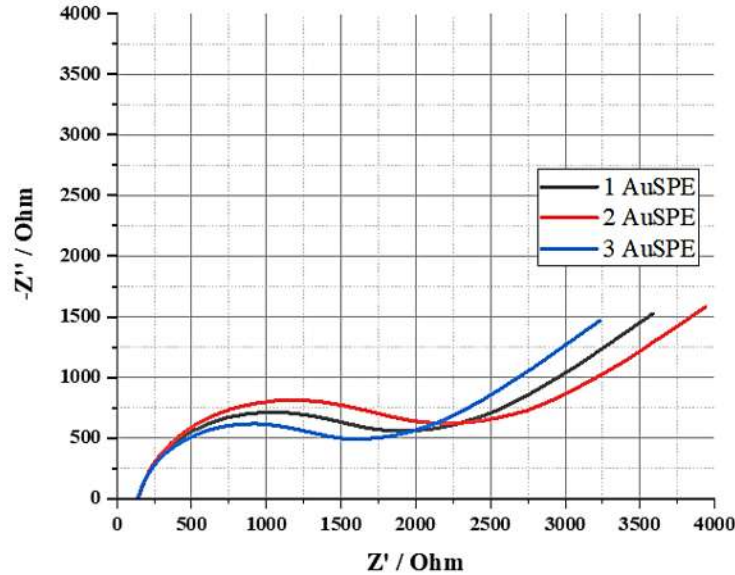


Figura 13. Análisis de EIE de AuSPE desnudos. (A) Los diagramas de Nyquist de AuSPE se obtuvieron por EIE, en un rango de frecuencias de 100 kHz a 1 Hz, con perturbación de onda de 10 mV y potencial de polarización de 0.0 V. Cada diagrama corresponde al espectro de electrodos diferentes.

9.3. Caracterización del Inmunosensor por EIE

La **Fig. 14** presenta el análisis de EIE graficado en diagramas de Nyquist. Se observa una disminución en la impedancia. El salto de impedancia que se presenta de un electrodo desnudo (sin tratamiento) al electrodo modificado con la monocapa autoensamblada (AuSPE-NAC), y su subsecuente disminución con las posteriores modificaciones, atribuido a las propiedades de las moléculas funcionalizadoras. El recubrimiento de la superficie del electrodo de trabajo con el NAC disminuyó la facilidad de transporte de electrones entre el electrodo y la sonda ferri/ferro, aumentando la resistividad del electrodo. Al realizar las posteriores modificaciones del electrodo, la resistividad en la superficie del electrodo se disminuye, aumentando la facilidad con que entra en contacto la sonda y por ende la cantidad de iones reducidos es mayor, siendo correspondiente a la reducción del semicírculo de los posteriores diagramas de Nyquist

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

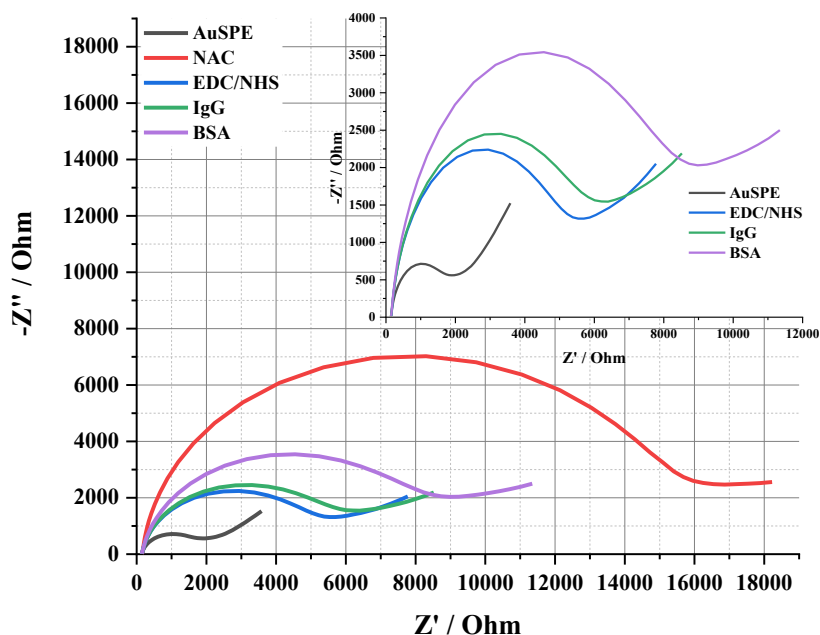


Figura 14. Análisis de EIE en diagramas de Nyquist durante la construcción del Inmunosensor. Se observa un aumento de impedancia a partir de la modificación con NAC, volviendo a disminuir en las posteriores modificaciones. Se midieron en sonda ferri/ferro 5 mM $n=3$. La EIE se midió en un rango de frecuencias de 100 KHz a 1 Hz, se aplicó una perturbación de potencial de 10 mV frente al OCP y un potencial de polarización de 0.0 V.

Como control durante la construcción del inmunosensor se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones de IgG, los electrodos se leyeron por EIE y ajustados al circuito (**Fig. 19 B**). Con los datos obtenidos se graficaron dos diagramas de dispersión, los cuales, al presentar una distribución no paramétrica, fueron analizados mediante regresión logarítmica, ya que este sistema matemático permitía un mejor análisis del comportamiento de los datos estudiados. En la **Fig. 15 A** se observó una relación directa entre el aumento de concentración de IgG anti-GP5 y el aumento de la resistencia sobre el electrodo. Este indicador permitió asegurar el correcto acoplamiento del anticuerpo. Además, mediante el análisis de regresión logarítmica se obtuvo un coeficiente de determinación $R^2= 0.93$, demostrando una fuerte relación entre la concentración del Ac y la resistencia. En cuanto al fenómeno de capacitancia, se observó que, al aumentar la concentración del Ac, se presenta una disminución de microfaradios cuantificables (**Fig. 15 B**). Esto se puede deber a que, a mayor concentración de anticuerpos, la capa dieléctrica disminuye, por ende, la cantidad de

energía que el sistema es capaz de almacenar. Se obtuvo una $R^2 = 0.8$, demostrando una fuerte relación entre el aumento de concentración de Ac y la disminución de capacitancia.

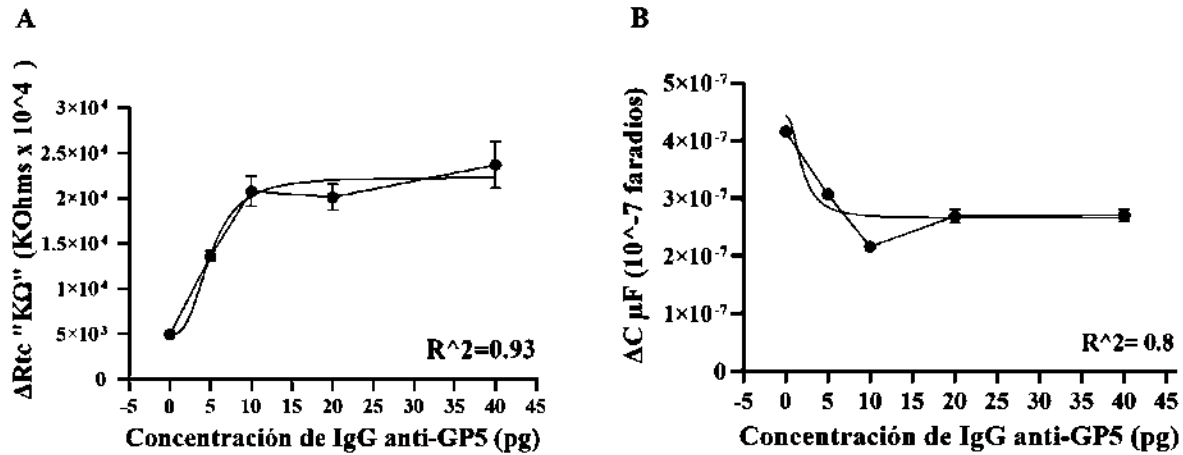


Figura 15. Curva de calibración utilizando diferentes concentraciones de IgG anti-GP5. A) Las gráficas de dispersión presenta el aumento de concentración de IgG anti-GP5 frente al cambio observado de Rtc y capacitancia. Se observa una relación entre el aumento de concentración con el aumento de Rtc, el análisis de regresión logarítmica presentó una $R^2= 0.93$ denotando una relación fuerte entre el aumento de concentración con el aumento de Rtc. B) La curva de calibración presenta concentración frente a ΔC , se observa una correlación entre el aumento de concentración con la disminución de capacitancia, el análisis de regresión logarítmica presentó una $R^2= 0.8$ denotando una relación fuerte entre el aumento de concentración con la disminución de capacitancia.

Posterior a la caracterización del inmunosensor, se procedió a la identificación del antígeno PRRSV. El análisis de EIE permitió observar la presencia de un evento particular, la formación de un segundo semicírculo (**Fig. 16**), lo que sugiere la presencia de un proceso capacitivo involucrado en el almacenamiento de energía y al paralelo un evento de resistencia. Para integrar ese fenómeno se incluyó un nuevo circuito que describiera los procesos electroquímicos en la interacción Ac-Antígeno PRRSV. El circuito que mejor represento este evento está representado en la **Fig. 19 C**. La presencia de un segundo semicírculo se ha observado en otros trabajos (Brazaca *et al.*, 2022), en ese caso en particular, la detección viral se realizó mediante inmunosensores impedimétricos. Esto podría sugerir que los virus forman su propia capa dieléctrica, independiente a la del inmunosensor, y que el tamaño de esta capa podría ser proporcional a la concentración del virus sobre el electrodo.

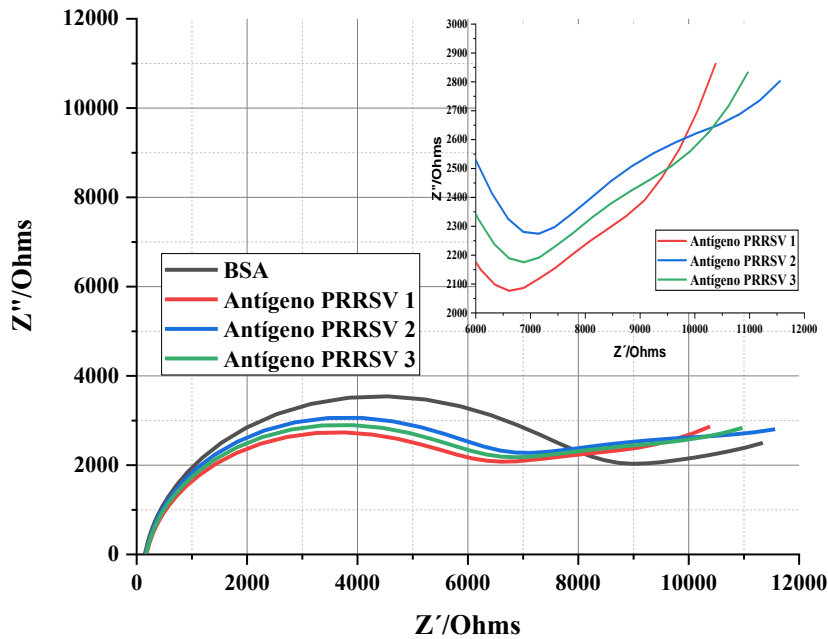


Figura 16. Análisis de EIE en diagramas de Nyquist para la inmunodetección del antígeno PRRSV. Se observa la presencia de un segundo semicírculo, describiendo un posible segundo evento capacitivo en paralelo, lo cual requiere un nuevo ajuste para el circuito de este sistema. Se midieron en sonda ferri/ferro 5 mM $n=3$. La EIE se midió en un rango de frecuencias de 100 KHz a 1 Hz, se aplicó una perturbación de potencial de 10 mV frente al OCP.

La **Fig. 17 A** muestra los valores de R_{tc} recolectados en cada tratamiento, permitiendo entender el comportamiento de los electrodos con cada modificación. La R_{tc} presentó un aumento significativamente superior durante la construcción de la SAM con N-acetil-L-cisteína, el cual disminuyó posterior al resto de tratamientos. De igual forma se observó una disminución significativa al realizar la detección del antígeno PRRSV. Siendo este un resultado inesperado, se corroboró al construir una curva de calibración con el antígeno PRRSV frente a los valores de R_{tc} obtenidos con cada concentración, observándose que, al aumentar la concentración del antígeno, la resistencia se veía disminuida. La curva de calibración (**Fig. 17 B**) se analizó mediante un análisis de regresión logarítmica, obteniendo un valor de R^2 de 0.86, expresando que hay una fuerte relación entre el aumento del antígeno PRRSV y la disminución de la resistencia a la transferencia de carga sobre la superficie del electrodo. Esto puede estar ligado a las propiedades electroquímicas de las proteínas de

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

membrana del electrodo que aumentan el área electroactiva del electrodo, permitiendo mayores procesos de oxido reducción al realizar las lecturas de EIE.

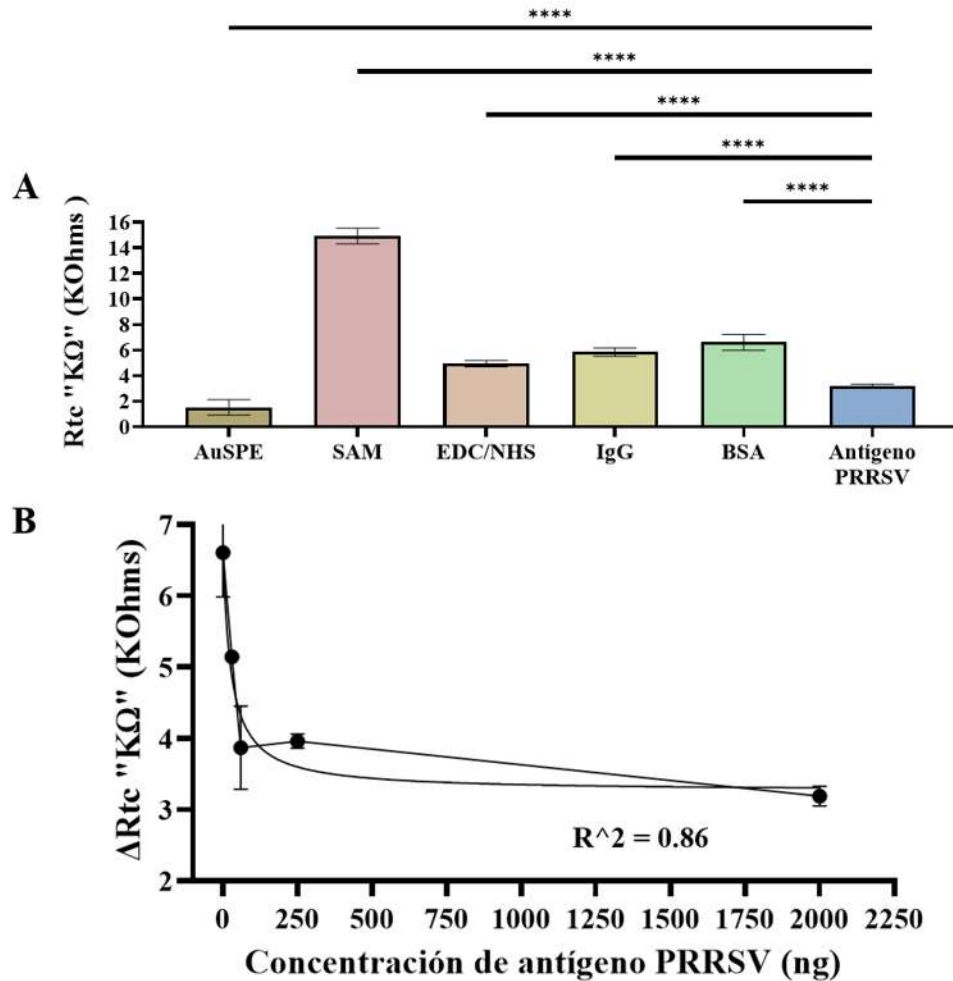


Figura 17. Análisis de R_{tc} medida en KOhms ($K\Omega$) de electrodos durante la preparación del biosensor y detección del Antígeno PRRSV. A) Gráfica de barras presentando valores de resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) de cada tratamiento durante la construcción del inmunosensor y la detección del antígeno PRRSV. Para el análisis de datos se utilizó una prueba ANOVA de una vía y una prueba post hoc de Tukey. Los datos presentan media y D.E. $n=12$. *** $p=0.0001$, **** $p<0.0001$. B) Curva de calibración de diferentes concentraciones del antígeno PRRSV frente cambio de resistencia a la transferencia de carga, se observa una relación entre el aumento de concentración del antígeno y disminución de R_{tc} . El análisis de regresión logarítmica presento una $R^2=0.86$ denotando una correlación fuerte entre el aumento de concentración de antígeno PRRSV con la disminución de resistencia a la transferencia de carga.

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

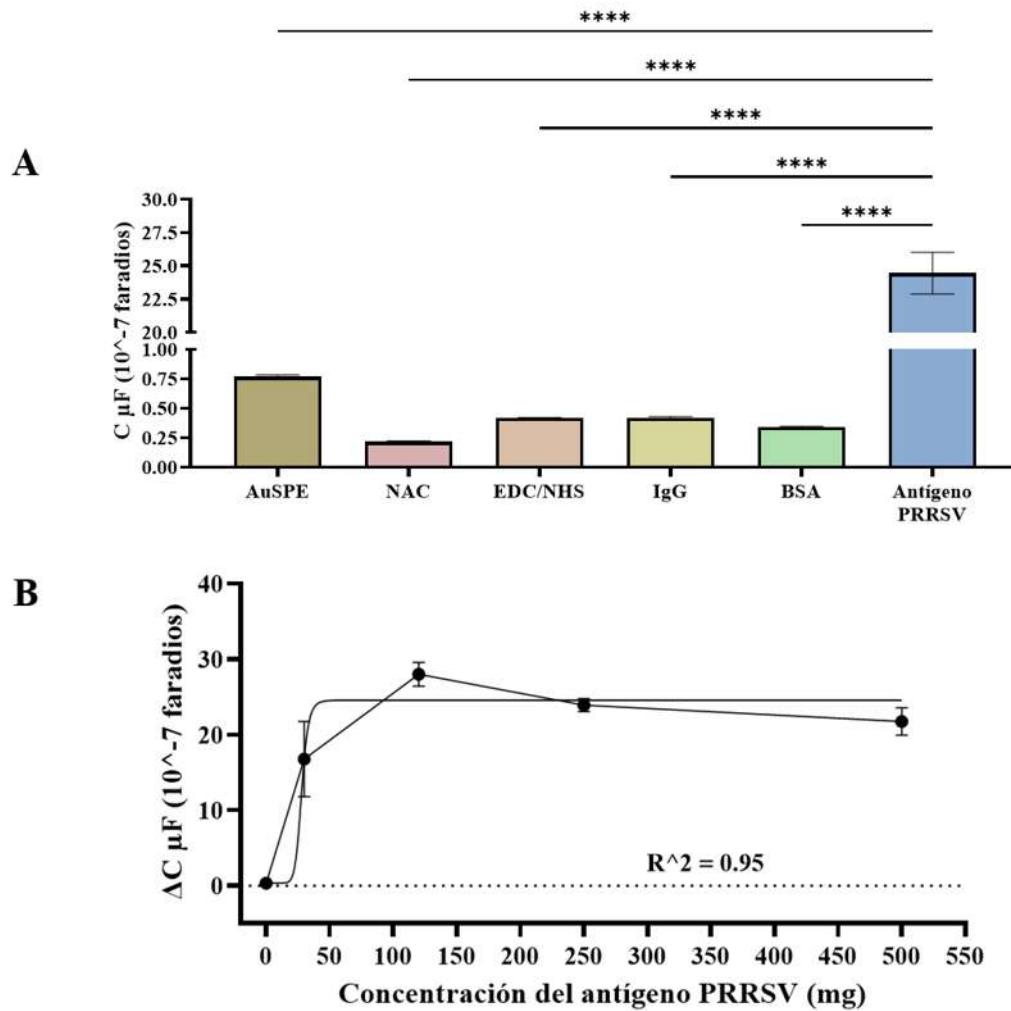


Figura 18. Análisis de capacitancia medida en faradios (10^{-7} μ F) de electrodos durante la preparación del biosensor y detección del antígeno PRRSV. A) Grafica de barras presentando valores de capacitancia (C) de cada tratamiento durante la construcción del inmunosensor y la detección del antígeno PRRSV, la capacitancia registrada de la detección del Antígeno PRRSV fue significativamente mayor que la del electrodo bloqueado. Todos los grupos presentaron diferencia significativa, frente al antígeno PRRSV y AuSPE y no presentan diferencias entre ellos. Análisis ANOVA de una vía, prueba post hoc de Tukey, los datos presentan media y D.E. $n=12$, **** $p<0.0001$. B) Curva de calibración de diferentes concentraciones del antígeno PRRSV frente cambio de capacitancia, se observa una relación entre el aumento de concentración del antígeno y capacitancia registrada. El análisis de regresión logarítmica presentó una $R^2= 0.95$ denotando una relación fuerte entre el aumento de concentración de antígeno PRRSV con el aumento de capacitancia.

El electrodo desnudo (AuSPE) presentó una media de capacitancia de 0.76μ F, la cual disminuyó de entre los 0.2 y 0.4μ F, siendo significativamente diferente este grupo del resto

de tratamientos, sin embargo, entre ellos no presentaron diferencias. La detección del antígeno PRRSV presentó un incremento significativo llegando hasta los 24 μF , creciendo la capacitancia más de 70 veces frente al BSA, el cual se podría comparar como la línea base de lectura en posteriores análisis (**Fig. 18 A**). Para corroborar este resultado, se construyó una curva de calibración a diferentes concentraciones del antígeno PRRSV, se observó que al aumentar la concentración del virus a la que se incubaba el electrodo, la capacitancia crecía. Mediante un análisis de regresión logarítmica se observó que hay una fuerte relación entre el aumento de la concentración del antígeno PRRSV con el aumento de capacitancia registrada, descrito por la obtención de una R^2 de 0.95 (**Fig. 18 B**). Siendo la relación de concentración y capacitancia mucho mayor que la de concentración Rtc.

9.4. Construcción de del circuito equivalente.

Posterior a la obtención de los datos de impedancia mediante EIE se procedió a diseñar el circuito equivalente para describir de forma más apropiada los fenómenos presentes en el WE del inmunosensor. Para el análisis de datos se empleó el software del potenciostato, PSTrace 5.10, el cual posee la función de construcción y ajuste de circuitos para el análisis de datos de EIE. La **Fig. 19** muestra los circuitos que se diseñaron para explicar los procesos de los electrodos, se diseñaron mediante la modificación de un circuito de Randles, sustituyendo los capacitores y elementos de Warburg por elementos de fase constante, esto debido a que no se presentaron procesos capacitivos ni de difusión ideales.

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

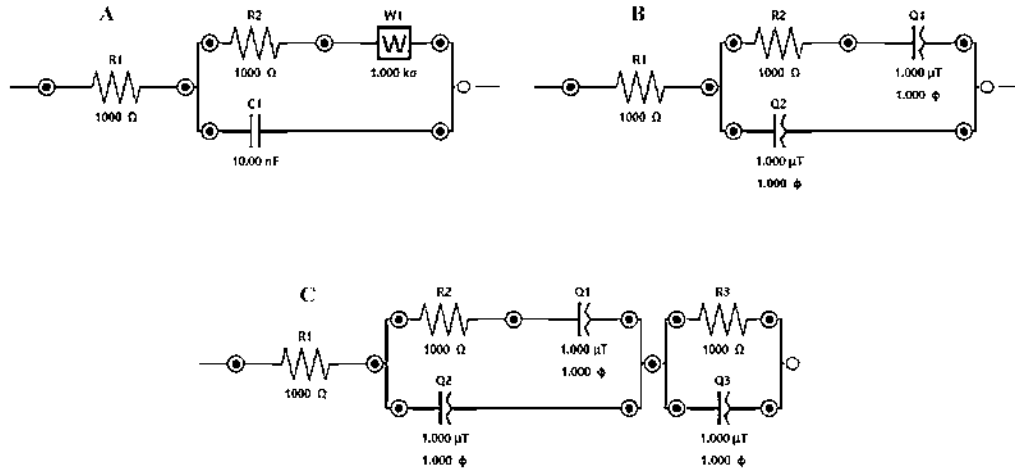


Figura 19. Diagramas de circuitos equivalentes construidos para la interpretación de EIE. A) Diagrama de Randles empleado para ajustar circuitos en los que los procesos capacitivos son ideales. B) Circuito modificado a base del Randles, el cual se sustituyeron el capacitor y el elemento de Warburg por elementos de fase constante para ajustar mejor el circuito a procesos no ideales. C) Circuito modificado a base del B agregando un elemento resistivo acoplado a un elemento capacitivo en paralelo, esto a que presentan eventos capacitivos y-resistivos adicionales, atribuidos a la interacción Ac-Ag. $R1 = R_s$, $R2 = R_{tc}$, $W1$ y $Q1 = ZW$, $C1$ y $Q2 = \text{capacitancia}$, $R3 = R_{tc}$ del VV, $Q3 = \text{capacitancia del VV}$.

En ningún electrodo se observaron procesos ideales, por lo que, para los electrodos desnudos, electrodos modificados y bloqueados, se empleó el circuito B (**Fig. 19**) para realizar el ajuste de sus datos, sustituyendo capacitores por elementos de fase constante dentro de los circuitos equivalentes. Por otro lado, el circuito que mejor se ajustó a la interacción Ag-Ac fue el circuito C (**Fig. 19**), ya que se observó la formación de un segundo semicírculo a bajas frecuencias, esto se atribuye a que el antígeno PRRSV presenta su propia capa dieléctrica, ofreciendo datos propios a su presencia.

10. DISCUSIÓN

El PRRSV representa una de las principales problemáticas a nivel mundial dentro de la industria porcina por el gran impacto económico negativo. Los factores ligados a un deficiente control zoonosanitario surgen de una ineficiente toma temprana de medidas en el aislamiento y control de la infección. Esto se debe principalmente a dos factores, su rápida propagación y la inexistencia de pruebas POC de aplicación local. Actualmente, se cuentan principalmente con dos técnicas para el diagnóstico y monitoreo de la infección, el ensayo de PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-PCR) la cual es la técnica estándar de oro, y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) el cual permite la determinación de Ac ligados a la infección. Estas técnicas presentan algunos inconvenientes dada su complejidad, altos costos y el requerimiento del transporte de muestra, afectando principalmente a pequeños productores. Por lo que se han estudiado alternativas que permitan una detección rápida, económica y simple, así como altamente sensible, específica y que sea compacta y portátil para la detección del antígeno PRRSV (Cola *et al.*, 2019).

La industria de los biosensores se ha visto favorecida por estas deficiencias en los análisis clínicos y se ha planteado como una potencial industria para el diagnóstico. En nuestro equipo de trabajo ya se reportó la construcción de un inmunosensor impedimétrico basado en electrodos serigrafados de oro que permite la detección del Ac anti GP5. Dicho inmunosensor exhibió una sensibilidad del 100% y una especificidad del 93.3%, sugiriendo ser un potencial candidato sustituto al ensayo ELISA comercial, con ventajas técnicas tales como: cuantificación inmediata y portátil (Franco, 2021). Se han descrito otros biosensores capaces de hacer la detección del antígeno PRRSV, variando en el tipo de transductor y molécula de biorreconocimiento, desde biosensores piezoeléctricos capaces de capturar con trampas de aptámeros de partículas virales (Kuitio *et al.*, 2020). Biosensores que emplean como molécula blanco el ARN viral, empleando CrisperCas12a como molécula de biorreconocimiento y mediante un fluoróforo y un led, mide unidades relativas de fluorescencia (Liu *et al.*, 2021). Sin embargo, la construcción de inmunosensores impedimétricos para la detección del antígeno PRRSV, es algo hasta el momento inédito. Por lo cual, el planteamiento principal fue determinar si el anticuerpo utilizado como elemento

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

de biorreconocimiento sería capaz de detectar el antígeno. El ensayo ELISA demostró que el anticuerpo comercial PRRSV-GP5 Polyclonal Antibody, reconoció a epítomos de la proteína GP5 del mismo virus. Los datos coinciden con resultados obtenidos por el equipo de trabajo, en los que se proponen epítomos de reconocimiento para linfocitos B, altamente conservados en cepas circundantes y en un virus de una vacuna comercial (Perez-Duran *et al.*, 2024).

Durante la construcción del inmunosensor se observaron cambios en la R_{tc} de los electrodos, siendo notorio en la construcción de la SAM. Se ha demostrado que lo anterior se debe a las propiedades de las SAM, las cuales reducen la facilidad con que la sonda interacciona con el WE dentro de los electrodos serigrafados, disminuyendo la proporción de iones Fe^{+4} que pueden ser reducidos a Fe^{+3} , (Randviir & Banks, 2022). Esta propiedad se ve afectada al momento de que se inserta el NHS éster reactivo a aminas, donde se observa una disminución de R_{tc} , siendo un evento normal dentro de la construcción de inmunosensores en las plataformas AuSPE (Asav, 2021). Como evidencia de la construcción del inmunosensor, la curva de calibración de IgG mostró un cambio dependiente de la concentración del anticuerpo incubado en los electrodos. Se presentó un incremento de R_{tc} y una disminución de capacitancia frente al incremento de concentración. Además, se observó que mientras que R_{tc} aumenta con la concentración de Ac, la capacitancia disminuía, esto se debe a que la impedancia total de un sistema es inversamente proporcional al producto de la frecuencia angular por la capacitancia, en resumen, a mayor capacitancia, y frecuencia, la impedancia disminuye, siendo esto observado en este y posteriores resultados (Bard & Faulkner, 2001; Gao *et al.*, 2022). La curva de calibración en ambos casos mostró que existe una relación entre el aumento de R_{tc} y el aumento de concentración de IgG y una relación moderada entre la capacitancia y la concentración de IgG reflejando una unión del Ac sobre el electrodo modificado.

Posterior a la construcción, se llevó a cabo la detección del antígeno PRRSV, en la que se observó una disminución de R_{tc} , efecto igualmente observado en la curva de calibración del antígeno de PRRSV, el análisis de regresión logarítmica obtuvo una R^2 de 0.86, representando una fuerte correlación entre el aumento de la concentración del antígeno PRRSV y la disminución de R_{tc} . La disminución de la resistencia en los inmunosensores ha

sido ligada a una saturación exacerbada del antígeno en los sitios de reconocimiento al mismo, esta disminución de R_{tc} se puede causar tanto por factores ligados al antígeno, como factores ligados al inmunosensor presentándose posibles consecuencias a la sobresaturación del electrodo.

Se puede presentar **(I) un aumento de la densidad de carga** y **(II) la formación de capas conductoras**, ya que, al presentarse una sobresaturación de antígeno, se incrementa la cantidad de moléculas de antígeno unidas a los sitios de reconocimiento en el inmunosensor. Esto puede aumentar la densidad de carga en la superficie del electrodo o la formación de canales iónicos como puentes, lo que facilita el movimiento de electrones, disminuyendo R_{tc} . Estos factores ligados a la estructura del antígeno se relacionan con la dinámica de interacción de biomoléculas en el electrodo. Por un lado, la concentración de sales ferri/ferro, sumado a la presencia de proteínas en la membrana viral del virus y de que la proteína GP2 pueda fungir como canal iónico. Todas ellas son variables que se deben analizar por separado para determinar de qué forma influyeron en la disminución de la resistencia en función de la sobresaturación del inmunosensor. La composición de la membrana viral es un factor igualmente analizado, influyen en la resistencia y capacitancia registradas. En particular los glicerosfolípidos presentes en la envoltura viral, relacionados con las propiedades de flexibilidad. permiten una mejor fusión de membrana durante la internalización del virión, proceso también mediado por las cargas de la membrana (Dokland, 2010; Ivanova *et al.*, 2016; Randviir & Banks, 2022)

Dentro de los factores ligados al inmunosensor se caracterizan por presentar, **(III) alteración de la distribución de las moléculas sobre la superficie del electrodo**, y/o, aunque en menor medida, **(IV) la desorción de anticuerpos**. Una alteración en la distribución molecular o la pérdida de moléculas de biorreconocimiento, desencadenaría la formación de poros o huecos en la superficie del inmunosensor, permitiendo la entrada de las sondas y disminuyendo la RTC registrada (Bard & Faulkner, 2001; Gao *et al.*, 2022)

La capacitancia aumentó significativamente cuando se adicionó el antígeno viral, esto podría deberse a que la capa dieléctrica aumentó debido al tamaño del antígeno, comparativamente

con la adición de la proteína BSA(Martín & Avendaño, 2015). Al igual que otros prototipos publicados en la literatura, se demuestra que los electrodos serigrafados de oro son una plataforma viable para la construcción de inmunosensores impedimétricos capaces de hacer cuantificaciones de antígeno viral altamente sensible y selectiva, de forma rápida y precisa (Shoute *et al.*, 2023).

11. CONCLUSIÓN

Se desarrolló un prototipo de biosensor electroquímico que cuantitativamente detectó al antígeno PRRS de manera directamente proporcional a la capacitancia e inversamente proporcional a la resistencia de la transferencia de carga.

12. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tenemos evidencia suficiente para sugerir que el biosensor electroquímico construido en este trabajo reconoció a las partículas virales de PRRS. Sin embargo, resta por analizar la sensibilidad y especificidad en la detección del antígeno PRRS por el biosensor electroquímico, así como determinar el límite de detección.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2008). Sección II. Reconocimiento del antígeno. En *Inmunología Celular y Molecular* (6ta ed., pp. 75–137).
- Asav, E. (2021). Development of a functional impedimetric immunosensor for accurate detection of thyroid-stimulating hormone. *Turkish Journal of Chemistry*, 45(3), 819–834. <https://doi.org/10.3906/kim-2012-69>
- Bertok, T., Dosekova, E., Belicky, S., Holazova, A., Lorencova, L., Mislovicova, D., Paprckova, D., Vikartovska, A., Plicka, R., Krejci, J., Ilcikova, M., Kasak, P., & Tkac, J. (2016). Mixed Zwitterion-Based Self-Assembled Monolayer Interface for Impedimetric Glycomic Analyses of Human IgG Samples in an Array Format. *Langmuir*, 32(28), 7070–7078. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01456>
- Brazaca, L. C., Imamura, A. H., Gomes, N. O., Almeida, M. B., Scheidt, D. T., Raymundo-Pereira, P. A., Oliveira, O. N., Janegitz, B. C., Machado, S. A. S., & Carrilho, E. (2022). Electrochemical immunosensors using electrodeposited gold nanostructures for detecting the S proteins from SARS-CoV and SARS-CoV-2. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(18), 5507–5517. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-03956-1>
- Brett, C. M. A. (2022a). Electrochemical Impedance Spectroscopy in the Characterisation and Application of Modified Electrodes for Electrochemical Sensors and Biosensors. *Molecules*, 27(5). <https://doi.org/10.3390/molecules27051497>
- Brett, C. M. A. (2022b). Electrochemical Impedance Spectroscopy in the Characterisation and Application of Modified Electrodes for Electrochemical Sensors and Biosensors. *Molecules*, 27(5). <https://doi.org/10.3390/molecules27051497>
- Charpin, C., Mahé, S., Keranflech, A., Belloc, C., Cariolet, R., Le Potier, M. F., & Rose, N. (2012). Infectiousness of pigs infected by the Porcine Reproductive and Respiratory

- Syndrome virus (PRRSV) is time-dependent. *Veterinary Research*, 43(1).
<https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-69>
- Cola, G. Di, Parada, J., Tamiozzo, P. J., Pelliza, R., Estanguet, A., Ambrogi, R., Milanesio, L., Bianco, O., Gutiérrez, V., Carranza, A., Suarez, L., & Brunori, J. (2019). *Memorias: IX Congreso de Producción Porcina del Mercosur. XIV Congreso Nacional de Producción Porcina. XX Jornadas de Actualización Porcina* (1er ed.). UniRio. www.unrc.edu.ar/unrc/editorial.cdc
- DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ZOOTECNIA DE CERDOS. (2022). CATÁLOGO DE SERVICIOS DE DIAGNÓSTICO. En *FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO*.
- Dokland, T. (2010). The structural biology of PRRSV. En *Virus Research* (Vol. 154, Números 1–2, pp. 86–97). <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.029>
- Franco, L. E. (2021). *DESARROLLO DE UN INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DE LA PROTEÍNA GP5 DEL VIRUS PRRS*.
- Ivanova, P. T., Myers, D. S., Milne, S. B., McClaren, J. L., Thomas, P. G., & Brown, H. A. (2016). Lipid Composition of the Viral Envelope of Three Strains of Influenza Virus - Not All Viruses Are Created Equal. *ACS Infectious Diseases*, 1(9), 435–442. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00040>
- Kapingidza, A. B., Kowal, K., & Chruszcz, M. (2020). Antigen–Antibody Complexes. En *Subcellular Biochemistry* (Vol. 94, pp. 465–497). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_19
- Kokkinos, C., Economou, A., & Prodromidis, M. I. (2016). Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. En *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 79, pp. 88–105). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.020>
- Kuitio, C., Rasri, N., Kiriwan, D., Unajak, S., & Choowongkomon, K. (2020). Development of a biosensor from aptamers for detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Science*, 21(5). <https://doi.org/10.4142/JVS.2020.21.E79>

- Kulkarni-Kale, U., Raskar-Renuse, S., Natekar-Kalantre, G., & Saxena, S. A. (2014). Antigen-Antibody Interaction Database (AgAbDb): A compendium of antigen-antibody interactions. *Methods in Molecular Biology*, *1184*, 149–164. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8_8
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, *46*(3), 258–268. <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/46/3/258/738903>
- Liu, S., Tao, D., Liao, Y., Yang, Y., Sun, S., Zhao, Y., Yang, P., Tang, Y., Chen, B., Liu, Y., Xie, S., & Tang, Z. (2021). Highly Sensitive CRISPR/Cas12a-Based Fluorescence Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *ACS Synthetic Biology*, *10*(10), 2499–2507. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00103>
- Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., & Renukaradhya, G. J. (2016). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Pathogenesis and interaction with the immune system. En *Annual Review of Animal Biosciences* (Vol. 4, pp. 129–154). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>
- Luo, Q., Zheng, Y., Zhang, H., Yang, Z., Sha, H., Kong, W., Zhao, M., & Wang, N. (2023). Research Progress on Glycoprotein 5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. En *Animals* (Vol. 13, Número 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani13050813>
- Magar, H. S., Hassan, R. Y. A., & Mulchandani, A. (2021a). Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications. En *Sensors* (Vol. 21, Número 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/s21196578>
- Magar, H. S., Hassan, R. Y. A., & Mulchandani, A. (2021b). Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications. En *Sensors* (Vol. 21, Número 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/s21196578>
- Maricruz López-Heydeck, S., Alejandro Alonso-Morales, R., Mendieta-Zerón, H., & Carlos Vázquez-Chagoyán, J. (2015). Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Review. En *PRRS. REVISIÓN Rev Mex Cienc Pecu* (Vol. 6, Número 1).

- Martín, C. R., & Avendaño, Ó. D. (2015). Técnicas de medida para la capacitancia y resistencia eléctrica de una membrana de bicapa lipídica. *I3+*, 2(1), 46–65. <https://doi.org/10.24267/23462329.73>
- Martín Conejero, A., & Martín Conejero, A. (2023). Validation of diagnostic tests (part one). Categorical tests. *Angiología*, 75(2), 101–105. <https://doi.org/10.20960/angiologia.00473>
- Ola, M., Catherine, I., Dumur, I., & Garrett, C. T. (2015). General Principles of Validating a Molecular Test. En *Molecular Oncology Testing for Solid Tumors A Pragmatic Approach* (pp. 171–180). Springer.
- Organización Mundial de la Sanidad Animal. (2023). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. En *OMSA* (Vol. 12).
- Perez Duran, F. (2020). *EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO*. UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.
- Perez-Duran, F., Calderon-Rico, F., Franco-Correa, L. E., Zamora-Aviles, A. G., Ortega-Flores, R., Durand-Herrera, D., Bravo-Patiño, A., Cortes-Vieyra, R., Hernandez-Morales, I., & Nuñez-Anita, R. E. (2024). Synthetic Peptides Elicit Humoral Response against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Swine. *Vaccines*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/vaccines12060652>
- Randviir, E. P., & Banks, C. E. (2022). A review of electrochemical impedance spectroscopy for bioanalytical sensors. En *Analytical Methods* (Vol. 14, Número 45, pp. 4602–4624). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d2ay00970f>
- Rossow, K. D. (1998). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. En *Veterinary Pathology* (Vol. 35, Número 1, pp. 1–20). American College of Veterinary Pathologists Inc. <https://doi.org/10.1177/030098589803500101>
- SENASICA. (2022). *Panorama Internacional del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino*.
- Shao, K., Zhang, C., Ye, S., Cai, K., Wu, L., Wang, B., Zou, C., Lu, Z., & Han, H. (2017). Near-infrared electrochemiluminescence biosensor for high sensitive detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus based on cyclodextrin-grafted

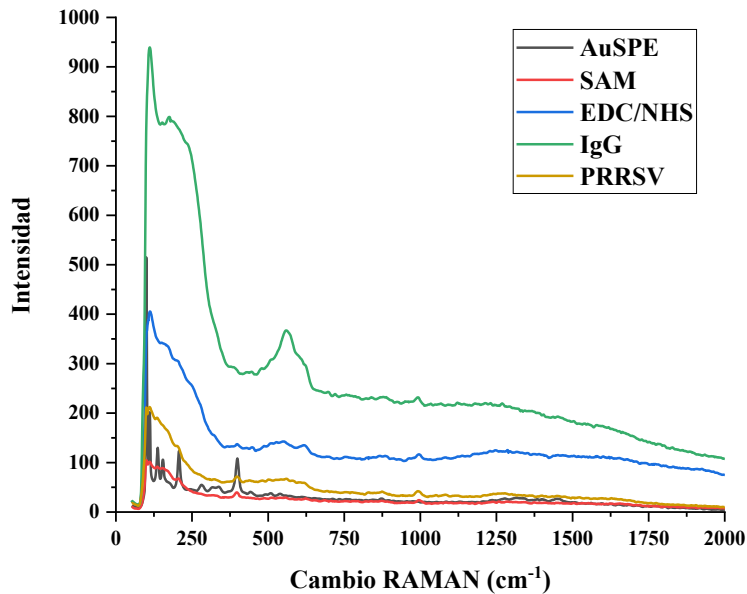
- porous Au/PtAu nanotube. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 240, 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.162>
- Shoute, L. C. T., Abdelrasoul, G. N., Ma, Y., Duarte, P. A., Edwards, C., Zhuo, R., Zeng, J., Feng, Y., Charlton, C. L., Kanji, J. N., Babiuk, S., & Chen, J. (2023). Label-free impedimetric immunosensor for point-of-care detection of COVID-19 antibodies. *Microsystems and Nanoengineering*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41378-022-00460-5>
- Singh, A., Sharma, A., Ahmed, A., Sundramoorthy, A. K., Furukawa, H., Arya, S., & Khosla, A. (2021). Recent advances in electrochemical biosensors: Applications, challenges, and future scope. En *Biosensors* (Vol. 11, Número 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bios11090336>
- Stringer, R. C., Schommer, S., Hoehn, D., & Grant, S. A. (2008). Development of an optical biosensor using gold nanoparticles and quantum dots for the detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 134(2), 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.05.018>
- Tkac, J., & Davis, J. J. (2008). An optimised electrode pre-treatment for SAM formation on polycrystalline gold. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 621(1), 117–120. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.04.010>
- Wang, K. S., Kuan, T. Y., Chen, Y. C., Chu, Y. J., Chen, J. S., Chen, C. C., & Liu, T. Y. (2024). Simultaneous detection of SARS-CoV-2 S1 protein by using flexible electrochemical and Raman enhancing biochip. *Biosensors and Bioelectronics*, 249. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116021>
- Wu, J., Liu, H., Chen, W., Ma, B., & Ju, H. (2023). Device integration of electrochemical biosensors. *Nature Reviews Bioengineering*, 1(5), 346–360. <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00032-w>
- Zamora Avilés, A. G. (2021). *ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO*. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.

14. ANEXO

ANEXO I

Se obtuvieron los espectros RAMAN y fueron ajustados en OriginPro 2018. En la siguiente **Fig. Anexo-1** se presentan los espectros correspondientes a los tratamientos correspondientes para la construcción del inmunosensor, se puede observar que cada espectro es diferente por tratamiento, compartiendo picos, principalmente entre las regiones 150 y 300 cm^{-1} donde se encuentran el pico de oro y de enlaces tiol-metal. A su vez presentan picos correspondientes a moléculas específicas en la superficie del electrodo en cada tratamiento.

Figura Anexo-1 Espectros RAMAN de cada tratamiento durante la obtención del biosensor y detección del antígeno PRRS. Cada línea corresponde a un electrodo en cada punto del inmunosensor.



La **Fig. Anexo-2** muestra 4 espectros RAMAN correspondientes a los tratamientos en la construcción de un inmunosensor permitiendo identificar el correcto acoplamiento y modificación del electrodo e incluso aportando más información al realizar un reconocimiento de las partículas virales por el inmunosensor.

Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos

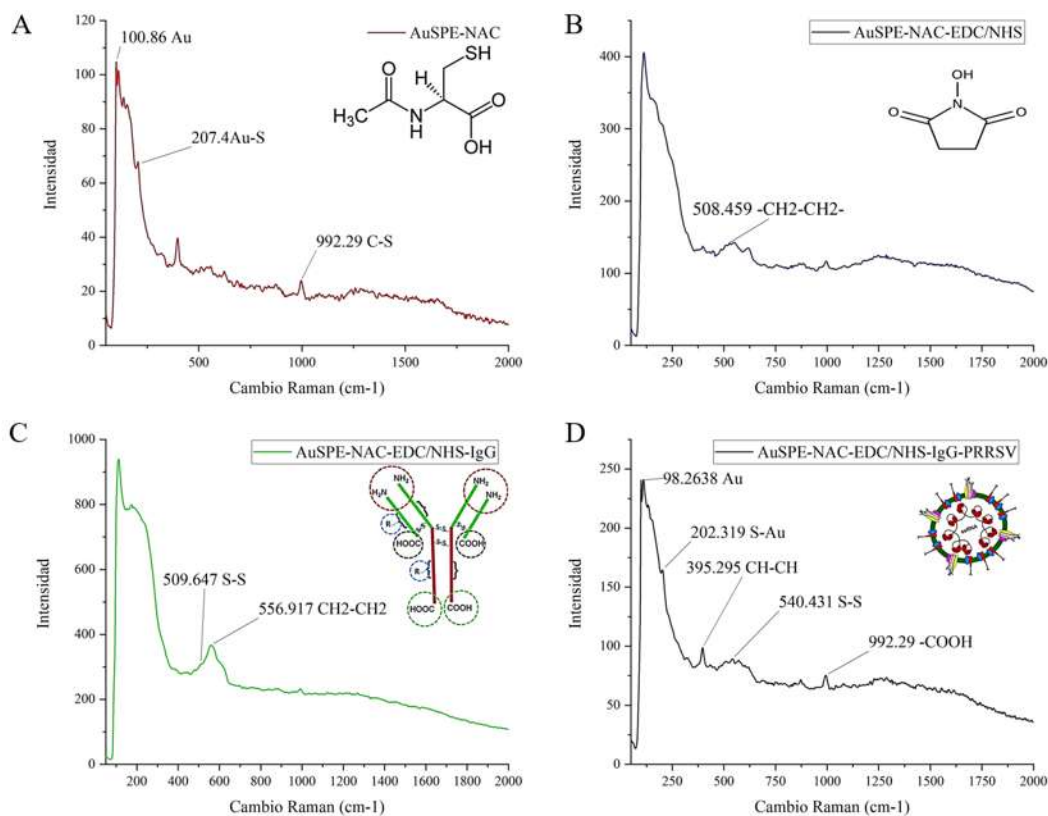



Figura Anexo-2 Espectros RAMAN de cada tratamiento realizado a un electrodo durante la construcción de un inmunosensor. A) Espectro de un AuSPE funcionalizado con N-acetil-L-cisteína en el que se pueden observar picos de refracción característicos del oro, el enlace tiol metálico y entre el carbono y el azufre. B) Espectro de un AuSPE con el grupo NHS éster reactivo a aminas, teniendo como enlace característico, un enlace CH₂-CH₂ perteneciente a una molécula cíclica. C) Espectro de un AuSPE con un Ac acoplado a su superficie, siendo más características los picos del enlace disulfuro y enlaces CH₂-CH₂ en los grupos aromáticos de los aminoácidos que componen la estructura del Ac. D) Espectro de un inmunosensor al cual se incubó con el MLV PRRSV y se pueden identificar los picos correspondientes a cadenas alifáticas (CH-CH) provenientes de las colas hidrofóbicas de la membrana viral, los puentes disulfuro presentes entre las proteínas virales GP5-M y los grupos carboxilo terminales de las regiones del hectodominio de las proteínas.

En la espectroscopía RAMAN se observaron los picos correspondientes a cada molécula esperada en la superficie del electrodo, bajo el enfoque de que el electrodo de trabajo es de oro, contamos con una superficie que permite la amplificación de la dispersión RAMAN, y es la misma superficie en la que se encuentran acopladas las moléculas que se esperan determinar (Wang *et al.*, 2024).

Nathan Enrique Carriles Vázquez

DETERMINACIÓN DEL VIRUS PRRS A TRAVÉS DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS.pdf

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:446672825

Fecha de entrega

7 abr 2025, 9:20 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

7 abr 2025, 9:21 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

DETERMINACIÓN DEL VIRUS PRRS A TRAVÉS DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS.pdf

Tamaño de archivo

2.5 MB

74 Páginas




18.389 Palabras

104.753 Caracteres

18% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

Top Sources

- 17%  Internet sources
- 10%  Publications
- 0%  Submitted works (Student Papers)

Integrity Flags

0 Integrity Flags for Review

No suspicious text manipulations found.

Our system's algorithms look deeply at a document for any inconsistencies that would set it apart from a normal submission. If we notice something strange, we flag it for you to review.

A Flag is not necessarily an indicator of a problem. However, we'd recommend you focus your attention there for further review.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	Determinación del virus PRRS a través de biosensores electroquímicos	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Nathan Enrique Carriles Vázquez	2330742g@umich.mx
Director	Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita	rosa.anita@umich.mx
Codirector	Dr. Luis Antonio Ortiz Frade	lortiz@cideteq.mx
Coordinador del programa	Dra. Martha Elena Pedraza Santos	mae.ciencias.biologicas@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	No	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	No se requirió ayuda de alguna herramienta de inteligencia artificial para realizar traducciones al español
Traducción a otra lengua	No	
Revisión y corrección de estilo	No	La revisión y corrección de estilo la realizaron los miembros de mi comité tutorial.
Análisis de datos	No	Se emplearon programas de análisis estadístico pero ninguna herramienta de inteligencia artificial para el análisis de datos
Búsqueda y organización de información	Si	Se empleo la herramienta de inteligencia artificial de copilot como herramienta de búsqueda masiva de artículos científicos relacionados con el tema de tesis.
Formateo de las referencias bibliográficas	No	Se empleo el organizador de referencias Mendeley, el cual aunque presente herramientas de inteligencia artificial, aun no es considerado estrictamente una.
Generación de contenido multimedia	No	Los generadores de contenido multimedia fueron BioRender para esquemas, Prisma 9 para graficas y OriginPro para diagramas, los cuales no son considerados herramientas de inteligencia artificial.
Otro	No	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Nathan Enrique Carriles Vázquez
Lugar y fecha	Morelia Michoacán a 16 de mayo 2025