



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA PROGRAMA
INSTITUCIONAL DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“DESARROLLO DE UN INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA
LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA SUBUNIDADES
PROTEICAS DE LA PROTEÍNA GP5 DEL VIRUS PRRS”**

TESIS QUE PRESENTA

IBT. LUIS ENRIQUE FRANCO CORREA

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

Co-director:

Dr. LUIS ANTONIO ORTÍZ FRADE

Morelia, Michoacán, México.
Abril de 2021



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 Núñez Anita, así como de la Co-Dirección del Dr. Luis Antonio Ortiz Frade a través del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas.

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. Además, agradecemos el financiamiento parcial por la CIC-UMSNH 2019-2021.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 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.

También agradecemos el apoyo a Luis Enrique Franco Correa que consistió en la Beca Nacional CONACYT 2019-2021 con No. de becario 732727 y número de CVU 948582 además de la beca de movilidad nacional 2019-1 para realizar la estancia de investigación en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S.C. (CIDETEQ).

*A mis padres; Rosa María Correa León y
Victor Manuel Franco Arriaga, por siempre tener
su apoyo y su guía a lo largo de mi vida.*

¡Siempre estaré infinitamente agradecido de tenerlos!

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Un especial agradecimiento a la Dra. Rosa Elvira Núñez Anita, quien me recibió en su laboratorio como estudiante y quien me a mostro el maravilloso mundo de la ciencia del que he quedado fascinado. Agradezco también la confianza y el buen trato que siempre he recibido de su parte, además de la constancia y el esfuerzo en compartir su conocimiento para alcanzar el mío. Sin duda una excelente persona.

Agradezco al Dr. Luis Antonio Ortiz Frade, por sus valiosos aportes a este trabajo, además de la constancia y trabajo que ha dedicado desde el comienzo de nuestra colaboración, también agradecerle la ayuda y confianza que siempre he recibido amablemente de su parte.

Agradezco también al Dr. Alejandro Bravo Patiño, por sus valiosas contribuciones y enseñanzas compartidas, así como el apoyo recibido de su parte, siempre de la mejor manera y con lo cual he mejorado mi desarrollo profesional.

También agradezco a los integrantes de mi comité sinodal el Dr. Gabriel Espinosa Pérez y el Dr. José Miguel Cervantes Alfaro, por el seguimiento constante que han dedicado y las valiosas contribuciones que han hecho a la mejora de este proyecto, así como a mi desarrollo profesional, siempre con la mejor disponibilidad.

A mis hermanas Yuliana y Janet, que siempre me han apoyado y que siempre han confiado en mí, gracias a ellas he logrado alcanzar las metas y el aprendizaje que he logrado hasta ahora. ¡Gracias!

A mis hermanos Víctor, Flavio y Mauricio, por el apoyo y la confianza que siempre he recibido de ellos, con quienes siempre puedo contar y que con su ayuda como siempre ha sido, he podido logrado alcanzar esta meta, así como muchas otras. ¡Gracias!

A mis colegas y amigos; Gabriela Zamora, Miriam Piña, Alejandra Medrano, Francisco Pérez, Fernando Calderón y Marco Romero, con quienes he compartido numerosos y largos días de trabajo y de quienes siempre recibí su apoyo y amistad.

A mis amigos Gerardo Marín, Iram Baldemar, Román Ocaña, por brindarme su amistad a lo largo de tanto tiempo y con quienes siempre disfruto el compartir experiencias he ideas enriquecedoras para mi vida.

CONTENIDO

CONTENIDO	7
1. SUMMARY	1
2. RESUMEN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Importancia de los virus reemergentes.....	3
3.2 Virus reemergentes en la industria porcina.....	3
3.3 Historia del PRRSV	5
3.4 El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS)	6
3.5 Agente etiológico.....	7
3.6 Proteína GP5 de PRRSV.....	8
3.7 Diagnóstico y monitoreo de PRRSV	10
3.8 Biosensores.....	11
3.9 Inmunosensores	13
3.10 Inmunosensores basados en péptidos.....	13
3.9 Técnicas electroquímicas	15
3.9.1 Voltametría cíclica	16
3.9.2 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica.....	18
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. HIPÓTESIS.....	21
6. OBJETIVO GENERAL	21
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
8. MODELOS Y MATERIALES	21
8.1 Ratones.....	22
8.2 Porcinos.....	22
8.3 Péptidos.....	22
8.4 Imject® Maleimide Activated BSA.....	22
8.5 Imject® Freund’s Adjuvants.....	22
8.6 Anticuerpos Cabra anti-ratón IgG F(ab)2 – HRP.....	23
8.7 Metoxipolietilenglicol 10,000-maleimida	23
8.8 Albúmina de suero bovino (BSA).....	23
8.9 Potenciostato BioLogic science instruments SP-300®.....	23

8.10	Electrodos de trabajo másicos de oro BASi®	23
8.11	Contraelectrodo de platino BASi®.....	23
8.12	Electrodo de referencia Ag/AgCl BASi®.....	23
8.13	Celda electroquímica de vidrio	24
8.14	Electrodos serigrafiados AuSPEs DropSens®.....	24
8.15	Ferrocianuro de Potasio.....	24
8.16	Ferriciaunuro de Potasio	24
8.17	Amortiguador de fosfatos.....	24
8.18	Ácido mercaptoacético.....	24
8.19	Carbodiimida (EDC).....	24
8.20	N-hidroxsuccimimida (NHS).....	24
8.21	Agua Milli-Q.....	24
9.	METODOLOGÍA	24
9.1	Ratones experimentales.....	24
9.2	Inmunización y obtención de muestras	26
9.3	Inmunoensayo enzimático.....	26
9.4	Ensayo ELISA para péptidos	28
9.5	Recolección de las muestras de lechones infectados por PRRSV y no vacunados contra PRRSV	29
9.6	Preparación de los electrodos másicos de oro.....	30
9.7	Preparación de las uniones de las subunidades proteicas de la proteína GP5 sobre la superficie de los electrodos másicos.....	31
9.8	Efecto de la adsorción de la subunidad GP5B generado por la interacción SAM-péptido sobre el electrodo de oro.....	32
9.9	Preparación de los electrodos serigrafiados de oro.....	32
9.10	Fijación química de Monocapa auto ensambladas (SAMs) para electrodo serigrafiado....	34
9.11	Activación del grupo –COOH	35
9.12	Inmovilización del péptido GP5-B.....	36
9.13	Bloqueo de uniones inespecíficas.....	37
9.14	Análisis del comportamiento generado por la interacción péptido-anticuerpo contra el péptido GP5-B	38
9.15	Determinación de los límites de detección del inmunosensor	40
	41
9.16	Análisis de datos por curvas ROC.....	41
10.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44

10.1	Seguimiento del peso corporal de los ratones	44
10.2	Evaluación de inmunoglobulinas G totales.....	45
10.3	Evaluación de inmunoglobulinas G específicas de péptido.....	46
10.4	Limpieza de los electrodos másico de oro.....	47
10.5	Formación de monocapas autoensambladas (SAMs) en electrodo másico de oro	49
10.6	Inmovilización del péptido GP5-B sobre electrodo de oro másico	53
10.7	Formación de SAM´s y conjugado del péptido GP5B sobre electrodos serigrafados (AuSPEs).....	55
10.8	Bloqueo de uniones inespecíficas.....	57
10.9	Reproducibilidad de la matriz inmunosensora	58
10.10	Interacciones no específicas	59
10.11	Selectividad del inmunosensor a suero sanguíneo de ratones control.....	61
10.12	Detección de anticuerpos anti GP5-B en muestras de ratones inmunizados	64
10.13	Respuesta lineal del inmunosensor a diferentes concentraciones de anticuerpos anti-GP5-B	66
10.14	Detección de anticuerpos específicos anti-GP5-B en muestras de lechones infectados y no infectados por PRRSV	68
10.15	Análisis de datos por curvas ROC	72
11.	CONCLUSIONES	75
12.	BIBLIOGRAFÍA	76
13.	ANEXOS	81
ANEXO I	81
ANEXO II	83
ANEXO III	84
ANEXO IV	85

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PARTÍCULA VIRAL PRRSV.	8
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA PROTEÍNA GP5 DEL PRRSV.	10
FIGURA 3. VOLTAMPEROGRAM CÍCLICO TÍPICO DE UN PROCESO REDOX REVERSIBLE DE DOS ELECTRODOS.	18
FIGURA 4. DIAGRAMA NYQUIST DE DOS ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE ORO CON SUPERFICIES DIFERENTES.	19
FIGURA 5. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA DE UN CIRCUITO Randles QUE INCLUYE UN ELEMENTO Warburg EN UN DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE BODE Y NYQUIST.	20
FIGURA 6. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE UN ENSAYO ELISA DIRECTO.	27
FIGURA 7. ESQUEMA DE ACOPLAMIENTO DEL PÉPTIDO SOBRE LA PLACA DEL KIT.	28
FIGURA 8. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE UN ENSAYO ELISA DIRECTO UTILIZANDO EL KIT DE ACOPLAMIENTO DE PÉPTIDOS PEPTIDE COATING KIT®.	29
FIGURA 9. PROCEDIMIENTO ESQUEMÁTICO PARA LA TOMAS DE MUESTRAS DE SANGRE EN LECHONES.	30
FIGURA 10. CELDA ELECTROQUÍMICA DE VIDRIO CON ARREGLO DE TRES ELECTRODOS.	31
FIGURA 11. ELECTRODO SERIGRAFIADO EN UNA CELDA DE TEFLÓN CON POCILLO CÓNICO Y CIERRE MAGNÉTICO, SOLUCIÓN FERRI/FERRO Y ADAPTADOR TIPO BANANA PARA POTENCIOSTATO.	33
FIGURA 12. ELECTRODO SERIGRAFIADO METROHOM DROPSENS MODELO 250AT.	34
FIGURA 13. ESTRUCTURA DE UNA MOLÉCULA DE ÁCIDO TIGLICÓLICO (TGA).	35
FIGURA 14. MOLÉCULAS QUE CONFORMAN LA MONOCAPA AUTO ENSAMBLADA.	35
FIGURA 15. ESQUEMA DE LAS REACCIONES QUE INVOLUCRAN EDC Y LA ACTIVACIÓN CON UN ÉSTER NHS.	36
FIGURA 16. ESQUEMA DE LAS ETAPAS PARA LA INMOVILIZACIÓN DEL PÉPTIDO GP5-B SOBRE UN ELECTRODO SERIGRAFIADO.	37
FIGURA 17. BLOQUEO DE UNIONES INESPECÍFICAS SOBRE UN INMUNOSENSOR.	38
FIGURA 18. PROCESO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS POR EL INMUNOSENSOR.	41
FIGURA 19. GRÁFICO DE CURVA ROC DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICO HIPOTÉTICO.	43
FIGURA 20. PESO CORPORAL DE RATONES REPRESENTADO EN GRAMOS.	44
FIGURA 21. CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS G TOTAL EN SUEROS DE RATONES.	46
FIGURA 22. CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS G ANTI-PÉPTIDO.	47
FIGURA 23. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA DE UN ELECTRODO DE ORO EN SOLUCIÓN DE H ₂ SO ₄ 0.5 M VELOCIDAD DE BARRIDO DE 0.05 V/s.	48
FIGURA 24. ANÁLISIS ELECTROQUÍMICO DE UN ELECTRODO DE ORO MÁSCO EN UNA SOLUCIÓN DE Fe (CN) ₆ ³⁻ /Fe (CN) ₆ ⁴⁻ 5 mM POR LAS TÉCNICAS DE VC Y EIE.	49
FIGURA 25. VOLTAMETRÍA CÍCLICA (VC) DE UN ELECTRODO MÁSCO DE ORO INMERSO EN EL PAR FERRI/FERRO 5 mM A VELOCIDAD DE BARRIDO DE 0.05 V/s.	50
FIGURA 26. VOLTAMETRÍA CÍCLICA (VC) DE UN ELECTRODO MÁSCO DE ORO DURANTE LAS ETAPAS DE LA FORMACIÓN Y MODIFICACIÓN DE LA SAM INMERSO EN EL PAR FERRI/FERRO 5 mM A VELOCIDAD DE BARRIDO DE 0.05 V/s.	51
FIGURA 27. IMPEDANCIAS DE UN ELECTRODO MÁSCO DE ORO DURANTE LAS ETAPAS DE LA FORMACIÓN Y MODIFICACIÓN DE LA SAM INMERSO EN EL PAR FERRI/FERRO 5 mM.	52
FIGURA 28. IMPEDANCIAS DE UN ELECTRODO MÁSCO DE ORO Y SU EFECTO EN EL ANCLAJE DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PÉPTIDO GP5-B EN PRESENCIA DEL PAR REDOX FERRI/FERRO 5 mM.	53
FIGURA 29. RESPUESTA DE LAS RESISTENCIAS A LA TRANSFERENCIA DE CARGA (R _{CT}) EVALUADA DE LA MODIFICACIÓN DEL ELECTRODO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PÉPTIDO GP5-B.	54
FIGURA 30. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA DE UN ELECTRODO SERIGRAFIADO (AUSPE) EN SOLUCIÓN DE H ² SO ₄ 0.5 M VELOCIDAD DE BARRIDO DE 0.05 V/s.	55
FIGURA 31. IMPEDANCIAS EN ELECTRODOS SERIGRAFIADOS (AUSPES) DURANTE LAS ETAPAS DE LA FORMACIÓN Y MODIFICACIÓN DE LA SAM Y EL CONJUGADO DEL PÉPTIDO GP5-B EN PRESENCIA DEL PAR FERRI/FERRO 5 mM.	56
FIGURA 32. IMPEDANCIAS EN ELECTRODOS SERIGRAFIADOS (AUSPES) DURANTE LAS ETAPAS DE LA FORMACIÓN DE LA SAM, EL CONJUGADO DEL PÉPTIDO GP5-B Y EL BLOQUE DE UNIONES INESPECÍFICAS POR CASEÍNA 0.03%.	57
FIGURA 33. RESPUESTA REPRODUCIBLE DEL INMUNOSENSOR (LÍNEA BASE) (N=10) EVALUADA A PARTIR DE LA RESISTENCIA A LA TRANSFERENCIA DE CARGA PROMEDIO DE CADA GRUPO.	58

FIGURA 34. DIAGRAMA NYQUIST DEL INMUNOSENSOR (LÍNEA BASE) EN RESPUESTA A LA INTERACCIÓN CON PROTEINAS INESPECÍFICAS, BSA [10 µG/ML] Y DE GOAT ANTI-IGG [10 µG/ML].....	60
FIGURA 35. RESPUESTA DEL INMUNOSENSOR (RCT) A PROTEINAS INESPECÍFICAS (N=3 POR GRUPO), BSA [10 µG/ML] Y IGG DE GOAT ANTI-IGG [10 µG/ML] RESPECTO A LA LÍNEA BASE..	61
FIGURA 36. IMPEDANCIAS DE INMUNOSENSORES EN RESPUESTA A 3 GRUPOS(N=5), SUERO SANGUÍNEO; CONTROL, BSA Y PRE-INMUNE.....	62
FIGURA 37. RESPUESTA DEL INMUNOSENSOR (RCT) DE 3 GRUPOS (N=5), SUERO SANGUÍNEO; CONTROL, BSA Y PRE-INMUNE.....	63
FIGURA 38. IMPEDANCIAS DE INMUNOSENSORES EN RESPUESTA A 2 GRUPOS EXPERIMENTALES (N=5), SUEROS SANGUÍNEOS; PEG-GP5-B Y BSA-GP5-B..	64
FIGURA 39. RESPUESTA DEL INMUNOSENSOR (RCT) DE 5 GRUPOS (N=5), SUERO SANGUÍNEO; CONTROL, BSA, PRE-INMUNE, PEG-GP5-B Y BSA-GP5-B.....	65
FIGURA 40. RESPUESTA DEL INMUNOSENSOR (RCT) DE 5 GRUPOS (N=5). SUERO SANGUÍNEO; PRE-INMUNE, CONTROL, BSA, PEG-GP5-B Y BSA-GP5-B.....	66
FIGURA 41. RESPUESTA LINEAL DEL INMUNOSENSOR A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTICUERPOS ANTI-GP5-B MEDIDOS POR VC Y EIE.....	67
FIGURA 42. RELACIÓN LINEAL DE LA RESPUESTA DEL INMUNOSENSOR A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTICUERPOS ANTI-GP5-B EVALUADOS POR VC Y EIE.....	68
FIGURA 43. DIAGRAMA NYQUIST DE LA RESPUESTA DEL INMUNOSENSOR RESPECTO A LA LÍNEA BASE PARA EL GRUPO DE LECHONES NATURALMENTE INFECTADOS POR EL VIRUS PRRS (N=5).....	69
FIGURA 44. DIAGRAMA NYQUIST DE LA RESPUESTA DEL INMUNOSENSOR RESPECTO A LA LÍNEA BASE PARA EL GRUPO DE LECHONES VACUNADOS CONTRA EL VIRUS PRRS (N=5).....	70
FIGURA 45. RESPUESTA DEL INMUNOSENSOR (RCT) DE 2 GRUPOS (N=5), SUERO SANGUÍNEO DE LECHONES NATURALMENTE INFECTADOS CON EL VIRUS PRRS Y LECHONES VACUNADOS CONTRA EL VIRUS PRRS.	71
FIGURA 46. RESPUESTA DEL INMUNOSENSOR (RCT) DE 2 GRUPOS (N=5), SUERO SANGUÍNEO DE LECHONES NATURALMENTE INFECTADOS CON EL VIRUS PRRS Y LECHONES VACUNADOS CONTRA EL VIRUS PRRS..	72
FIGURA 47. CURVA OPERATIVA DEL RECEPTOR (ROC) DONDE SE MUESTRA EL % DE SENSIBILIDAD FRENTE LA % DE ESPECIFICIDAD DERIVADO DE LOS RESULTADOS DE LA RCT PARA LOS GRUPOS CONTROL Y EXPERIMENTAL LOS CUALES REPRESENTAN EL 100% PARA CADA GRUPO..	74

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DEL PRRSV, COSTOS Y TIEMPOS DE ENTREGA DE RESULTADOS.	11
TABLA 2. INMUNOSENSORES DE UTILIDAD DIAGNÓSTICA BASADOS EN EL ANÁLISIS ELECTROQUÍMICO.....	14
TABLA 3. MUESTRAS DE SUERO OBTENIDAS EN RATÓN.	39
TABLA 4. MUESTRAS DE SANGRE DE LECHONES OBTENIDAS EN LOS MUESTREOS.....	39
TABLA 5. CATEGORÍAS DIAGNÓSTICAS OBTENIDAS A PARTIR DE UN ESTUDIO DE EXACTITUD DIAGNÓSTICA PARA LOS RESULTADOS DEL INMUNOSENSOR Y EL MÉTODO DE REFERENCIA.	43
TABLA 6. VALORES DE IMPEDANCIA EN UN CIRCUITO EQUIVALENTE DE RANDES DE 10 INMUNOSENSORES.	59
TABLA 7. TABULADO DE LOS RESULTADOS DE IMPEDANCIAS (RTC) DE LOS GRUPOS CONTROL (CONTROL, BSA, PRE- INMUNE) (N=15) Y LOS GRUPOS EXPERIMENTALES (PEG-GP5-B, BSA-GPG-B, LECHONES VACUNADOS) (N=15) PARA ANÁLISIS DE CURVA ROC.....	73
TABLA 8. TABULADO DE LOS DATOS AGRUPADOS EN RESULTADOS VERDADEROS POSITIVOS (VP) Y FALSOS NEGATIVOS (FN) CONTRA VERDADEROS NEGATIVOS (VN) Y FALSOS POSITIVOS (FP) (N=30).	74

LISTADO DE ABREVIATURAS

PRRS	Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino.
PRRSV	Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino.
ROC	Receiver Operating Characteristic Curve (Curva Característica Operativa del Receptor).
ARN	Ácido ribonucleico.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
UTR	Untranslated región (región no traducible).
ORF	Open reading frame (Marco de lectura abierto).
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).
BSA	Bovine Serum Albumin (Albúmina de suero bovino).
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
VC	Voltametría cíclica.
EIE	Espectroscopía de Impedancia Electroquímica.
SAM	Self-assembled monolayer (monocapa autoensamblada).
E	Potencial eléctrico.
ATG	Ácido tiglicólico.
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.
NHS	N-Hydroxysuccinimida.
V	Voltaje.
I	Corriente eléctrica.
mA	Miliamperios.
E_{pa}	Corriente de pico anódico.
E_{pc}	Corriente de pico catódico.
ΔE_p	Diferencia de potenciales de pico.
R_s	Solution resistance (resistencia a la solución).
R_{ct}	Charge transfer resistance (resistencia a la transferencia de carga).
C_{dl}	Double layer capacitance (capacitancia de la doble capa).
W₂	Warbug impedance (impedancia de warbug).
SPEs	Screen-printed electrodes (electrodos serigrafiados).

NVLLIVS IN VERBA
“EN LA PALABRA DE NADIE”

1. SUMMARY

The virus responsible for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) is a pathogen that has a complex interaction with the host's immune system and various mechanisms of evasion of the immune response, this favors the transmission and spread of the disease. PRRSV has a positive polarity single stranded RNA genome, encoding a total of 10 structural proteins and 16 nonstructural proteins. However, the function of the GP5 protein stands out, of which it has been suggested that it possesses the main epitopes that induce the production of neutralizing antibodies, which constitute one of the main antiviral response mechanisms.

Data from our research group have shown that epitopes of the GP5 protein can induce a strong and prolonged response mediated by antigen-specific antibodies, therefore, they could theoretically be useful for disease prevention and diagnosis. Diagnostic methods are commonly used to identify PRRSV infections, such as the ELISA test, PCR viral load, and viral isolation, among others. However, in all cases the samples must be transported from the farm to the laboratory.

During the transfer, the sample may suffer affectations that make a proper diagnosis impossible. In addition, some tests must be done in specialized laboratories, which increases the cost. In contrast, immunosensors have a very high resolving power, in which the antigen / antibody interaction can be quantitatively determined *in situ*. Furthermore, it is possible to establish a prototype of a mobile immunosensor that can be used in the field for the detection of antibodies specific to the vaccine antigen. The goal of this work was the development of a sensitive and selective electrochemical immunosensor for the quantification of anti-peptide antibodies to the GP5 protein of the PRRSV virus, using a silkscreened gold electrode functionalized by immobilization of GP5 protein subunits on the surface of the electrode. The electrochemical behavior of the electrode was analyzed by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy.

The influence of anti-peptide antibodies on the impedance and voltammetry response of the electrode was compared with pre-immune (control) and post-immune serum experimental groups with a similar dilution factor. The anti-PRRSV antibody sensor was able to recognize the antigen-antibody interaction, with a detection limit of 0.6 ng/ml, a sensitivity of 100%, and a specificity of at least 93%. Taken in account all data, the new immunosensor can be used for the diagnosis of antibodies against the PRRS virus.

2. RESUMEN

El virus responsable del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), es un patógeno que tiene una compleja interacción con el sistema inmunológico del hospedero y diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmune, esto favorece la transmisión y propagación de la enfermedad. El PRRSV posee un genoma de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva, que codifica para un total de 10 proteínas estructurales y 16 proteínas no estructurales. Sin embargo, destaca la función de la proteína GP5, de la cual, se ha sugerido que posee los principales epítomos que inducen la producción de anticuerpos de tipo neutralizante, los cuales constituyen uno de los principales mecanismos de respuesta antiviral. Datos de nuestro grupo de investigación han mostrado que epítomos de la proteína GP5 son capaces de inducir una respuesta fuerte y sostenida mediada por anticuerpos específicos de antígeno, por lo tanto, teóricamente podrían ser útiles para la prevención de la enfermedad y el diagnóstico. Comúnmente se utilizan métodos de diagnóstico para identificar infecciones por PRRSV, tales como la prueba de ELISA, carga y aislamientos virales, entre otros. Sin embargo, en todos los casos las muestras deben ser transportadas desde la granja hasta el laboratorio. Durante el traslado, la muestra puede sufrir afectaciones que imposibiliten el diagnóstico adecuado. Además, algunas pruebas deben hacerse en laboratorios especializados, lo que aumenta el costo. Por el contrario, los inmunosensores tienen un poder de resolución muy alto, en los cuales se puede determinar la interacción antígeno/anticuerpo de manera cuantitativa. Adicionalmente, es posible establecer un prototipo de inmunosensor móvil que pueda ser utilizado en campo para la detección de anticuerpos específicos del antígeno vacunal. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un inmunosensor electroquímico sensible y selectivo para la cuantificación de anticuerpos anti-péptidos de la proteína GP5 del virus PRRSV, utilizando un electrodo de oro serigrafado funcionalizado mediante la inmovilización de subunidades proteicas de GP5 sobre la superficie del electrodo. El comportamiento electroquímico del electrodo se analizó por voltametría cíclica y espectroscopia de impedancia electroquímica. La influencia de los anticuerpos anti-péptidos en la respuesta impedimétrica y voltamétrica del electrodo se comparó entre los grupos experimentales de muestras de suero pre-inmunes (control) y post inmunes con un factor de dilución similar. El sensor de anticuerpos anti-PRRSV fue capaz de reconocer la interacción antígeno-anticuerpo, con un límite de detección de 0.6 ng/ml, una sensibilidad de 100% y una especificidad de al menos 93%. Tomando en cuenta todos los datos, el nuevo inmunosensor puede ser utilizado para el diagnóstico de anticuerpos contra el virus PRRS.

Palabras clave: PRRSV, inmunosensor, subunidad proteica, GP5, electroquímica.

3. ANTECEDENTES

3.1 Importancia de los virus reemergentes

Las enfermedades de etiología viral que han sido conocidas en el pasado y que al momento de una reaparición o reintroducción logran crear un problema sanitario con carácter epidémico debido a los aumentos en su incidencia, son conocidos como virus reemergentes y representan una amenaza para la salud pública global. Muchos de los problemas sanitarios causados por virus reemergentes, se deben a que alcanzan las condiciones para que se desarrollen nuevamente, lo que involucra importantes cambios en su patogenicidad, pudiendo llegar a convertirse en una situación de emergencia para la salud pública. En la actualidad los virus reemergentes ya han sido causa de grandes problemas para la salud humana y animal, teniendo como consecuencia la muerte de personas, como fue el caso de la influenza aviar tipo A (virus H5N1) que surgió en Asia o la influenza porcina (virus H1N1) en México. Esta serie de eventos demuestran una necesidad constante de cambios y mejoras en el manejo de riesgos de bioseguridad apoyados en la generación de conocimiento y tecnologías. (Kuri-Morales *et al*, 2015).

Cuando se observó la aparición de virus que se creían controlados y además tenían la capacidad de infectar tanto animales como a humanos, se comenzaron a tomar medidas de prevención, encabezadas por los principales vectores con los que se tiene un mayor contacto. En este contexto se desencadenó una mejora en las inspecciones veterinarias, además de un mejor control de calidad en los alimentos procesados de origen animal, con el objetivo de desarrollar una alta seguridad alimentaria con puntos de control a lo largo de toda la cadena de producción centrada en la salud animal, y no solo en los productos finales como se hacía anteriormente. A pesar de estas mejoras en la producción sigue habiendo brechas en la bioseguridad donde los virus logran prevalecer por largo tiempo representando un grave problema latente (UNICEF. *Contributing to one world, one health.*, 2008).

3.2 Virus reemergentes en la industria porcina

La aparición de virus reemergentes con capacidad de cruzar fronteras, especies y controles sanitarios representan un riesgo para la salud mundial, riesgo que se ve aumentado por la globalización que ha contribuido en gran medida a facilitar la propagación exponencial de patógenos. Evidencia de esto se puede encontrar reportada en registros de enfermedades

emergentes que parecen haber tenido una transferencia local de una especie ya sea de vida silvestre o doméstica, hacia poblaciones humanas o indirectamente a través de otras poblaciones intermedias de animales domésticos y aunque estas preocupaciones han sido más frecuentemente expresadas como riesgos para la población humana, los mismos riesgos y preocupaciones existen para las poblaciones de animales de consumo humano, principalmente aves y cerdos.

La economía de la industria porcícola es una de las industrias más afectadas por virus reemergentes que, generalmente, causan enfermedades con potencial zoonótico. Es importante tener en cuenta que comúnmente el inicio de una emergencia sanitaria puede estar en función de dos factores determinantes que establecen su gravedad: el probabilístico y los cambios en el entorno. El factor probabilístico, donde el agente etiológico siempre se encuentra presente, establece que el momento para que el patógeno encuentre condiciones favorables está en función del tiempo. El factor de cambios en el entorno establece que el aumento de interacción entre especies, factores de inmunidad del huésped y poblaciones de vectores favorecen el establecimiento de una emergencia sanitaria (Jones, K. E *et al*, 2008).

Además de esto la bioseguridad en la industria porcina también ha fallado en algunas áreas donde se hacen presentes nuevas enfermedades, uno de los factores principales es la exposición a otras especies de animales por contacto directo. a través del consumo y la contaminación favorecida por el intercambio de animales entre granjas. Se debe tomar en cuenta la capacidad de transmisión de enfermedades entre cerdos, de acuerdo con la densidad poblacional, las poblaciones inmunocomprometidas, los concurrentes desafíos con patógenos y niveles de saneamiento, ya que todos estos son factores asociados con altas probabilidades de transmisión.

En el caso de los virus endémicos, los países gastan recursos en vacunas y pruebas diagnósticas para la bioseguridad, prevención y control de las enfermedades infecciosas porcinas y aun así inevitablemente muchas enfermedades porcinas emergentes siguen causando graves daños a la economía de los países productores y representando enormes riesgos a la salud. Dos de los principales agentes etiológicos en la industria porcina son: el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) y las enfermedades asociadas a circovirus porcino (PCV). Recientemente el PRRS altamente patogénico (HP-PRRS), descubierto en China en 2006, se ha extendido a Vietnam, Camboya, Laos y Tailandia. La rápida expansión de las enfermedades

porcinas es un desafío único en el diagnóstico y control de enfermedades para los productores de cerdos.

Una solución preventiva es el reforzamiento de la bioseguridad, para lo cual es necesario mejorar el monitoreo y la vigilancia como herramientas definitivas para el control efectivo y la eliminación de los virus reemergentes. Esto implica el comprender su compleja biología y ecología combinada con el desarrollo de herramientas para la detección y que a su vez estas puedan ser aplicadas en el campo como puntos de control, contribuyendo a la disminución de patógenos latentes y al bienestar animal (Na Ayudhya, S. N *et al*, 2012).

3.3 Historia del PRRSV

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) se observó por primera vez en el año de 1980, en el surgimiento de brotes de una enfermedad no caracterizada que provocaba graves pérdidas reproductivas en cerdas gestantes, además de lechones nacidos débiles, acompañados de altas tasas de mortalidad en cerdos neonatales, causadas por una neumonía grave que reduce el rendimiento del crecimiento. El primer registro de la enfermedad se realizó en Carolina del Norte, EE. UU. en 1987. Pocos años después, se observó un brote similar en Münster (Alemania). Hasta entonces se tenía el registro de 2 cepas distintas de virus: la europea y la norteamericana, aunque aún no se tenían vinculados a pesar de ser clínicamente similares en la mayoría de los aspectos. Años después, brotes con características similares aparecían en otros países. Al no tener caracterizada la enfermedad, se tenían registros con diferentes nombres, pero con las mismas características. Se le denominó enfermedad misteriosa porcina (SMD) o infertilidad porcina y síndrome respiratorio (SIRS) antes de que el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) se convirtiera en el nombre generalmente acordado. Este nombre fue finalmente adoptado en el 1er Congreso Internacional de la enfermedad en el año de 1992, EE. UU. (Music, N *et al*, 2010).

El agente causal del PRRS se aisló por primera vez en 1991 en el Instituto Veterinario Central en Lelystad (Países Bajos) utilizando macrófagos alveolares porcinos y se le llamó virus Lelystad, ahora conocido como virus PRRS I. Un año después, el virus se aisló de los brotes en América del Norte utilizando la línea celular CL-2621; esa cepa se conocía como VR-2332, ahora conocido

como virus PRRS II. En los años siguientes y después de algunos estudios, se demostró que era el mismo virus con dos genotipos distintos, ambos compartían características propias del género *Arterivirus* por lo que fue caracterizado dentro de este género.

Durante los últimos 40 años, ha habido mucha investigación sobre el virus PRRS sobre su biología y ecología lo cual ha generado un aumento en el conocimiento sobre este virus, pero a pesar de que ahora se sabe mucho sobre el virus, los detalles sobre el control de la enfermedad para todos los tipos de crianza de cerdos están lejos de ser completos. Estas son algunas de las razones por las que el PRRS es una de las enfermedades económicamente más importantes que actualmente afectan a los productores porcinos. La consolidación de la industria porcina de los últimos 25 años ha llevado a diseñar sistemas de producción completos en torno a estrategias para controlar o eliminar esta enfermedad y a pesar de que el avance ha sido significativo aún quedan problemas por resolver alrededor del virus PRRS (Hanada, K. *et al*, 2005).

3.4 El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS)

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es una enfermedad infecciosa causada por el virus del mismo nombre (PRRSV), cuyas principales características clínicas incluyen dos patologías características, la insuficiencia reproductiva en cerdas, caracterizadas principalmente por abortos y enfermedades respiratorias en cerdos de todas las edades. Este es uno de los motivos por los que la tasa de mortalidad aumenta significativamente, especialmente cuando se asocia con otras enfermedades. PRRS se ha vuelto tan relevante que es considerada de gran importancia a nivel mundial, con un impacto económico elevado, y con tendencia a aumentos registrados en los principales países productores de cerdos y en México (Cajero-Juárez *et al*, 2017).

En Europa, se llevan a cabo estudios enfocados en conocer la carga económica que genera la infección por PRRSV anualmente. La media estimada para las pérdidas anuales obtenida para Europa en el último estudio y en los casos más graves donde hubo afectaciones durante la lactancia y el engorde, fue de € 650,090, esto por mencionar un ejemplo, se sabe también que las cifras para Canadá y México podrían ser similares, cabe destacar que durante la infección por PRRSV la cerda se ve seriamente afectada en todas las fases productivas (Montaner-Tarbes, S *et al*, 2019).

Otro factor importante para tomar en cuenta es el impacto económico de esta enfermedad como consecuencia de múltiples elementos, desde la vacunación hasta tratamientos relacionados con PRRS, lo que resulta en la dificultad principal para cuantificar exactamente los daños generados y el impacto económico exacto. A pesar de esto, hoy en día, el PRRS prevalece en la mayoría de los países y existe en formas epidémicas y endémicas. PRRS es una enfermedad viral económicamente devastadora que afecta a la industria porcina en los países de mayor producción porcina en el mundo. Las pérdidas en las granjas además de la mortalidad en los casos más graves constan de una disminución en los índices de fertilidad, poca ganancia de peso, e incremento en los costos asociándose a otras enfermedades respiratorias (Nedzad *et al*, 2010).

3.5 Agente etiológico

El PRRSV es un virus de ARN monocatenario de cadena positiva con envoltura, el virión es esférico, de aproximadamente 45-80 nm de diámetro y una cápside viral con forma asimétrica. La Figura 1 muestra un esquema de la partícula madura del virus. Pertenece a la familia *Arteriviridae*, género *Porarterivirus*, clasificación que recientemente fue actualizada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus. El género *Porarterivirus* incluye dentro de su clasificación a PRRSV-1(europeo) y PRRSV-2(norteamericano) que difieren en un 30 a 45% en las secuencias de nucleótidos. PRRSV posee un genoma con un tamaño aproximado de 15 kb con regiones no traducibles (UTR's) en los extremos 5' y 3' que son elementos regulatorios del genoma además de al menos 10 marcos de lectura abiertos (ORF) los cuales codifican tanto para proteínas no estructurales, como las replicasas; como para proteínas estructurales. En el caso de las proteínas no estructurales, estas se expresan solo durante la replicación y no son parte del virión (Tarbes *et al*, 2019)

En el extremo 5' se encuentra una región corta no traducible (UTR) seguida de los denominados ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 y también en el extremo 3' se encuentra una UTR seguida de una cola de poli-A. Los UTR 5' y UTR 3' son elementos regulatorios importantes, la mayoría del genoma (60-70%) codifica proteínas asociados a la replicación (ORF1a y ORF1ab), además de que codifican diferentes poliproteínas como la ARN polimerasa, que también pertenecen a las proteínas no estructurales (nsp) que participan en actividades proteolíticas para procesar otros productos de unión mientras que los ORF 2-7

codifican glicoproteínas estructurales (N, M, GP2-GP5, E) (GP) y las proteínas no glicosiladas: 2b, la E y M de la membrana; y la N de la nucleocápside. Es de destacar que ORF5 se ha utilizado como modelo para estudios epidemiológicos moleculares debido a su enorme variabilidad genética, además de que se ha reportado una proteína estructural llamada ORF5a que se sugiere podría ser esencial para el tropismo celular, el proceso de replicación y la viabilidad del virión (Dokland. *et al*, 2010).

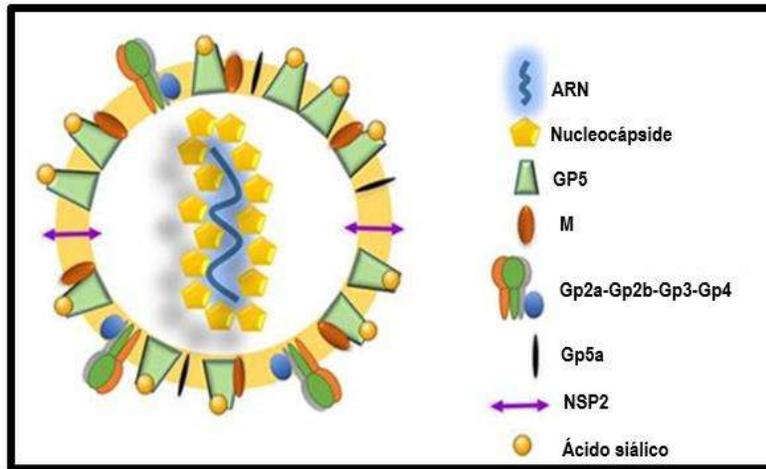


Figura 1. Partícula viral PRRSV. En color amarillo se indica la membrana lipídica del virión. Sobre la envoltura se encuentran los complejos proteicos de las proteínas estructurales. El interior de la membrana se encuentra en color blanco, además de la proteína de nucleocápside N (dorado) interactuando con el genoma de RNA de cadena sencilla (azul). Modificado de Montaner *et al*, 2019.

3.6 Proteína GP5 de PRRSV

GP5 es una proteína glicosilada de cerca de 25KDa y 200 aminoácidos, codificada en el *orf5*. Comprende, un péptido señal N-terminal que se encarga de dirigir la síntesis de proteínas al retículo endoplasmático rugoso de la célula huésped, a esta sección le sigue un ectodominio con cerca de 30 aminoácidos y varios sitios de N-glicosilación. Además, una región entre los residuos 63 y 135 hidrófoba que atraviesa la membrana 3 veces, probablemente dejando la parte C-terminal ubicada en el citosol abarcando los residuos 135 a 200. En la Figura 2 podemos observar un esquema de la topología de la proteína donde se representan el péptido señal (púrpura, ~30 aminoácidos), ectodominio (azul, ~30 residuos), un tramo transmembrana hidrófobo (~70 aminoácidos, negro) y un endodominio citosólico interno (~70 residuos, negro) representados respecto a la membrana en gris claro (Bastian *et al*, 2013).

Es considerada la proteína con mayor variabilidad de PRRSV, debido a que presenta 51-55% de identidad de secuencias entre los dos subtipos de PRRSV. Esto explica por qué las vacunas disponibles actualmente protegen contra una infección homóloga, pero no heteróloga, además de que por sus características es objetivo para realizar análisis filogenéticos. (Dokland T. *et al*, 2010).

GP5 forma heterodímeros con la proteína M conformando gran parte de la envoltura. El papel principal de M y GP5 es estructural, al ser de mayor presencia en la envoltura, confiere la curvatura en la membrana viral durante la gemación. La proteína M y GP5 están unidos por enlaces disulfuro entre Cys 9 de la proteína M y Cys 48 de la proteína GP5, la importancia de estas proteínas se demostró en estudios donde eliminaron alguno de los dos *orfs*, lo que desencadenaba una falla en el ensamble de los viriones (Wissink *et al*, 2005; Dokland T. *et al*, 2010).

Se ha demostrado que GP5 también puede estar involucrado en las interacciones iniciales con la célula huésped y quizás en la fusión con las membranas del huésped. Otro papel importante es el de poseer una región inmunodominante localizada en el ectodominio de la proteína (epítipo A), con la función de inducir una fuerte respuesta inmune mediada por anticuerpos que no son neutralizantes, los cuales pueden llegar a tener un efecto perjudicial para el huésped, debido a un mecanismo conocido como “mejora dependiente de anticuerpos” (ADE por sus siglas en inglés), en el cual, los anticuerpos específicos de PRRSV no neutralizantes pueden aumentar las tasas de infección, uniéndose al virus y dejando la fracción Fc libre. (Wissink *et al*, 2005; Bastian *et al*, 2013).

Sin embargo, también se ha sugerido que en la proteína GP5 se ubica el principal epítipo que induce la producción de anticuerpos neutralizantes (epítipo B). Lo cual sugiere la importancia de GP5 en la respuesta inmune protectora (Popescu *et al*, 2017) Figura 2.

Datos de nuestro grupo de investigación han mostrado que epítipos de la proteína GP5 son capaces de inducir una respuesta fuerte y sostenida de anticuerpos específicos de antígeno (Pérez-Durán *et al*, 2020 Datos no publicados). Por otro lado, se ha reportado en virus que pertenecen a la misma familia que PRRSV tales como el virus de la encefalitis equina y el virus del lactato deshidrogenasa, en proteínas homologas a GP5, epítipos capaces de inducir la producción de anticuerpos con actividad protectora.

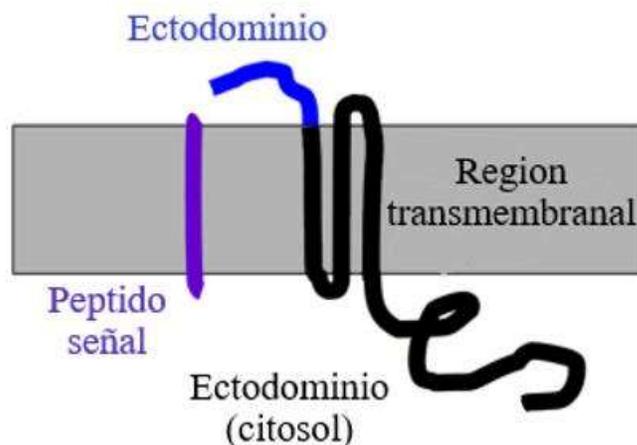


Figura 2. Representación esquemática de la proteína GP5 del PRRSV. En color morado se aprecia el péptido señal, en azul el ectodominio externo y marcado en negro, el ectodominio citosólico y el tramo transmembranal hidrófobo. (Modificado de Bastian et al, 2013).

3.7 Diagnóstico y monitoreo de PRRSV

Los sistemas de producción ganadera se han intensificado en los últimos años para satisfacer la demanda en respuesta al aumento de población humana, por lo que uno de los desafíos consecuentes es el cuidado de la salud y bienestar de los animales de granja, vulnerables a diversos agentes infecciosos que causan enfermedades como el PRRSV que son amenazas continuas que dañan significativamente la sustentabilidad de la producción de carne (Perry *et al*, 2009).

Los virus porcinos, en especial el PRRSV son la principal preocupación para la industria porcina en todo el mundo ya que causan graves problemas y pérdidas económicas por lo que los diagnósticos de campo se considera la primera defensa ante una infección. Actualmente, en un brote inicial de la enfermedad, el proceso de toma y transporte de muestra toman tiempo valioso para detener la propagación, aunado a esto la confirmación del agente infeccioso por el laboratorio puede tardar varias semanas o meses, por lo que es de vital importancia realizar un diagnóstico temprano en casos de brotes de enfermedades infecciosas y así minimizar las consecuencias económicas. Debido a estas razones ha surgido la necesidad de desarrollar nuevas formas de diagnóstico móviles y confiables, pruebas diagnósticas que sean rápidas y simples para aplicar directamente en el sitio y que sean capaz de ayudar a la rápida toma de decisiones basados en evidencia para la implementación de estrategias de control enfocadas que son necesarias para

evitar la propagación de la enfermedad. Este contexto ha llevado a aumentar la demanda y disponibilidad de sistemas de prueba móviles (Montagnese *et al*, 2019).

Tradicionalmente, la detección de virus en el laboratorio se basa en dos enfoques diferentes: detección directa del patógeno por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o aislamiento de virus basado en cultivos celulares, y/o detección de anticuerpos circulatorios en muestras de sangre (Tabla 1). Aunado a esto el diagnóstico en cerdos resulta difícil por la predisposición del cerdo infectado de forma aguda, en desarrollar infección persistente (portadores), donde el virus es difícil de detectar por escasa viremia y bajos títulos virales en tejidos, además las muestras diagnósticas son difíciles de manejar, lo que disminuye la sensibilidad de la prueba (López *et al*, 2015).

Tabla 1. Métodos diagnósticos del PRRSV, costos y tiempos de entrega de resultados. Modificado de: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Departamento de Medicina y Zootecnia.

Tipo de estudio	Estudio realizado para:	Costo por muestra	Tiempo de entrega
Aislamiento viral	(PRRS)	\$500.00	20 días
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	(PRRS)	\$110.00	3-10 días
Reacción en cadena de la polimerasa Tiempo real (PCR-RT)	(PRRS)	\$700.00	Menos de 20 muestras (5 días) Mas de 20 muestras (10 días)

3.8 Biosensores

Los biosensores son dispositivos integrados por un elemento de reconocimiento biomolecular que interactúa con un transductor que captura la respuesta en una señal medible, estos pueden ser de distintos tipos como, sensores en modo de guía de ondas (Gopinath *et al.*, 2008), sensor de ondas acústicas de superficie (SAW), sensor de resonancia de plasmón superficial, y sensor electroquímico (Thiele *et al.*, 2006; Gopinath *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2010).

El sistema de sensor electroquímico destaca principalmente por depender de la interacción de las biomoléculas inmovilizadas y el analito, que a su vez producirá una alteración que afecta las

propiedades eléctricas del sistema, como son el potencial eléctrico o corriente. Este tipo de biosensores tiene una buena sensibilidad en comparación con otros biosensores, además de que requieren de un área pequeña de superficie para su funcionamiento. Esta área se modifica cuando una muestra (analito) interactúa con el elemento de reconocimiento, por lo que requiere un pequeño volumen de muestra para la detección, aunado a esto, el costo de estos biosensores se reduce debido a su pequeño tamaño por lo que tienen un amplio potencial en su aplicación para la detección de enfermedades e infecciones causadas por patógenos.

Para llevar a cabo una detección electroquímica se requiere un sistema de tres electrodos conformado por un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y un electrodo contador. El electrodo de trabajo es especialmente importante ya que en este se combina con el elemento de reconocimiento biomolecular y el transductor fisicoquímico que es el propio electrodo, estos dos elementos conforman el elemento de transducción. El electrodo de referencia está compuesto usualmente por Ag / AgCl colocado a una distancia del sitio de reacción donde mantiene un potencial estable. El electrodo contador o electrodo auxiliar puede estar compuesto por oro, platino o carbono ya que son conductores y químicamente estables, así la corriente puede pasar al electrodo de trabajo desarrollando una conexión con la solución electrolítica. En general pueden ser creados a partir de todo tipo de metales con diferentes propiedades superficiales.

Los biosensores electroquímicos a su vez se pueden dividir de acuerdo con el tipo de señal generada por el transductor para caracterizar y cuantificar la unión de analitos. Señales como amperométricas, voltamétricas, capacitivas, impedimétricas potenciométricas o conductimétricas transforman las reacciones de interacción molecular en una señal medible. Cuando la muestra que contiene el analito de interés se une a la molécula sonda, se puede medir una señal eléctrica directa, utilizando un instrumento conocido como potencióstato. Estos son los biosensores electroquímicos que utilizan señales y son particularmente prometedores para su uso en aplicaciones de diagnóstico sin etiquetas con capacidad de ser sensibles, robustas y rápidas (Karimzadeth *et al*, 2018).

3.9 Inmunosensores

Los biosensores que utilizan anticuerpos o caracterizan y cuantifican la interacción antígeno anticuerpo se denominan inmunosenores. Los anticuerpos poseen una alta afinidad y especificidad por lo que son un elemento de detección eficaz al momento de utilizarlo en un biosensor.

Dentro de las técnicas de análisis electroquímico para inmunosenores, la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés) libre de etiquetas es particularmente poderosa. EIS es un método de análisis electroquímico, que mide la respuesta de corriente a la aplicación de un voltaje de corriente alterna (CA). A partir de los datos adquiridos, la resistencia interfacial o los términos capacitivos son cuantificables con una sensibilidad muy alta.

La alteración en la impedancia ocurre como resultado de los cambios en las características eléctricas cuando un antígeno se une a un anticuerpo. Una de las aplicaciones importantes de la espectroscopía de impedancia electroquímica es investigar las propiedades dieléctricas y la interacción de moléculas de proteínas. Estas incluyen el estudio de las interacciones proteína-proteína en la superficie del electrodo, así como como la especificidad de unión anticuerpo-antígeno. En el rango de baja frecuencia, la interacción de estas moléculas produce una nueva capa, cargada como una capacitancia que es proporcional a la capacitancia de doble capa (C_{dl}), que por lo tanto disminuye la doble capa de capacitancia y aumenta la impedancia. Es por esto por lo que los biosensores basados en EIS son una alternativa de bioensayo rápido, de bajo costo y portátil.

3.10 Inmunosensores basados en péptidos

La utilización de péptidos empleados como elementos de reconocimiento, posibilita el mejorar los procesos de ensado debido a su estabilidad en comparación con otras sondas utilizadas para biosensores. Otras características importantes para destacar son su especificidad, accesibilidad, versatilidad. Al ser cadenas cortas de aminoácidos poseen una mayor estabilidad química y conformacional que las proteínas, además de que por sus características ofrecen la oportunidad de fabricar biosensores en cantidad y mantener su estabilidad durante mucho tiempo. Por estos motivos, los biosensores basados en péptidos son de gran importancia para el desarrollo de biosensores en áreas como el diagnóstico clínico y la bioseguridad (Neethirajan *et al*, 2017).

En general los biosensores electroquímicos basados en péptidos integran como principal componente, una secuencia peptídica específica, modificado con un tiol para permitir inmovilizar el péptido generalmente sobre superficies de oro por medio de enlace sulfuro, también comúnmente se introduce un espaciador a través del grupo tiol y el péptido para conferir flexibilidad a la sonda, generalmente se utiliza 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como espaciador. Es posible desarrollar inmunosensores basados en péptidos como antígenos o utilizando anticuerpos como elementos de biorreconocimiento, aunque también pueden integrar fracciones de anticuerpos o antígenos.

Los inmunosensores se basan en la interacción específica antígeno-anticuerpo, los cuales pueden constituir una herramienta cuantitativa o cualitativa para detectar anticuerpos específicos contra un antígeno. Estos biosensores de afinidad electroquímica pueden ser aplicados en una amplia gama, no solo en el diagnóstico clínico. Entre sus aplicaciones más comunes están los estudios biomédicos, el monitoreo de calidad de los alimentos y el control ambiental. Debido a su simplicidad, capacidad de miniaturización y rápida respuesta para la obtención de datos, están llamados a ser herramientas de diagnóstico accesibles y eficaz ante la demanda de la mejora de las pruebas diagnósticas existentes (Tabla 2) (Karimzadeth *et al*, 2018).

El desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico requiere un método, idealmente con una alta sensibilidad y especificidad, que pueda ser accesible, lo que convierte a los inmunosensores, en una tecnología, que cumple cada vez más con las características necesarias para mejorar los tiempos y costos de las pruebas existentes, ya que son una herramienta analítica fiable y sencilla que pueda ser utilizada tanto por el propio usuario como por laboratorios que no están dotados de instrumentación analítica automática y compleja (Garc *et al*, 2010).

Tabla 2. Inmunosensores de utilidad diagnóstica basados en el análisis electroquímico. (Modificada de: Xu-Q; Davis, J. J. et al, 2014).

Objetivo	Enfermedad	Interfaz sensorial	Rango lineal (ng/ml)	Límite de detección (ng/ml)
Antígeno de superficie de Hepatitis B	Hepatitis	Ac / polianilina / Au NPs / oro	0.000032-0.0316	0.000001
Inmunoglobulina humana G	Infecciones bacterianas y virales	Ac / oro	10–1000	5

Virus de la influenza A	Infecciones de virus	Ac / biotinilado SAM / oro	8-128	8
Virus encefalitis japonés	Infecciones de virus	Ac / nanocables de polianilina / Platino	10-500	<10
<i>Vibrio cholerae</i>	Infección bacteriana	Ac / proteína A / nanocables	37-350	0.553
Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular	Cáncer de mama	Ac / carboxilado SAM / oro	0.01-0.07	N / A
Ac antiproteína HPV-L1 del HPV	Cáncer de cuello uterino	Peptido/EDC SAM/oro	0.010-0.020	N / A
S-OIV subtipo H1N1	Gripe Porcina	Resonancia de Plasmon Superficial (SPR)	8.25 X10 ⁴ copias mL ⁻¹	N / A
Virus de la Rabia	Rabia	Resonancia de Plasmon Superficial (SPR)	~ 70 pg mL ⁻¹ nucleoproteína	N / A
Virus del Dengue	Dengue	Ac / SAM / oro	0.33 ng mL ⁻¹ NS1 proteína	N / A

3.9 Técnicas electroquímicas

La electroquímica es una rama de la química que tiene como objetivo el estudio de la interacción entre la energía química y la energía eléctrica describiendo así, los fenómenos de interconversión entre fenómenos químicos y eléctricos además de sus efectos sobre la materia ya sea de naturaleza química o eléctrica. El aspecto eléctrico de las interacciones químicas ha contribuido en gran parte al estudio y el desarrollo de productos y tecnologías de uso cotidiano. El campo de la electroquímica como ciencias fisicoquímicas se enfoca principalmente en los cambios que causa el paso de una corriente eléctrica y la producción de energía eléctrica a través de reacciones químicas. Algunos de los fenómenos que abarca este campo son, la electroforesis y la corrosión que han sido de gran utilidad para otros campos. Además, el desarrollo de dispositivos como, sensores electroanalíticos, baterías y pilas de combustible o tecnologías como la galvanoplastia de metales y la producción a gran escala de aluminio y cloro, estos son solo algunos ejemplos de

procesos donde se aplican los principios básicos de la electroquímica y reflejos de los avances en este campo.

Las mediciones electroquímicas en diferentes sistemas pueden tener objetivos muy diferentes unos de otros debido a la amplia gama de datos que pueden obtenerse, como los datos termodinámicos sobre una reacción química, además de poder estudiar propiedades espectroscópicas. De esta forma los métodos electroquímicos pueden ser utilizados como herramientas para el estudio de diferentes sistemas, incluso la aplicación de métodos electroquímicos para el bioanálisis (Bard, A. J; Faulkner, L. R; Leddy, J; Zoski, C. G. *et al*, 1980).

Un punto importante en el uso y aplicación de técnicas electroquímicas es la comprensión de los principios fundamentales de las reacciones de los electrodos y las propiedades eléctricas de las interfaces electrodo-solución además de los métodos para estudiar procesos de electrodos y las ecuaciones matemáticas que los describen.

En general, podemos distinguir a la electroquímica en el estudio de los procesos que tienen lugar en los electrodos, y en todo fenómeno eléctrico que implique materia. La investigación electroquímica ha sido orientada en los últimos años al estudio de los procesos en los electrodos mediante un enfoque cinético, teniendo un enorme crecimiento en la generación de conocimiento en esta rama, reflejado en el número de publicaciones de las revistas especializadas en los últimos años, y aun así sigue en crecimiento el estudio de algunos aspectos fundamentales de los procesos electroquímicos (Costa, J. M *et al*, 1981).

3.9.1 Voltametría cíclica

La voltamperometría cíclica o voltametría cíclica (VC) es una técnica electroquímica en donde se registra la variación en una corriente eléctrica que corre a través de una celda electroquímica en la cual se está aplicando un voltaje que también es variable. De esta forma la corriente registrada está en función del potencial aplicado. Para lograr esto, se hace un barrido de potencial (ciclado de potencial) mientras se registra la corriente resultante.

En una celda electroquímica con arreglo de tres electrodos (electrodo de trabajo, electrodo contador y electrodo de referencia) el potencial del electrodo de trabajo se mide contra un electrodo de referencia, como puede ser un electrodo de plata cloruro de plata (E/V vs Ag/AgCl). Este,

cumple la función de mantener un potencial constante que sirve de punto de partida para el potencial aplicado. El potencial aplicado resultante genera una señal medible durante el barrido de potencial. Como resultado de esto se observa el potencial de conmutación, que es el punto donde el voltaje es suficiente para oxidar o reducir un analito. Estos ciclos se pueden repetir varias veces y la velocidad de barrido se puede variar.

Los resultados obtenidos de esta técnica típicamente se grafican en un voltamperograma cíclico donde se expresa la corriente en el electrodo de trabajo durante el barrido de potencial y donde se pueden observar los procesos de oxidación y reducción.

En la Figura 3, el voltamperograma compara las lecturas obtenidas de dos diferentes electrodos de trabajo de oro y utilizando como molécula sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. El proceso de reducción ocurre desde el potencial inicial hasta el potencial de conmutación. El potencial se escanea negativamente para provocar una reducción. La corriente resultante se llama corriente catódica. El potencial pico correspondiente se denomina potencial pico catódico (E_{pc}). El E_{pc} se alcanza cuando se ha reducido todo el sustrato en la superficie del electrodo. Una vez que se ha alcanzado el potencial de conmutación, el potencial escanea positivamente. Esto da como resultado que se produzca una corriente anódica y oxidación. El potencial pico en se denomina potencial pico anódico (E_{pa}), y se alcanza cuando todo el sustrato en la superficie del electrodo se ha oxidado. Cuando los procesos son reversibles, es decir que la transferencia de electrones es más rápida que los demás procesos, por ejemplo, la difusión, la separación de los potenciales de pico, E_{pa} y E_{pc} deben cumplir con la relación $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$. Por lo que a en condiciones en las que el voltaje supera el predicho por la ecuación de Nernst a 25°C la separación de picos debería ser aproximadamente de 60 mV por electrón intercambiado. A mayor separación de picos se tendrá un proceso cada vez más irreversible (Bard, A. J *et al.*, 1980).

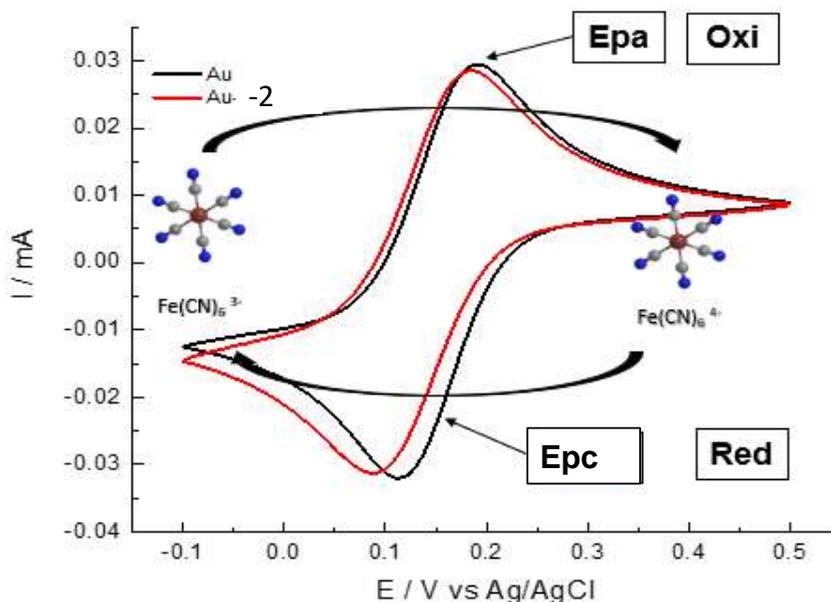


Figura 3. Voltamperogram cíclico típico de un proceso redox reversible de dos electrodos de trabajo de oro diferentes en presencia de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 5 mM. Se analizaron dos electrodos de trabajo de oro con superficies diferentes Au y Au-2 a velocidad de barrido de 50 mV/s.

3.9.2 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) o EIS, por sus siglas en inglés, es una robusta técnica electroquímica, utilizada desde los inicios de su desarrollo para caracterizar sistemas electroquímicos de interés, comúnmente la caracterización de materiales. Entre la diversidad de aplicaciones que tiene esta técnica las más comunes son, el estudio de recubrimientos de materiales, baterías y fenómenos de corrosión, por otro lado, en los últimos años, han aumentado el número de artículos publicados en donde EIE es utilizada como método de caracterización para biosensores de diversas áreas, esto por la gran cantidad de información que puede brindar. En esta técnica, consiste en aplicar una función cíclica de pequeña amplitud y una frecuencia variable a un transductor fisicoquímico, posteriormente se monitorea la corriente resultante, para de esta calcular la impedancia en cada una de las frecuencias. La amplitud de las señales de corriente y de potencial y la diferencia de fase resultante entre tensión y corriente, dependerán de la naturaleza del sistema en estudio, para con estos datos determinar la impedancia del sistema. La impedancia comprende un componente real y un componente imaginario, lo que ocasiona que su tratamiento matemático sea complejo, sin embargo uno de los diagramas que pueden expresar el resultado de las impedancias es el diagrama de Nyquist (Figura 4). La señal

impuesta puede implicar una gama de frecuencias y amplitudes, por lo que los resultados pueden interpretarse de acuerdo con dos métodos diferentes. El método más riguroso implica la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales parciales que rigen el sistema. Por otro lado, es más común interpretar los resultados, ajustando los datos en un circuito equivalente. En este caso, el circuito se compone de una combinación de condensadores y resistencias dispuestos de forma coherente con el sistema a analizar. Aunque esta metodología es ampliamente aceptada por la facilidad de uso, se debe tener mucho cuidado para asegurar que el circuito equivalente propuesto tenga sentido físico. La medición de la impedancia a distintas frecuencias puede ser útil cuando se necesita determinar varios parámetros.

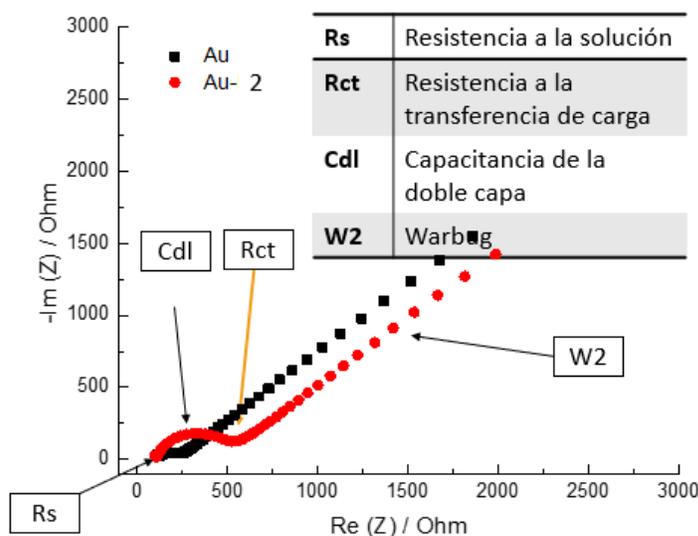


Figura 4. Diagrama Nyquist de dos electrodos serigrafados de oro con superficies diferentes Au y Au-2 en presencia de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 5 mM.

Otra forma de representar los datos obtenidos de la impedancia es el diagrama de Bode. Este diagrama es uno de los más populares para representar los datos de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE). Sin embargo, como el descrito anteriormente, otro de los diagramas más usados es Nyquist. En el caso del diagrama de Bode, este se caracteriza, a diferencia de Nyquist en que el logaritmo de la impedancia total $\lg Z$ se representara frente al logaritmo de la frecuencia $\lg f$. Dentro del mismo gráfico también se incluye de forma representativa el desplazamiento de fase ϕ frente a $\lg f$. La ventaja de usar este diagrama a diferencia de Nyquist es que la dependencia

de la frecuencia es claramente visible en el diagrama de Bode y no se pierde información. Por otro lado, el diagrama de Bode también presenta algunas desventajas como el hecho de que no es muy sensible a los cambios en el sistema medido siempre que el comportamiento fundamental del sistema no cambie, en la Figura 5 observamos la representación esquemática de un circuito equivalente de Randles y los dos diagramas de los datos obtenidos de la impedancia descritos anteriormente.

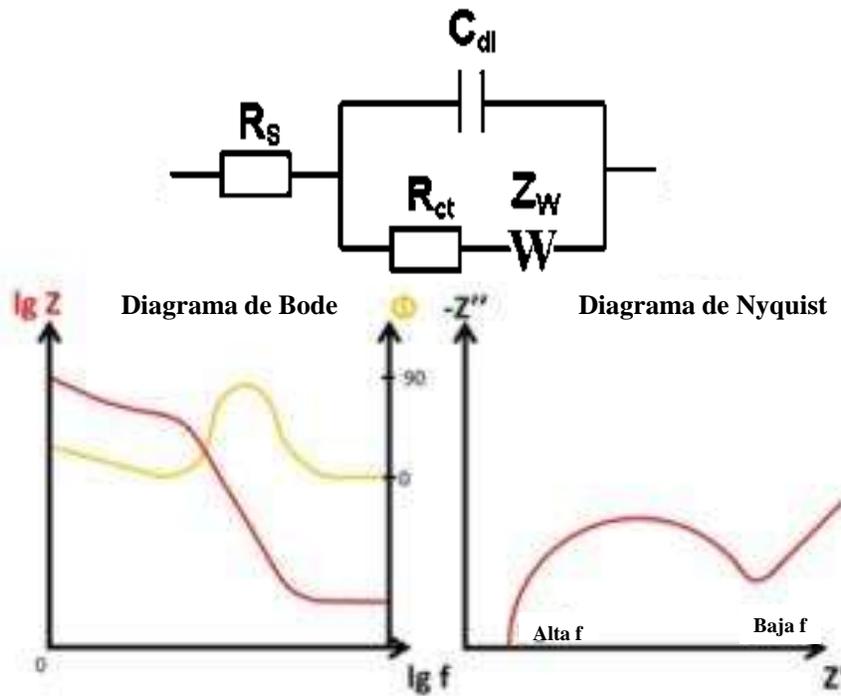


Figura 5. Espectroscopia de impedancia electroquímica de un circuito Randles que incluye un elemento Warburg en un diagrama esquemático de Bode y Nyquist.

4. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades virales porcinas son capaces de cruzar fronteras entre especies, y ya se han tenido registros de enfermedades emergentes con orígenes de transferencia local de cerdos a humanos o de otras especies a humanos. Esto último puede ocurrir indirectamente a las poblaciones humanas a través de poblaciones intermedias de animales domésticos. Una enfermedad emergente puede deberse a un patógeno porcino endémico que cambian su patogenicidad o probabilidades de transmisión. Esto puede estar en función de un factor probabilístico, por lo que existe el riesgo de una amenaza latente con la posibilidad de una

aparición en cualquier momento en función de las condiciones de los agentes infecciosos. Por lo que el desarrollo de un posible método diagnóstico capaz de contribuir a la bioseguridad puede lograr minimizar los riesgos latentes, esto a través de un inmunosensor electroquímico de bajo costo, así como el desarrollo de una metodología electroanalítica, que permita obtener una herramienta de diagnóstico con una alta sensibilidad y especificidad, capaz de identificar anticuerpos específicos contra epítomos de la proteína GP5 del virus PRRS.

5. HIPÓTESIS

El inmunosensor es capaz de cuantificar la interacción entre los anticuerpos anti-péptido y el péptido derivado de la proteína GP5 del PRRSV.

6. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un inmunosensor electroquímico cuantitativo para la detección de anticuerpos contra el péptido GP5B de la proteína GP5 del PRRSV basado en la interacción antígeno-anticuerpo.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Establecer las condiciones para la preparación de los electrodos.
- 2.-Establecer las condiciones de unión del péptido GP5B de la proteína GP5 a la superficie de los electrodos.
- 3.-Analizar el comportamiento, generado por la interacción péptido-anticuerpo contra el péptido GP5B del virus PRRSV mediante espectroscopia de impedancia electroquímica.

8. MODELOS Y MATERIALES

8.1 Ratones.

Ratones macho (Balb/c Harlan, Indianapolis, IN), de entre 6-9 semanas, con un peso de entre 22-25 g. Todos los procedimientos de manejo y cuidado siguen el programa de Cuidado y Uso de Animales (NIH, EEE.UU.) y la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO1999.

8.2 Porcinos

Se obtuvieron muestras de lechones diagnosticados con la infección por PRRSV proveniente de una granja ubicada en el Municipio de Álvaro Obregón, Michoacán. Los cuales conformaron el grupo PRRSV positivo, con una n= 5. Además, se obtuvieron sueros de lechones provenientes de una granja con certificado libre de patógenos específicos (SPF), n=5 (Libres de PRRSV, PCV2 e Influenza porcina entre otros) otorgado por la Organización Mexicana de Certificación Ganadera y Alimentaria OMECEGA. Los lechones SPF fueron vacunados contra el virus PRRSV al día 28 de nacidos.

8.3 Péptidos

El péptido GP5-B [1mg/ml] fue obtenido de GeneScript, generado a través de biología sintética. Con una pureza de 97% y solubilidad en agua y dimetilsulfóxido de acuerdo con los datos del proveedor. El péptido fue analizado anteriormente en el grupo de trabajo y se determinó la presencia de epítomos de reconocimiento para linfocitos B. El péptido GP5B, está confirmado por 29 a.a.

8.4 Imject® Maleimide Activated BSA

Imject Maleimide Activated BSA Thermo Scientific, no. Cat. 77112. Albumina de suero bovina acoplada a un grupo imida de reacción a grupos sulfhídrico (SH) que forman enlaces tiol, mediante este enlace la BSA funciona como acarreador del péptido.

8.5 Imject® Freund's Adjuvants

El adyuvante de Freud es un estimulador no específicos usados para aumentar la respuesta inmune al estar conjugados con un antígeno, estos son mezclados e inyectados con el antígeno para prevenir su catabolismo y ayudar a incrementar la respuesta inmune por la localización estable del antígeno durante un tiempo extendido.

Los adyuvantes de Freud producen una fuerte, larga y estable respuesta inmunogénica, la versión completa del adyuvante contiene células muertas de *Mycobacterium butyricum* para potenciar la

respuesta inmune, mientras que la versión incompleta no contiene dichas células. El adyuvante completo es usado solo en la inyección inicial y el incompleto en la reinmunización.

8.6 Anticuerpos Cabra anti-ratón IgG F(ab)2 – HRP

Estos anticuerpos fueron creados en cabra, los cuales reaccionan contra la IgG de ratón y están acoplados a peroxidasa de rábano picante (HRP), fue obtenido en SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. No. CAT: SC3697.

8.7 Metoxipolietilenglicol 10,000-maleimida

mPEG-Maleimida (1 mg/ml) (Metoxipolietilenglicol 10,000-maleimida (SIGMA-ALDRICH®).

8.8 Albúmina de suero bovino (BSA)

Proteína modelo formada por 583 aminoácidos. Es una proteína soluble en agua con un peso molecular de 66,4 kDa. Seis hélices α forman tres dominios homólogos de BSA. Dependiendo del pH, sufre una isomerización conformacional reversible. La estructura nativa de la proteína se vuelve reactiva y flexible al calentarla. Polvo liofilizado, BioReagent, apto para cultivo celular, (SIGMA-ALDRICH®).

8.9 Potenciostato BioLogic science instruments SP-300®

Las mediciones de Voltamperometría cíclica (CV) y Espectrometría de Impedancia Electroquímica (EIE) se realizaron utilizando este potenciostato con software EC-Lab. Los datos resultantes de la EIE se procesaron con el software z-view (Scribner Associates Inc®).

8.10 Electrodo de trabajo másicos de oro BASi®

Electrodos con disco de diámetro de 1.6 mm de oro.

8.11 Contraelectrodo de platino BASi®

Este electrodo consta de un alambre con una fina placa de platino. Se puede utilizar como contraelectrodo para la mayoría de las medidas electroquímicas. La superficie útil es aproximadamente 1 cm².

8.12 Electrodo de referencia Ag/AgCl BASi®

Electrodo de referencia de plata/cloruro de plata con $c(\text{KCl}) = 3 \text{ mol/L}$ como electrolito de referencia. Este electrodo de referencia es adecuado para aplicaciones acuosas.

8.13 Celda electroquímica de vidrio

Celda electroquímica de vidrio de 50ml, sello esmerilado para arreglo de 3 electrodos.

8.14 Electroodos serigrafiados AuSPEs DropSens®

Electrodos con disco de oro (de 4 mm) como electrodo de trabajo, un contraelectrodo de oro y un pseudoelectrodo de referencia de plata, sobre una superficie de cerámica.

8.15 Ferrocianuro de Potasio

Ferrocianuro de Potasio ($K_3Fe [CN]_6$, J. T. Baker® de pureza del 98.8%).

8.16 Ferriciaunuro de Potasio

Ferriciaunuro de Potasio pentahidratado ($K_4Fe [CN]_6 \cdot 5H_2O$, J.T Baker®, pureza del 98%).

8.17 Amortiguador de fosfatos

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

8.18 Ácido mercaptoacético

Ácido mercaptoacético (Sigma Aldrich®, 98% de pureza).

8.19 Carbodiimida (EDC)

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

8.20 N-hidroxsuccimimida (NHS)

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

8.21 Agua Milli-Q

Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada de un equipo Millipore (Milli-Q, 182.2 MΩ cm).

9. METODOLOGÍA

9.1 Ratones experimentales

Los grupos experimentales de ratones macho (Balb/C; Harlan, Indianapolis, IN) se separaron con una edad de siete semanas para formar cuatro grupos de manera aleatoria, además de un grupo como control negativo sin inmunizar. Los tres grupos para inmunizaciones fueron conformados de la siguiente manera:

Grupo I. Grupo **pre-inmune** o grupo intacto.

Grupo II. Albumina de Suero Bovino (**BSA**), que corresponde a la proteína acarreadora.

Grupo III. Experimental inmunizados con el péptido GP5-B acoplado a PEG (**PEG-GP5-B**).

Grupo IV. Experimental inmunizado con el péptido GP5-B acoplado a BSA (**BSA-GP5-B**).

Las inmunizaciones de los grupos se realizaron por vía subcutánea, al grupo II, control BSA fue administrado un volumen total de 120 µl por cada animal, la mezcla total fue constituida con un volumen de 30 µl BSA maleimida a una concentración de [1 mg/ml] (inject Maleide Activated BSA, de Thermofisher) 30 µl de DMSO (vehículo), y 60 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma-aldrich).

Para el grupo III se inyectaron por vía subcutánea un volumen de 160 µl para cada ratón. La mezcla total se integró por: 40 µl de péptido (1mg/ml), 40 µl mPEG-Maleimida (1 mg/ml) (Metoxipolietilenglicol 10,000-maleimida. SIGMA-ALDRICH) conjugado según especificaciones del fabricante y 80 µl adyuvante completo de Freund (Sigma-aldrich), sustituyendo el adyuvante completo por adyuvante incompleto de Freund en los refuerzos.

Para el grupo IV, le fue administrado un volumen de 120 µl para cada animal, la mezcla fue constituida por: 30 µl de péptido [1 mg/ml], 30 µl de maleimida [1 mg/ml] (inject Maleide Activated BSA, de Thermofisher) conjugado según especificaciones del fabricante y 60 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma-aldrich), sustituyendo el adyuvante completo por adyuvante incompleto de Freund en las inmunizaciones de refuerzo.

Todos los procedimientos de inyección se realizaron por medio de un inmovilizador y sin uso de anestesia. Los ratones se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada bajo un rango de $(22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ y con un nivel de humedad en el aire de 50%, además un ciclo de luz-oscuridad de 12 h: 12 h. La alimentación se proporcionó bajo demanda de croquetas para roedores (Purina Certified Rodent Chow) y agua, además de registros de peso corporal cada 3 días. Todos los procedimientos fueron sometidos a aprobación por el Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

9.2 Inmunización y obtención de muestras

Se tomaron muestras sanguíneas de los ratones antes de inmunizar por medio de punción de la vena lateral de la cola, la cual fue realizada con agujas de 0.80 mm de diámetro, los ratones fueron sujetos en un inmovilizador. La sangre se recolectó utilizando pipetas Pasteur humedecidas con EDTA [500 mM] pH 8.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 minutos para obtener suero control y experimental, posteriormente los sueros fueron almacenados en congelación a -20 °C.

Para el procedimiento de inmunización, los ratones fueron sujetos de la piel del dorso y la cola para realizar la inyección vía subcutánea, por cada ratón se empleó un volumen de 120 µl, de la mezcla total grupo II Y III. Consecutivamente se realizó el seguimiento de los ratones a través del tiempo, con periódicas tomas de muestra sanguínea a los 30 y 45 días.

Esquema de inmunizaciones:

Día 0. Se obtuvo suero preinmune (control) y se realizó la primera inmunización con adyuvante completo de Freund.

Día 15. Se obtuvo suero de la 1ra. Inmunización y se inmunizó con adyuvante incompleto de Freund.

Día 30. Se obtuvo suero de la 2da. Inmunización y se inmunizó con adyuvante incompleto de Freund.

Día 45. Se obtuvo suero de la 3ra. Inmunización. Se procedió al sacrificio del ratón para recuperar sangre periférica.

Los ratones se sacrificaron por decapitación y la sangre se recogió en tubos estériles con EDTA al final del experimento.

9.3 Inmunoensayo enzimático

El análisis de anticuerpos se realizó por medio de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas directo (ELISA) para la cuantificación de inmunoglobulinas G totales. Se detectaron los diferentes

niveles de inmunoglobulinas creadas en los grupos experimentales que fueron inmunizados con albúmina de suero bovino (BSA) como control a una concentración equimolar y grupos experimentales PEG-GP5-B y BSA-GP5-B, de esta forma se obtendrá una clara diferencia entre los niveles de inmunoglobulinas G en los diferentes grupos experimentales.

Se realizó la cuantificación de IgG total, el ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de alta unión (EIA/RIA Plate, 96 well) de la marca COSTAR No. Cat. 3361. Como primer paso del ensayo se realizó una curva de calibración utilizando mouse anti-humano IgG en una dilución 1:400 en las columnas 1 y 2, para las siguientes columnas de la placa se añadieron 99 μ l de buffer de carbonatos en cada pocillo utilizando una micropipeta multicanal para el llenado de estos, posteriormente se agregaron 1 μ l del suero proveniente de las muestras de sangre de los grupos experimentales, una vez llenados los pocillos se dejaron en reposo durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a realizar 3 lavados con una solución de PBS Tween 0.05% y después un bloque utilizando BSA [10 mg/ml] suspendida en PBS Tween 0.05%, una vez realizado el bloqueo se dejó en reposo durante 2 horas a temperatura ambiente y protegida de la luz. Pasadas las 2 horas nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS Tween 0.05% seguido de la adición del anticuerpo anti-ratón IgG-HRP con una dilución 1:1000 y se dejó en reposo durante 2 horas a temperatura ambiente y protegida de la luz. Transcurrido el tiempo se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS Tween 0.05% y se añadieron 100 μ l de ABTS (sustrato enzimático). Terminado el último lavado la placa fue colocada en un microlector de placas de ELISA (BIO-RAD iMARK microplate Reader) después de 15 minutos de haber añadido el ABTS se realizaron lecturas a 415 nm (Figura 6).

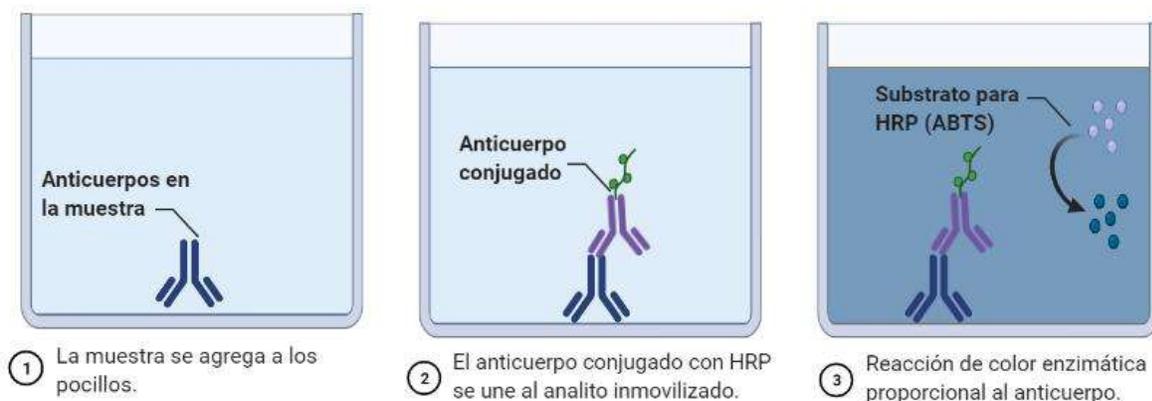


Figura 6. Esquema del procedimiento para la realización de un ensayo ELISA directo. Las figuras representan los pocillos de la placa de alta afinidad donde se llevan a cabo las reacciones necesarias para la detección. Creado con: BioRender.com.

9.4 Ensayo ELISA para péptidos

El análisis de anticuerpos específicos de péptido se realizó con ayuda de peptide Coating Kit. Es un kit que permite unir proteínas de bajo peso molecular o péptidos sintéticos que fuesen de difícil adsorción en placas comunes. Esta placa contiene un forro de carbodimida, la cual expone un grupo amino (-NH₂) libre y permite su unión con el grupo carboxilo (-COOH) libre en el péptido (Figura 7).

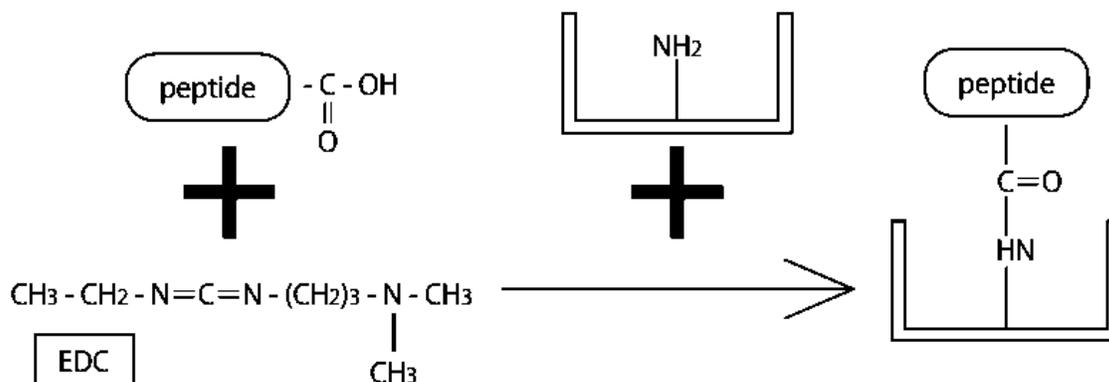


Figura 7. Esquema de acoplamiento del péptido sobre la placa del kit. La flecha indica el fondo de la placa forrada con carbodimida, el símbolo + indican la adición de los componentes de la reacción. Un grupo amino (NH₂) libre que reaccionará con el extremo carboxilo del péptido. Tomado de Takara Bio Inc. Manual peptide coating kit®.

Una vez forrada la placa con los péptidos se realizó el análisis de anticuerpos específicos de péptido siguiendo los pasos para la realización del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas directo (ELISA) descrita previamente (Figura 8). Utilizando este kit se detectaron los diferentes niveles de inmunoglobulinas específicas de péptido para los grupos experimentales inmunizados con PEG-GP5-B y BSA-GP5B, de esta forma se obtendrá una clara diferencia entre los niveles de inmunoglobulinas G específicas de péptido en los diferentes grupos experimentales.

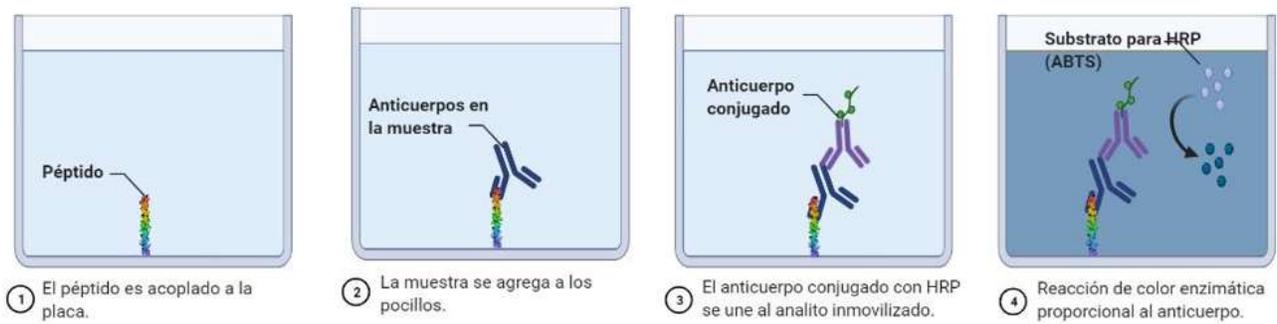


Figura 8. Esquema del procedimiento para la realización de un ensayo ELISA directo utilizando el kit de acoplamiento de péptidos peptide coating kit®. Las figuras representan los pocillos de la placa donde se llevan a cabo las reacciones necesarias para la detección. Creado con: BioRender.com.

9.5 Recolección de las muestras de lechones infectados por PRRSV y no vacunados contra PRRSV

Se realizó la toma de muestra de sangre periférica en lechones provenientes de dos granjas porcícolas diferentes, lechones infectados por PRSV y lechones vacunados contra PRRSV. Las muestras de los lechones libres de PRRSV se tomaron de la granja control ubicada en Dolores Hidalgo, debido a que es una granja con certificación OMECEGA, libre de PRRSV y PCV2 (Figura 9 A). Para lograr esto, se llevan a cabo monitoreos periódicos para detectar presencia de patógenos que incluye los virus del complejo respiratorio porcino por PCR. De esta granja se tomaron 5 muestras de animales de 60 a 70 días post natal. Debido a que los animales ya habían sido vacunados contra PRRS utilizando una vacuna comercial de virus completo, este grupo experimental permitió la identificación de anticuerpos vacunales.

La segunda colecta se realizó de la granja de lechones infectados por PRRSV, ubicada el Álvaro Obregón. Donde se tomaron 5 muestras de animales de 60 a 70 días post natal, posteriormente las muestras se mandaron a analizar en un laboratorio tercero autorizado. El manejo de los animales para la colecta de sangre se realizó conforme a lo establecido en las normas oficiales mexicanas vigentes: NOM-062-ZOO-1999 y NOM-056-ZOO-1995. De la granja infectada por PRRSV se tomaron muestras de sangre periférica para evaluar la presencia de anticuerpos contra PRRSV (Figura 9 B).

A



B



Figura 9. Procedimiento esquemático para las tomas de muestras de sangre en lechones. *A*, toma de muestra de los lechones de la granja libre de PRRSV. *B*, toma de muestra de los lechones infectados con PRRSV.

9.6 Preparación de los electrodos másicos de oro

Los electrodos estándar se utilizaron para llevar a cabo los estudios del sistema electroquímico en una primera instancia, ya que tienen la capacidad de ser reutilizados después de una adecuada limpieza. Para la preparación de los electrodos estándar, se comenzó por realizar un lavado con abundante agua desionizada para después pulirse con una suspensión de alúmina 3 micras sobre un paño para pulir, una vez concluido el pulido se colocó en un baño ultrasónico por 5 minutos, al terminar se lavó nuevamente con abundante agua desionizada y posteriormente se procedió a sumergir los electrodos en una celda electroquímica con 5 ml de una solución de H_2SO_4 0.5 M utilizando un arreglo de 3 electrodos donde el contra electrodo fue alambre de platino y el electrodo de referencia fue (Ag/AgCl). Los tres electrodos fueron mantenidos sumergidos en la solución dentro de una celda electroquímica.

Posteriormente el electrodo fue sometido a una limpieza electroquímica dentro de la celda en presencia de la solución H_2SO_4 0.5 M programando en un potenciostato una Voltametría cíclica de 50 ciclos y un barrido de potencial de 0.00 a 1.25 V vs Ag/AgCl vs 50 mv/s, o hasta obtener un voltamperograma con un perfil que sea acorde al oro en un medio ácido de absorción/desorción de óxidos de oro policristalino.

9.7 Preparación de las uniones de las subunidades proteicas de la proteína GP5 sobre la superficie de los electrodos másicos

Todas las pruebas electroquímicas se realizaron con las siguientes condiciones. Una vez que se concluyó con la preparación de los electrodos másicos de oro, estos son sumergidos en una celda electroquímica junto con el electrodo contador (alambre de platino) y el electrodo de referencia (Ag/AgCl) y fueron conectados al potenciostato (Figura 10). Los Voltamperogramas cíclicos se obtuvieron ajusto una ventana de potencia que iba desde -0.2 hasta 0.6 V con una velocidad de barrido de 50 mV/s a temperatura ambiente. Por otro lado, los experimentos de Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) se realizaron con perturbación de amplitud de 0.1 V a través de una gama de frecuencias de 1 Hz a 100 KHz. El potencial siempre se estableció mediante el par Redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Todas las mediciones se realizaron utilizando el par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ [5mM] en buffer PBS pH 7.2. Posteriormente los datos obtenidos fueron analizados en el software EC-Lab (Data Analysis and Processes).



Figura 10. Celda electroquímica de vidrio con arreglo de tres electrodos inmersos en la solución de la molécula sonda. En la parte superior de la celda se encuentra el tapón de teflón con entradas para los electrodos mismos que se encuentran conectados al potenciostato a través de caimanes eléctricos (rojo-Tra, azul-Aux, blanco-Ref).

Para llevar a cabo la inmovilización de la subunidad GP5B sobre la superficie de oro del electrodo másico se utilizaron reactivos de entrecruzamiento para la formación de una monocapa autoensamblada (SAM, por sus siglas en inglés) que reacciona con aminas primarias (-NH₂) para formar reticulaciones de amida con el péptido GP5B. La primera modificación que se realizó sobre

el electrodo estándar de oro se logró al exponer los electrodos pretratados en una solución de ácido mercaptoacético o ácido tiglicólico (TGA) 50mM en etanol. El electrodo fue sumergido en la solución y mantenido a temperatura ambiente durante 2h. Posteriormente fueron lavados con etanol para retirar el exceso de TGA.

Para la activación de los grupos-COOH se debe poner los electrodos pretratados en contacto con una mezcla de N-hidroxisuccinimida (NHS) 0.4 M y de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 0.1 M en etanol durante una hora para formar la monocapa, al terminar el tiempo de reacción fueron lavados nuevamente con etanol y posteriormente se realizó un nuevo lavado con PBS y fueron almacenados en solución PBS pH 7.2 a 4°C hasta su utilización, la cual no debe sobre pasar de 4 a 5 horas.

9.8 Efecto de la adsorción de la subunidad GP5B generado por la interacción SAM-péptido sobre el electrodo de oro

Se realizó la inmovilización del péptido GP5B sobre el electrodo modificado con la SAM, se llevó a cabo un lavado con buffer PBS pH 7.2, posteriormente se retiró el exceso de la solución para adicionar el péptido GP5B. En tubos eppendorf fueron preparadas 5 diferentes concentraciones del péptido GP5B en buffer PBS pH 7.2 (50, 125, 250, 375, y 500) [$\mu\text{g/ml}$] en un volumen de 20 μl cada una. Se adicionaron cada una de las concentraciones de péptido sobre el electrodo de oro y se dejó reaccionar durante una hora, posteriormente se lavó con buffer PBS y se sumergió en la celda electroquímica junto con el electrodo de referencia y el contra electrodo, después procedió a realizar las mediciones.

9.9 Preparación de los electrodos serigrafiados de oro

Todas las pruebas electroquímicas se realizaron con las siguientes condiciones. Una vez que los electrodos serigrafiados de oro (AuSPEs) y sus modificaciones están listos para medirse, estos fueron colocados en la ranura porta electrodos de la celda con pocillo cónico, después de cerrar la celda el pocillo cónico, fue llenada con la solución de la molécula sonda. El conector saliente del AuSPEs fue conectado al cable adaptador para su conexión al potencióstato (Figura 11). Los Voltamperogramas cíclicos se obtuvieron ajusto una ventana de potencia que iba desde -0.2 hasta

0.6 V con una velocidad de barrido de 50 mV/s a temperatura ambiente. Por otro lado, los experimentos de Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) se realizaron con perturbación de amplitud de 0.1 V a través de una gama de frecuencias de 1 Hz a 100 KHz. El potencial siempre se estableció mediante el par Redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Todas las mediciones se realizaron utilizando el par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ [5mM] en buffer PBS pH 7.2. Posteriormente los datos obtenidos fueron analizados en el software EC-Lab (Data Analysis and Processes) y z-view (Scribner Associates inc. Southern Pines, Carolina del Norte).

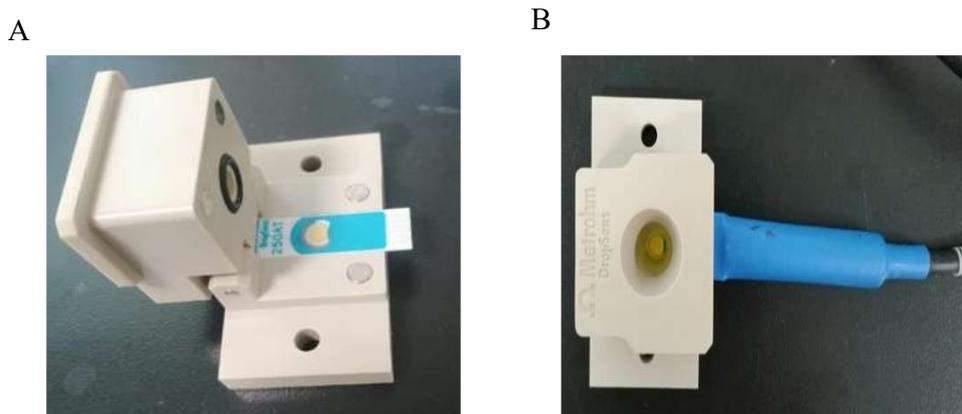


Figura 11. Electrodo serigrafiado en una celda de teflón con pocillo cónico y cierre magnético, solución ferri/ferro y adaptador tipo banana para potenciostato. *A*, electrodo serigrafiado de oro sobre la celda de teflón abierta. *B*, celda para electrodos cerrada con solución ferri/ferro conectado a un adaptador tipo banana para la conexión al potenciostato.

Para la utilización de los electrodos serigrafiados (AuSPEs, por sus siglas en inglés) (Figura 8), es necesario obtener el perfil del electrodo de oro. Esto se realizó colocando 1 ml de H_2SO_4 0.5 M en la celda de medición para electrodos serigrafiados (Figura 12). Para llevar a cabo la obtención del perfil electroquímico se programaron 30 ciclos y un barrido de potencial de 0.00 a 1.25 V/Ag/AgCl vs 50 mV/s, hasta obtener un perfil reproducible. posterior a esto, se procedió a enjuagar con abundante agua desionizada.

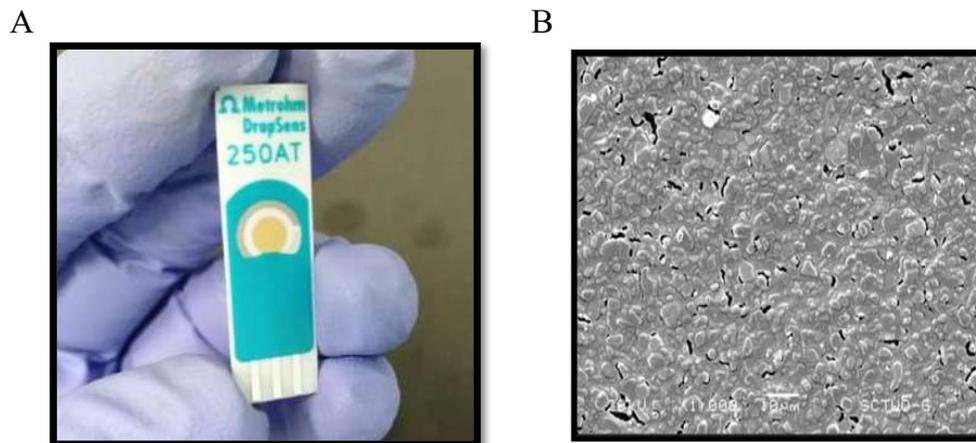


Figura 12. Electrodo serigrafiado Metrohm DropSens modelo 250AT. *A*, electrodo de trabajo de Oro (Aux.: Pt; Ref.: Ag) con conectores específicos que actúan como una interfaz entre el electrodo impreso y cualquier potenciostato. *B*, Imagen obtenida por microscopio electrónico de barrido (SEM) del electrodo de trabajo constituido de pastas de oro de curado a alta temperatura (AT). Tomado de Metrohm DropSense® guide.

9.10 Fijación química de Monocapa auto ensambladas (SAMs) para electrodo serigrafiado

Todos los pasos para la formación de la SAM sobre los AuSPEs fueron monitoreados por Espectroscopia de Impedancia Electroquímica y de la Voltámtria Cíclica y se realizaron con las siguientes condiciones. Para el análisis electroquímico se comenzó con una voltamperometría cíclica (VC) desde con un rango de potencial de -0.2 hasta 0.6 V y una velocidad de barrido de 50 mV/s, a temperatura ambiente. Posteriormente los experimentos de Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) se realizaron con perturbación de amplitud de 0.1 V a través de una gama de frecuencias de 1 Hz a 100 KHz. El potencial siempre se estableció mediante el par Redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Todas las mediciones se realizaron utilizando el par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ [5mM] en buffer PBS pH 7.2. Posteriormente los datos obtenidos fueron analizados en el software EC-Lab (Data Analysis and Processes) y z-view (Scribner Associates inc. Southern Pines, Carolina del Norte).

Los electrodos fueron lavados con etanol y agua destilada, después se llevó a cabo la formación de la monocapa auto ensamblada. La primera modificación del electrodo se realizó añadiendo 10 μ l de una solución de ácido tioglicólico (TGA) 50mM en etanol (Figura 13) sobre el electrodo de trabajo y a temperatura ambiente hasta su secado, una vez terminado el proceso fueron añadidos

nuevamente 10 μ l de la solución hasta un secado con una duración de aproximadamente 15 min en total para ambas adiciones. Posteriormente se lavaron con agua destilada.

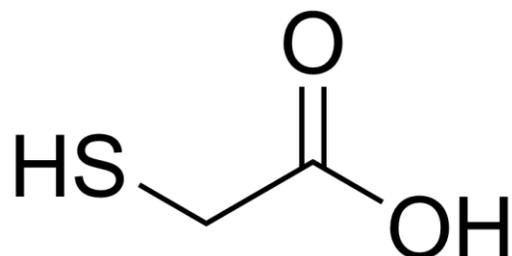


Figura 13. Estructura de una molécula de ácido tiglicólico (TGA).

9.11 Activación del grupo -COOH

Para el segundo paso y la activación de los grupos -COOH se añadieron 10 μ l de una mezcla de N-hidroxisuccinimida (NHS) 0.4 M y de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 0.1 M en etanol en una relación 1:1(Figura 14), una vez añadidos los 10 μ l sobre el electrodo de trabajo se dejó reaccionar durante 30min para formar la monocapa autoensamblada, posteriormente se realizó un lavado con etanol y se almaceno hasta su utilización en buffer de fosfatos pH 7.2, sin exceder las 5 horas.

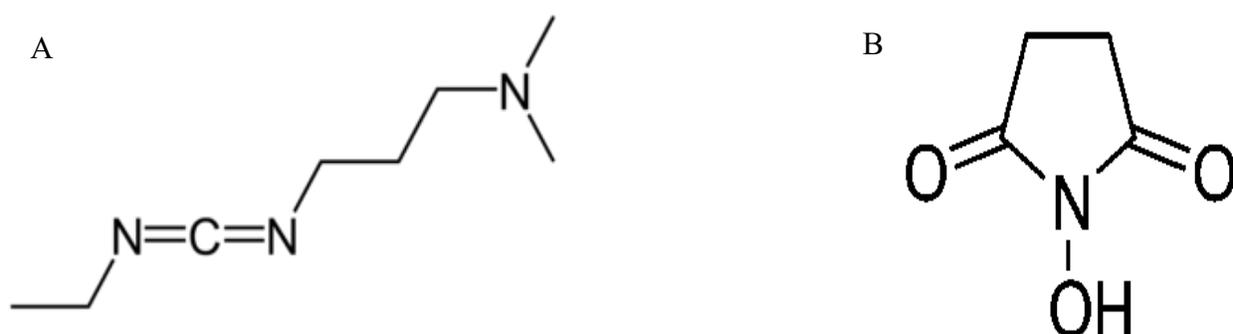


Figura 14. Moléculas que conforman la monocapa auto ensamblada. A, Estructura de una molécula de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). B, Estructura de una molécula de N-hidroxisuccinimida (NHS).

NHS se utilizó para preparar ésteres de grupos carboxilato reactivos con amina para la inmovilización de péptidos. Los carboxilatos (-COOH) se hicieron reaccionar con NHS en presencia de carbodiimida EDC, dando como resultado un NHS, que luego puede reaccionar con aminas primarias (-NH₂) para formar reticulaciones de amida. Aunque no se requiere NHS para las reacciones de carbodiimida, su uso mejora en gran medida la eficiencia del acoplamiento. NHS y EDC son solubles en disolventes acuosos y orgánicos. Sin embargo, la activación con NHS disminuye la solubilidad en agua de la molécula de carboxilato modificada, por lo que se disolvieron en etanol, los ésteres NHS tienen una vida media de 4-5 horas a pH 7,1 por lo que la inmovilización de los péptidos se realizó en este tiempo (figura 15).

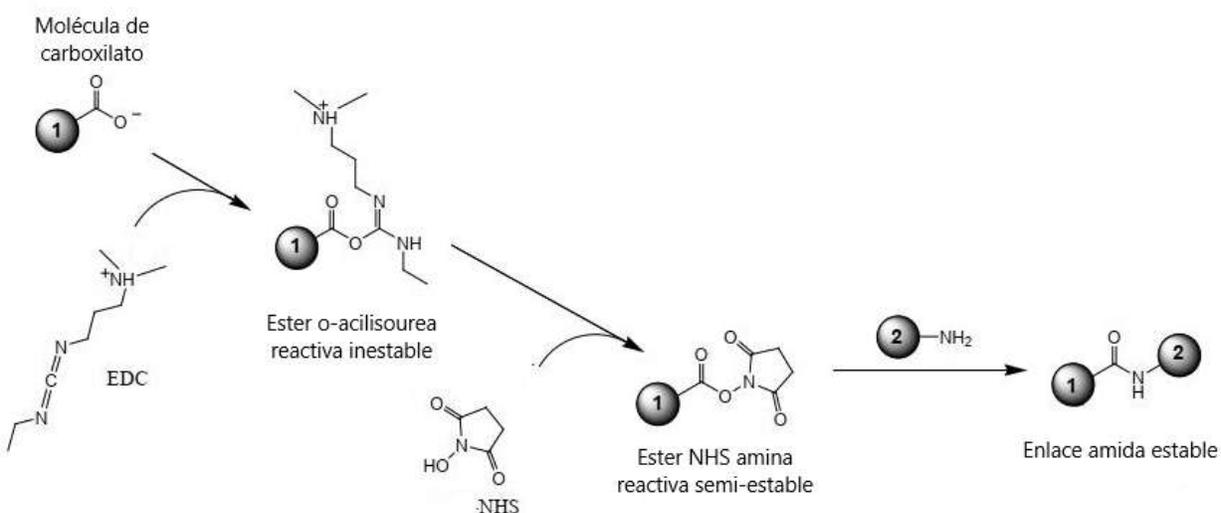


Figura 15. Esquema de las reacciones que involucran EDC y la activación con un éster NHS. Modificado de Instructions NHS and Sulfo-NHS Thermo scientific®.

9.12 Inmovilización del péptido GP5-B

Al electrodo modificado con la SAM (AuSPES-ATG-NHS/EDC) se le incorporó el péptido GP5-B que como elemento de reconocimiento para el inmunosensor donde los anticuerpos anti GP5-B reaccionaran uniéndose. Una vez retirado el electrodo serigrafiado del buffer de fosfatos y lavado con el mismo, se retiró el exceso de líquido y se colocó sobre el electrodo de trabajo 20µl de péptido diluido en buffer de fosfatos a una concentración de 50µg/ml para cada uno de los electrodos y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el

tiempo de reacción se realizó un nuevo lavado con buffer de fosfatos y se almacenó en el mismo a 4°C hasta su utilización (Figura 16).

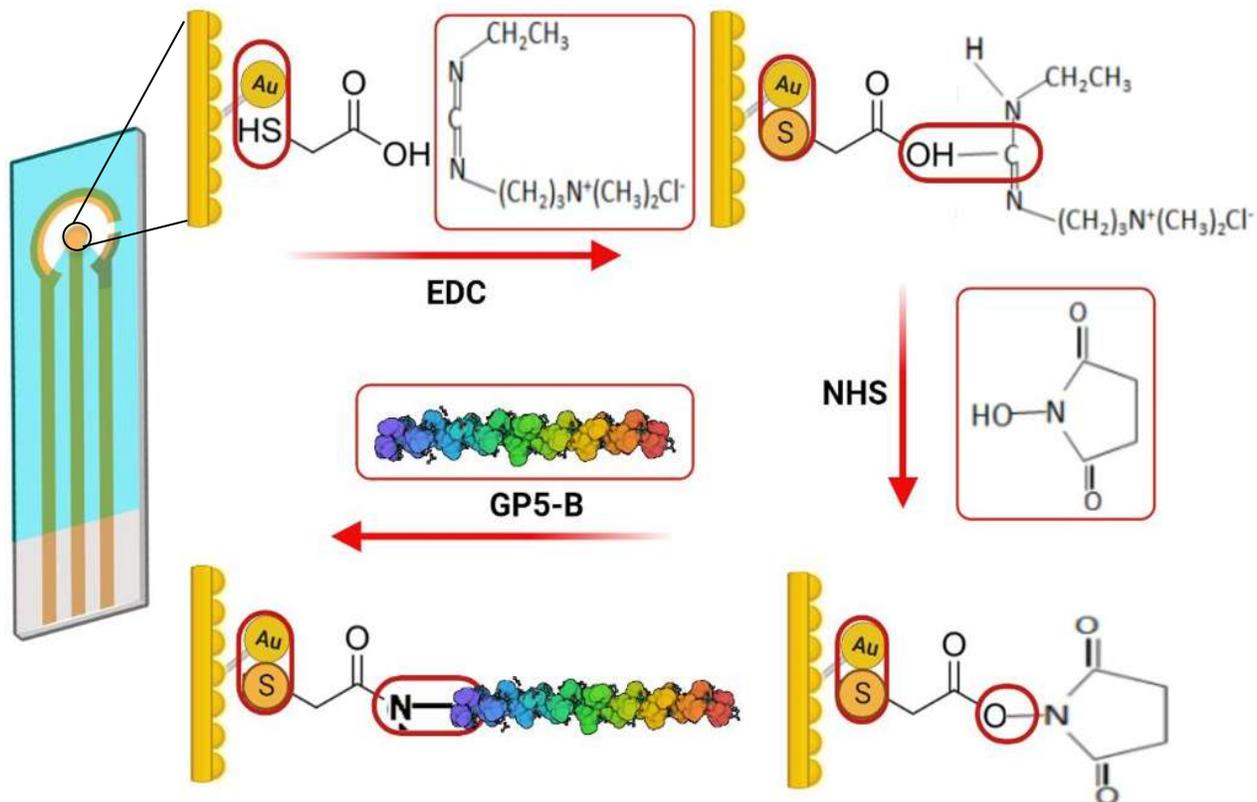


Figura 16. Esquema de las etapas para la inmovilización del péptido GP5-B sobre un electrodo serigrafiado. Se muestra un electrodo serigrafiado con una monocapa autoensamblada formada por ácido tioglicólico (ATG) y la modificación por EDC y la activación con un éster NHS donde el péptido es conjugado. Creado en BioRender.com.

9.13 Bloqueo de uniones inespecíficas

Una vez completada la inmovilización del péptido sobre la superficie del electrodo, fue necesario realizar un bloqueo de las uniones inespecíficas donde pudiera haber uniones de moléculas que interfirieran con los resultados. Después de finalizar la inmovilización del péptido se retiraron los electrodos del buffer de almacenamiento y se retiró el exceso de líquido para poder ser incubados con una solución de bloqueo. En esta etapa los sitios no específicos del biosensor fueron bloqueados incubando la superficie del electrodo con una solución de bloqueo que consta de 0.03% de caseína disuelta buffer de fosfatos a pH de 7.2. De esta se colocaron 50 μl con tiempo de reacción

de 30min a temperatura ambiente y se comprobó la eficiencia de unión por VC y EIE. Posteriormente se realizó un nuevo lavado con buffer de fosfatos, para finalmente conservar el biosensor en refrigeración inmerso en una solución buffer de fosfatos pH=7.2 hasta su utilización. Todos los pasos para la formación del Inmunosensor fueron monitoreados por Espectroscopia de Impedancia Electroquímica y de la Voltametría Cíclica (Figura 17).

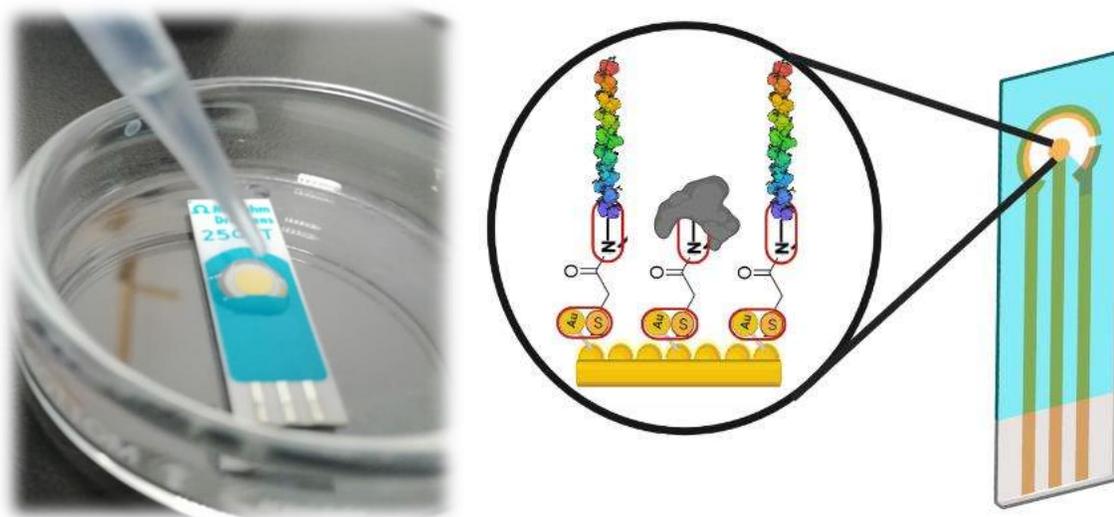


Figura 17. Bloqueo de uniones inespecíficas sobre un inmunosensor. La solución de bloqueo de caseína es incubada sobre el electrodo de trabajo.

9.14 Análisis del comportamiento generado por la interacción péptido-anticuerpo contra el péptido GP5-B

El biosensor fue expuesto a diferentes muestras de suero proveniente de los grupos de ratones, en total 5 grupos, cada grupo consta de 5 ratones (control, pre-inmune, BSA, PEG-GP5-B y BSA-GP5-B). El grupo pre-inmune correspondieron a el momento de la toma de muestra de los ratones que posterior mente fueron inyectados por lo que correspondió al día cero, estos cumplen la función de control y para los grupos experimentales BSA, PEG-GP5-B y BSA-GP5-B las muestras corresponden a la toma de muestra en el día 45 cuando fueron sacrificados los ratones, en ese momento los anticuerpos generados en las muestras fueron evaluados. Para el grupo control que en ningún momento fue inmunizado (Tabla 3).

Tabla 3. Muestras de suero obtenidas en ratón. Cada letra con numero corresponde a un individuo, día 0 corresponde a ratones sin inmunizar y día 45 post inmune.

Grupos	Día 0					Día 45				
Control	C1	C2	C3	C4	C5					
Pre-Inmune	Pre-1	Pre-2	Pre-3	Pre-4	Pre-5					
BSA						B1	B2	B3	B4	B5
PEG-GP5-B						G1	G2	G3	G4	G5
BSA-GP5B						P1	P2	P3	P4	P5

En el caso de las muestras obtenidas de lechones, se obtuvieron un total de 10 muestras, 5 de ellas corresponden a lechones infectados con PRRSV corroborado por ensayo ELISA realizado por un laboratorio tercero autorizado (ANEXO III), además 5 muestras más tomadas de lechones vacunados contra el PRRSV de una granja certificada libre de PRRSV (tabla 4).

Tabla 4. Muestras de sangre de lechones obtenidas en los muestreos. Los dos grupos corresponden a lechones infectados naturalmente por PRRSV (n=5) y lechones vacunados (n=5).

Grupos	Muestras				
Lechones infectados por PRRSV	Lechon-1	Lechon-2	Lechon-3	Lechon-4	Lechon-5
Lechones vacunados contra PRRSV	Lechon-1	Lechon-2	Lechon-3	Lechon-4	Lechon-5

Para obtener las lecturas de cada uno de los sueros sobre el inmunosensor, se procedió a retirar los inmunosensores preparados del buffer de almacenamiento, quitando el exceso de líquido. Una vez listo se depositó la muestra a medir. Para la preparación de las muestras, se retiraron los sueros del almacenamiento (congelación a -20°C) y se colocaron en hielo, posterior a esto las muestras fueron descongeladas y agitadas hasta su homogenización para tomar una muestra de $1\ \mu\text{l}$ y depositarla en un nuevo tubo eppendorf con $19\ \mu\text{l}$ de buffer de fosfatos 1:19. Sobre el inmunosensor se depositó la muestra de $20\ \mu\text{l}$, el cual fue previamente evaluado a través del ensayo de ELISA y se dejó en incubación durante 30 min a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó un lavado con buffer de fosfatos pH 7.2 y se introdujo el inmunosensor en la celda de medición para llevar a cabo el análisis por técnicas electroquímicas VC y EIE.

9.15 Determinación de los límites de detección del inmunosensor

Una vez estandarizado el ensamblaje del inmunosensor y determinadas las interacciones con los anticuerpos por medio de las técnicas electroquímicas EIS y VC se procederá a establecer el rango de detección de anticuerpos específicos contra el péptido GP5-B basado en los datos de cuantificación de anticuerpos obtenidos en el ensayo con el inmunosensor y el ensayo ELISA.

Se realizaron seis diferentes diluciones de uno del suero de concentración conocida previamente evaluada por un ensayo ELISA y se incubaron a temperatura ambiente sobre la superficie del electrodo durante 30min. Posteriormente se realizó un lavado con una solución buffer de fosfatos (pH=7.2) para después medirse por las técnicas electroquímicas VC y EIE. La concentración de anticuerpos anti péptidos deberá aumentar los valores de las lecturas debido a la interacción entre el péptido GP5-B y los anticuerpos anti péptidos donde se espera obtener una respuesta lineal (Figura 15). Los datos obtenidos serán correlacionados con las lecturas de los mismos sueros, utilizando del método ELISA. Para la dilución de el suero a utilizar, cada dilución se realizará en buffer de fosfatos (pH=7.2) en un volumen de 20 μ l con la concentración correspondiente a cada tubo y con la concentración de anticuerpos específicos dada por el ensayo ELISA. Cada medición de cada dilución se realizará por duplicado. De esta forma se obtendrán los datos necesarios para establecer una curva de calibración (Figura 18).

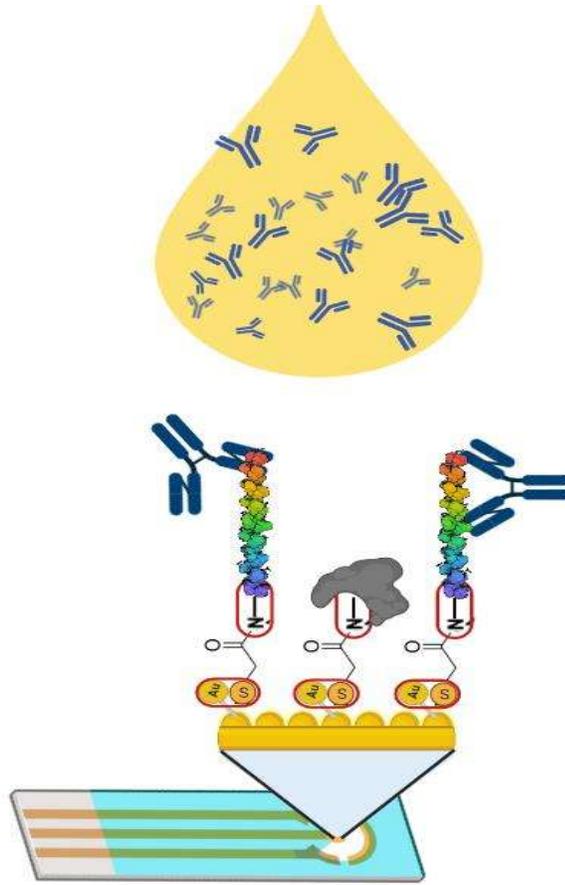


Figura 18. Proceso para la detección de anticuerpos específicos por el inmunosensor. El analito (suero) es colocado sobre el electrodo de trabajo, en donde se lleva a cabo la interacción entre los péptidos inmovilizados sobre la superficie del inmunosensor y los anticuerpos en la muestra. Creado con: BioRender.com

9.16 Análisis de datos por curvas ROC

El análisis en base a la curva característica operativa del receptor ROC, de las siglas en inglés (Receiver Operating Characteristic Curve) constituye un método estadístico que puede determinar la exactitud diagnóstica de una prueba o test, con la única condición de que utilice escalas continuas, este tipo de análisis es utilizado para determinar los rangos de sensibilidad y especificidad, además de evaluar la capacidad discriminativa de la prueba diagnóstica. El objetivo que se buscó fue tener una prueba que fuera altamente sensible y a la vez altamente específica. Normalmente las pruebas diagnósticas comerciales reportan resultados cuantitativos, utilizando escalas continuas para formular el diagnóstico de una determinada enfermedad, al establecer un punto de corte, sobre el cual se apoya la presencia del diagnóstico y bajo el cual se rechaza o viceversa, además de una capacidad para diferenciar de sujetos sanos contra enfermos.

En este trabajo se utilizaron las curvas ROC para medir la concentración de anticuerpos generados contra el péptido GP5B en ratones macho (Balb/c Harlan, Indianapolis, IN) previamente inmunizados, que será postulada como una prueba de identificación de anticuerpos específicos de un posible péptido vacunal por medio de un inmunosensor electroquímico, la concentración de anticuerpos correspondió a una escala continua, cuyos valores deben ser significativamente diferentes en los diferentes grupos experimentales de ratones inmunizados (Hajian-Tilaki, K. *et al*, 2013).

Para poder detectar concentraciones de anticuerpos a partir de valores de unión a antígeno específico es necesario establecer un punto de partida, considerándose “positivos” aquellos valores mayores o iguales al punto de corte, y “negativos” aquellos valores menores al punto de corte. Al contrastar los resultados de concentraciones de anticuerpos con los resultados de un estándar en este caso el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA por sus siglas en inglés (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) como prueba para la detección de anticuerpos de la cual surgen cuatro posibles alternativas diagnósticas:

1. Ratones que fueron inmunizados con el péptido GP5B y presentan anticuerpos contra el péptido según el estándar (ELISA) y cuya detección de anticuerpos en el inmunosensor los diagnostica como “positivos”. Estos ratones se clasificarán como “verdaderos positivos, VP”.
2. Ratones que fueron inmunizados con el péptido GP5B y que presentan anticuerpos según el estándar (ELISA), sin embargo, en la medición de anticuerpos por inmunosensor resultan como “negativos”. Este grupo reciben el nombre de “falsos negativos, FN”.
3. Ratones que no fueron inmunizados con el péptido GP5B y que no presentan anticuerpos anti-GP5B según el estándar (ELISA) y cuya medición por inmunosensor da como “negativos”. Este grupo recibe el nombre de “verdaderos negativos, VN”.
4. Ratones que no fueron inmunizados con el péptido GP5B y no presentan anticuerpos según el estándar ELISA, sin embargo, su medición por inmunosensor los diagnostica como “positivos”. Este grupo recibe el nombre de “falsos positivos, FP”.

Conociendo el número de muestras de cada una de estas alternativas diagnósticas es posible calcular la sensibilidad y especificidad para el punto de corte en el análisis, según las siguientes fórmulas: sensibilidad = $VP/(VP+FN)$ y especificidad = $VN/(FP+VN)$ (Tabla 5).

Tabla 5. Categorías diagnósticas obtenidas a partir de un estudio de exactitud diagnóstica para los resultados del inmunosensor y el método de referencia.

	Prueba estándar positiva	Prueba estándar negativa
Prueba positiva	Verdaderos positivos (VP)	Falsos positivos (FP)
Prueba negativa	Falsos negativos (FN)	Verdaderos negativos (VN)
Sensibilidad = $VP/(VP+FN)$, Especificidad = $VN/(FP+VN)$.		

Un gráfico de curva ROC ilustra la sensibilidad y especificidad de cada uno de los posibles puntos de corte de una prueba diagnóstico cuya escala de medición es continua. La curva ROC se construye en base a la unión de distintos puntos de corte, correspondiendo el eje Y a la sensibilidad y el eje X a la especificidad de cada uno de ellos. En la (Figura 19) se aprecia la ilustración de un gráfico de curva ROC de una prueba diagnóstica hipotética (Hajian-Tilaki, K. *et al*, 2013).

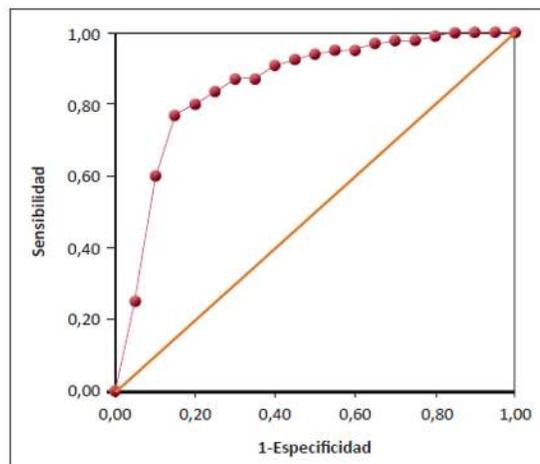


Figura 19. Gráfico de curva ROC de una prueba diagnóstico hipotético. Cada punto de la curva ROC (círculos rojos) corresponde a un posible punto de corte de la prueba diagnóstica, y nos informa su respectiva sensibilidad (eje Y) y 1-especificidad (eje X).

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Seguimiento del peso corporal de los ratones

La salud en general de los ratones fue observada durante el periodo de experimentación, ningún animal mostró signos de enfermedad. En ningún grupo se observó daño significativo del tejido en el sitio de inyección.

El peso corporal de los ratones fue registrado desde el día 0 hasta el día 45 post-inmunización en todos los grupos experimentales, también se contrastó con el peso de los grupos experimentales previamente evaluados en el grupo de trabajo. El peso en gramos se graficó a los 0, 15, 30 y 45 días (Figura 20). Los resultados muestran una ganancia de peso en los grupos, grupos control y grupos inmunizado. El seguimiento del peso corporal de los ratones es un indicador de salud, por lo que el aumento constante de peso a través de la duración del ensayo muestra que los ratones se mantuvieron saludables (Perez-Duran *et al*, 2020)

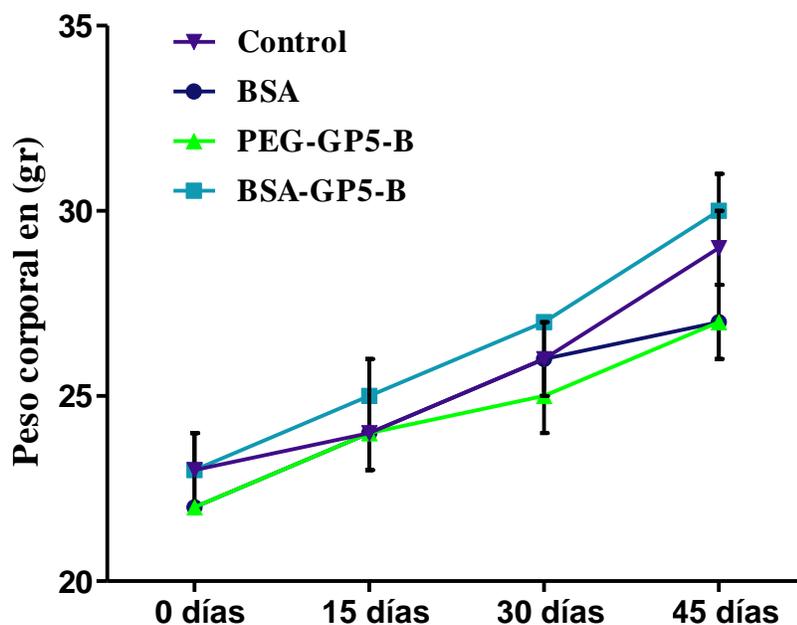


Figura 20. Peso corporal de ratones representado en gramos. Promedios de masa corporal de los grupos control y experimentales (n=5 por grupo), durante el desarrollo del tratamiento experimental. Los datos no presentan diferencia estadísticamente significativa, en todos los casos ($p \geq 0.05$) la comparación se realizó entre grupos en el mismo día de evaluación. Los datos presentan \pm S.E.M.

10.2 Evaluación de inmunoglobulinas G totales

Para obtener el suero de ratones inmunizados con el péptido GP5-B acoplado al acarreador BSA (BSA-GP5-B) se inoculó un grupo de ratones de la cepa Balb/c bajo las mismas condiciones experimentales descritas y previamente reportadas por Perez-Duran *et al*, 2020 (Datos no publicados, Tesis de Maestría). También, se utilizó el suero almacenado en congelación obtenido previamente para los grupos: Grupo inmunizado con la proteína acarreadora, BSA-GP5-B y grupo inmunizado con PEG-GP5-B reportadas por Perez-Duran *et al*, 2020 (Tesis de maestría) y Contreras-Figueroa X *et al*, 2012 (Datos no publicados, Tesis de Licenciatura). Con la finalidad de comparar los datos entre grupos y contrastar los datos obtenido en los ensayos de ELISA con los datos obtenidos en los biosensores. Se presentan las gráficas de la cuantificación de IgGs totales y específicas de todos los grupos experimentales.

En los resultados obtenidos por el ensayo de ELISA en los animales que fueron inmunizados con albúmina de suero bovina (acarreador BSA) se observó que la concentración de IgG's totales aumento significativamente a partir del día 15 post inmunización, esto en comparación con el día 0 previo a la inmunización. Por otro lado, en los resultados de concentración de IgG's totales correspondientes a las muestras de suero de los días post inmunización 30 y 45 también se observó un aumento estadísticamente significativo por lo que podemos atribuir estos aumentos de anticuerpos a las inmunizaciones con el acarreador BSA. Al observar los aumentos de IgG'S y comparándolos con el control sin inmunizar (día 0 pre inmune) basado en el análisis estadístico del grupo (n=5) podemos confirmar el aumento de anticuerpos pos-inmunización (Figura 21-A). El análisis de los datos obtenidos de la cuantificación de IgG totales para el grupo inmunizado con el péptido PEG-GP5-B (Figura 21-B) muestra un aumento en la concentración en cada periodo de inmunización para el grupo experimental tomando como su propio control el día 0 pre inmune. La concentración de IgG total observada en el grupo BSA-GP5-B se muestra en la figura 21-C. En este grupo se observa la inducción de la respuesta contra el péptido GP5-B acoplado a la proteína acarreadora BSA.

Por último, resultados de la Evaluación de IgG total para el grupo experimental inmunizado con PEG-GP5-B, al igual que con el grupo inmunizado solo con la proteína acarreadora BSA, muestran aumentos en las concentraciones para cada periodo de inmunización en ambos grupos. El aumento de IgG's total fue significativo tomando como su propio control el día 0 pre inmune. Estos resultados mostraron un aumento acorde al esquema de inmunización y a un efecto antigénico

provocado por la inmunización de los péptidos GP5-B. Sin embargo, a pesar de que fueron utilizados 2 diferentes acarreadores (PEG y BSA) ambas concentraciones de IgG total mostraron un comportamiento y concentraciones similares (Figura 21-C), en ambos casos superiores a la concentración de IgG observada en la inmunización con la proteína BSA. Interesantemente, se observó que el acarreador PEG, podría ser utilizado en lugar de la proteína BSA en futuros experimentos.

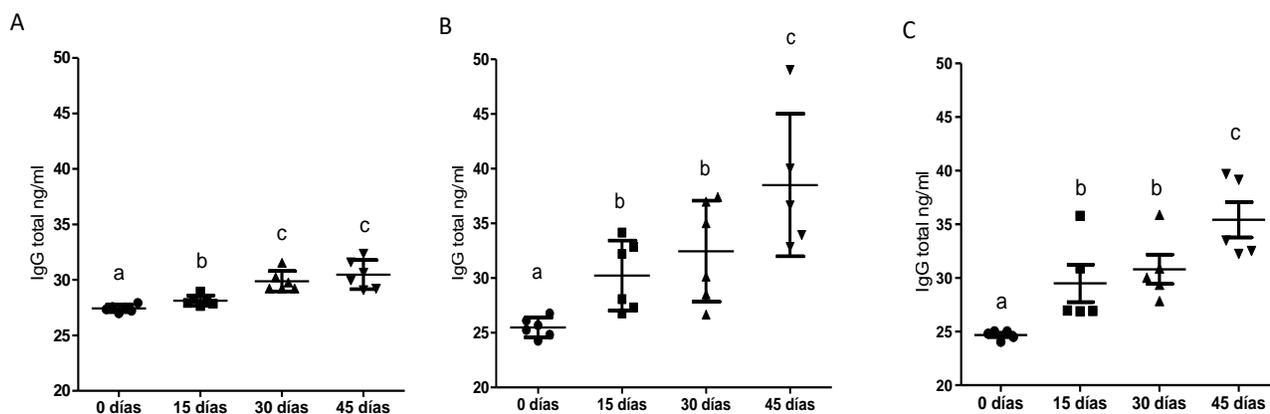


Figura 21. Concentración de Inmunoglobulinas G total en sueros de ratones. A, IgG total en el grupo control inmunizado con proteína acarreadora BSA. B, cuantificación de IgG total en el grupo inmunizado con el péptido GP5-B unido a acarreador PEG(PEG-GP5-B). C, cuantificación de IgG's totales en el grupo inmunizado con el péptido GP5-B unido a acarreador BSA (BSA-GP5-B). Análisis estadístico (n=5 por grupo). Las letras diferentes representan diferencias significativas contra el control a 0 días y entre los grupos experimentales ($p < 0.05$). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Tukey, los datos presentan \pm S.E.M.

10.3 Evaluación de inmunoglobulinas G específicas de péptido

Los dos grupos de animales inmunizados con el péptido GP5-B, pero con diferente acarreador, para los dos grupos, se analizaron para observar la inducción de anticuerpos específicos anti-GP5-B. Es importante resaltar que, a diferencia de la medición de IgG total, en este grupo se utilizó el péptido GP5-B inmovilizado en la placa de ELISA (peptide coating Kit), para seleccionar y cuantificar los anticuerpos anti-péptido. Ambos grupos mostraron un aumento significativo de anticuerpos al día 45 pos-inmunización comparado con el día 0. El aumento en las concentraciones de IgG's en cada periodo y en ambos grupos experimentales se muestra en la Figura 22-A y 22-B. Al día 45 pos-inmunización ambos grupos mostraron concentraciones similares de anticuerpos específicos. Sin embargo, las muestras sanguíneas de animales (ratones) que fueron inmunizados

con el péptido GP5-B conjugado con el acarreador de PEG, mostro un ligero aumento en las concentraciones de anticuerpos. Esto puede deberse a las características propias de los acarreadores utilizados. Se sabe que PEG conjugado es un potenciador de la respuesta inmune además de no ser toxico y que hasta ahora no se ha descrito un comportamiento en el que por sí solo sea capaz de generar una respuesta inmune. Además de que los péptidos unidos a PEG adquieren una mayor estabilidad a la degradación o aumento de vida media, lo que puede aumentar el tiempo de exposición a las células dendríticas y macrófagos, por lo tanto, también está relacionado con la generación de anticuerpos.

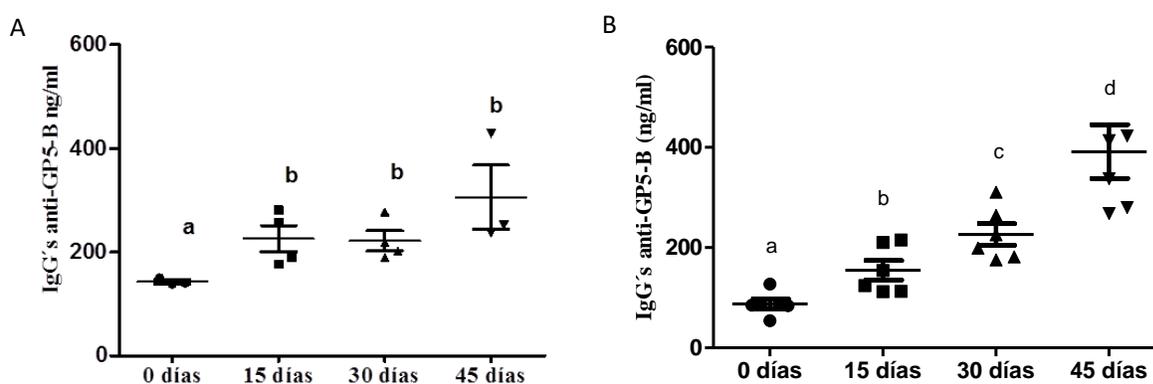


Figura 22. Concentración de Inmunoglobulinas G anti-péptido. A, Cuantificación de IgG anti péptido en suero de ratones inmunizados con GP5-B unido al acarreador PEG (PEG-GP5-B). B, Cuantificación de IgG anti-péptido medido en suero de ratones inmunizados con GP5-B unido al acarreador BSA (BSA-GP5-B). Análisis estadístico en grupos (n=5 por grupo). Las letras diferentes representan diferencias significativas contra el control a 0 días y entre los grupos experimentales ($p < 0.05$). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Tukey, los datos presentan \pm S.E.M.

10.4 Limpieza de los electrodos másico de oro

El perfil del electrodo de oro (másico) se realizó por Voltametría cíclica obtenida después de la limpieza del electrodo de oro (Au), que corresponde a la superficie del oro policristalizado (A1, A2, A3) que asegura la adecuada limpieza del electrodo. Los picos registrados corresponden a la formación de una película de óxidos de oro(A), y reducción de óxidos(B), características de dicha superficie Figura 23. Obtener otros picos, indica que el electrodo no se ha limpiado de manera satisfactoria. Los picos registrados en el voltamperograma corresponden a la formación de una película de óxidos de oro (A1 y A2), evolución de oxígeno (A3). Además, la reducción de óxidos (B1) características de dicha superficie. Esta caracterización electroquímica inicial es importante ya que será una medida de referencia sobre los cambios que se fueron induciendo sobre la

superficie. De esta forma tendremos un parámetro de referencia de las lecturas siguientes generadas por los análisis electroquímicos correspondiente.

El electrodo másico que utilizamos presenta un perfil característico de los electrodos de oro, con 3 picos de oxidación, sin embargo, cada perfil de cada electrodo puede ser diferente, incluso el mismo electrodo después de haber pasado por las limpiezas descritas en la metodología pueden alterar los perfiles obtenidos y aunque estas diferencias por lo general no generan interferencias significativas al momento de generar cambios en la superficie, es importante tenerlas en cuenta para los siguientes experimentos.

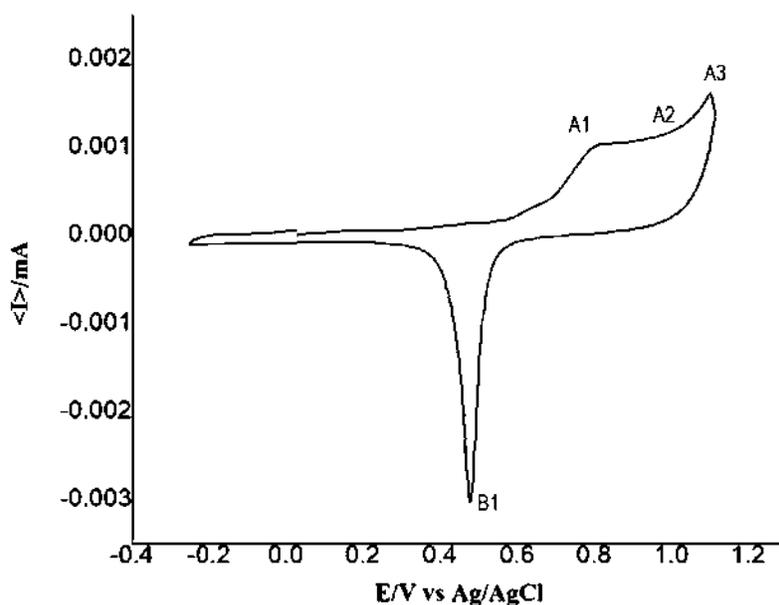


Figura 23. Voltamperometría cíclica de un electrodo de oro en solución de H_2SO_4 0.5 M velocidad de barrido de 0.05 V/s.

En la figura 23 se muestra el Voltamperograma del electrodo estándar de oro limpio en presencia de la sonda redox que es una solución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Se obtuvo un voltamperograma reversible característico de sonda redox el cual sirvió como referencia para las siguientes mediciones donde serán unidos diferentes compuestos sobre la superficie del electrodo de oro. Los valores obtenidos para esta primera medición fueron $\Delta E_p = 77 \pm 4$ mV para la separación entre los máximos de los picos, además un $E_{pa} = 189 \pm 2$ mV y un $E_{pc} = 111 \pm 3$.

Por lo tanto, los cambios significativos de aumento de estos valores podrán ser atribuidos a cambios en la superficie del electrodo.

En la Figura 24-B se muestran los resultados para las mediciones de la espectroscopia de impedancia electroquímica ajustados a un circuito equivalente de Randles Figura 24-B, que se puede observar como un diagrama de Nyquist, de lo cual se obtuvieron los valores de resistencia a la transferencia de carga, R_{ct} con un valor de 99Ω que es un valor pequeño que indica una buena limpieza con superficie electroquímicamente activa. Los valores obtenidos derivados de la impedancia y ajustados a un circuito equivalente de Randles fueron; $R_s = 116 \pm 7$ (Ohm), $C_{dl} = 0.2597 \pm .095$ (μF), $R_{ct} = 99 \pm 8$ (Ohm), $W_2 = 1290 \pm 52$ (Ohm s^{1/2}).

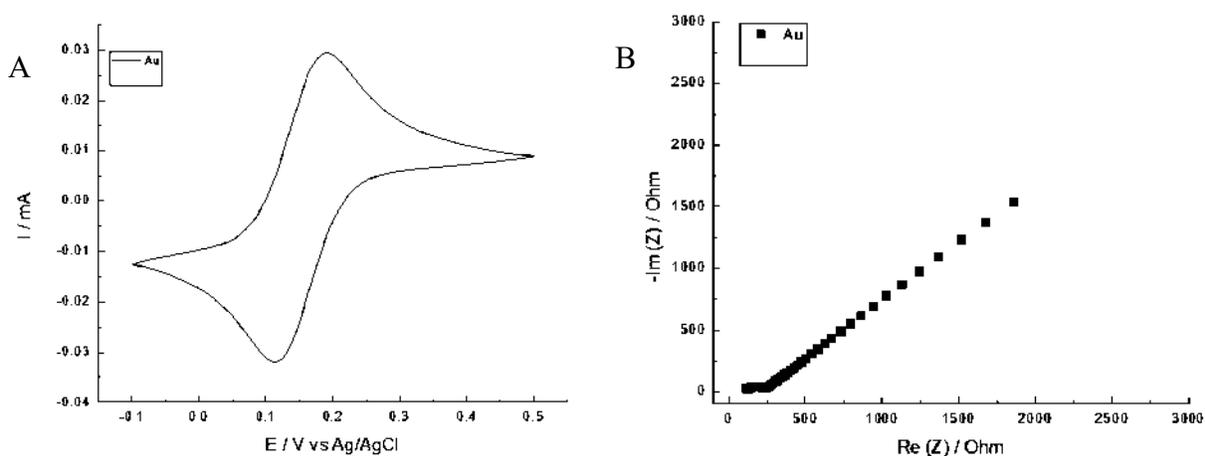


Figura 24. Análisis electroquímico de un electrodo de oro másico en una solución de $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ 5 mM por las técnicas de VC y EIE. A, Voltamperograma de un electrodo de oro másico a velocidad de barrido de 0.05 V/s. B, Diagrama Nyquist de el mismo electrodo de oro másico. La baja resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) que se observa proporciona una medida de la limpieza de la superficie.

10.5 Formación de monocapas autoensambladas (SAMs) en electrodo másico de oro

En la figura 25 se muestra el voltamperograma correspondiente al sistema electroquímico de la sonda con un electrodo de Au modificado. La separación entre los máximos de los picos fue de $\Delta E_p = 98$ (mV) y los valores de $E_{pc} = 89 \pm 2$ (mV) y $E_{pa} = 180 \pm 4$ (mV) por lo que el aumento en estos valores se relaciona con la modificación realizada sobre la superficie del electrodo de trabajo siendo más bajo el valor para el electrodo de oro sin modificaciones que fue de $\Delta E_p = 77 \pm 4$ (mV).

La diferencia de potencial entre los máximos de las corrientes catódica y anódica, ΔE_p , se utiliza como una medida de la limpieza electroquímica de la superficie del electrodo. Se espera que para reacciones de transferencia mono electrónica rápida como en el $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ en una superficie de oro limpia y sin bloqueo la diferencia de potencial debe ser alrededor de $\Delta E_p = 58$ mV (Aj. Bard *et al*, 2001), por lo tanto, interpretar cualquier aumento de este valor puede ser causada por imperfecciones de la superficie o contaminaciones. Entre más cercana sea la diferencia, más limpia y uniforme es la superficie del electrodo.

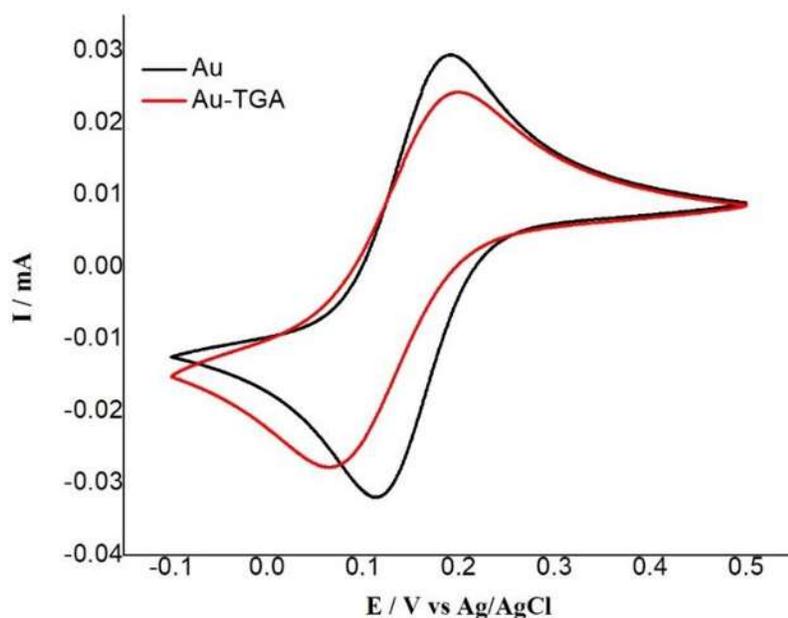


Figura 25. Voltametría cíclica (VC) de un electrodo másico de oro inmerso en el par Ferri/Ferro 5 mM a velocidad de barrido de 0.05 V/s. La grafica presenta dos lecturas diferentes, Electrodo de oro limpio (Au), después de la formación de la monocapa de ácido ti glicólico (Au-ATG).

La Voltamperometría cíclica refleja los cambios de comportamiento del sistema electroquímico $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ de la sonda conforme se van anclando moléculas a la superficie del electrodo. Después de la limpieza, se cubrió el electrodo de Au con ácido mercaptoacético (TGA) que es un tiol de cadena corta, lo que ocasiona una respuesta con una disminución de corriente y aumento de ΔE_p a 98 mV, lo anterior se atribuye a que la modificación sobre la superficie del

electrodo generada por la reacción del TGA en la superficie del electrodo, que actúa como una barrera semipermeable para la transferencia de electrones entre el electrodo de Au y la sonda redox.

Posterior a la primera activación de la monocapa el electrodo se modificó con EDC y NHS, se observa un aumento de corriente y una disminución de separación de pico a pico ΔE_p a 84 mV en el caso de los espectros de VC. Esto es probablemente debido a que ahora la monocapa que recubre el electrodo tiene una mayor permeabilidad facilitando el intercambio electrónico. Los espectros CV obtenidos en cada etapa de formación de monocapa muestran la variación de la forma del espectro demostrando que la reacción química esperada en cada etapa se completó con éxito, Figura 26.

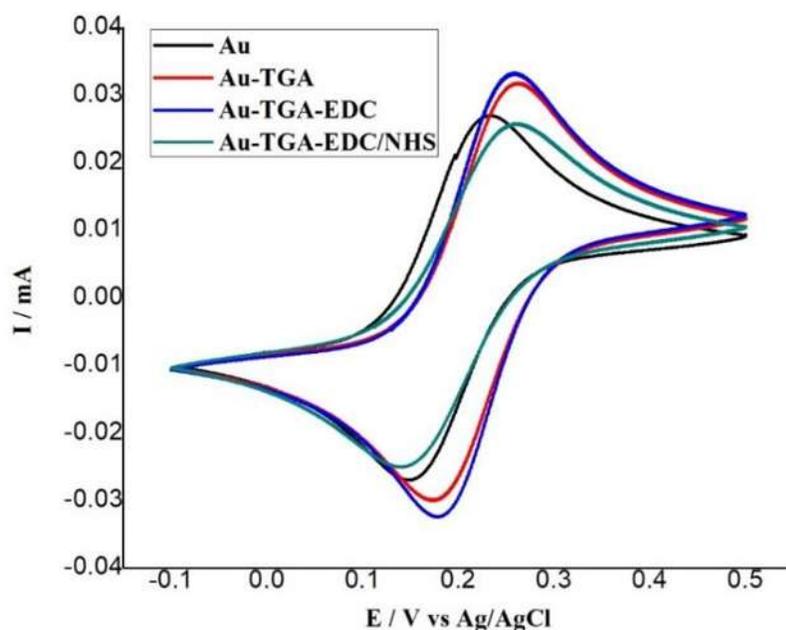


Figura 26. Voltametría cíclica (VC) de un electrodo másico de oro durante las etapas de la formación y modificación de la SAM inmerso en el par Ferri/Ferro 5 mM a velocidad de barrido de 0.05 V/s. El voltamperograma presenta cuatro lecturas diferentes, Electrodo de oro limpio (Au), después de la formación de la monocapa de ácido ti glicólico (Au-TGA), después de la reacción EDC (Au-TGA-EDC) y después de la activación con NHS (Au-TGA-EDC/NHS).

En la Figura 27, se muestra un diagrama de EIE obtenidos durante cada etapa donde se muestra la forma característica del espectro a través de la formación de la monocapa. Las diferencias entre los cuatro espectros se deben a las modificaciones químicas realizadas sobre su superficie. Del mismo modo que en el caso del electrodo de oro másico, cuando se fijó a la superficie el ácido mercaptoacético se obtuvo un cambio significativo en la forma del diagrama de Nyquist. Se

incrementó considerablemente el valor de R_{ct} , de 99 a 356 Ω , lo que indicó que la presencia del ácido mercaptoacético dificulta la transferencia de iones. Muy probablemente por los efectos de la característica polar del grupo ácido carboxílico que queda expuesto. Al formar el éster con EDC/NHS la polaridad de la molécula fija en la superficie del electrodo baja al igual que el valor de R_{ct} , pasando de 818 a 201 Ω . Tanto que la resistencia asociada al electrolito (S_2) como la capacitancia interfacial no varían significativamente.

Para establecer los datos se consideraron los cambios después de la unión del péptido GP5-B y posteriormente los sueros con los anticuerpos, la estandarización de la monocapa autoensambada mostró resultados reproducibles, por lo tanto, se procedió con la medición de los sueros preinmune e hiperinmunes.

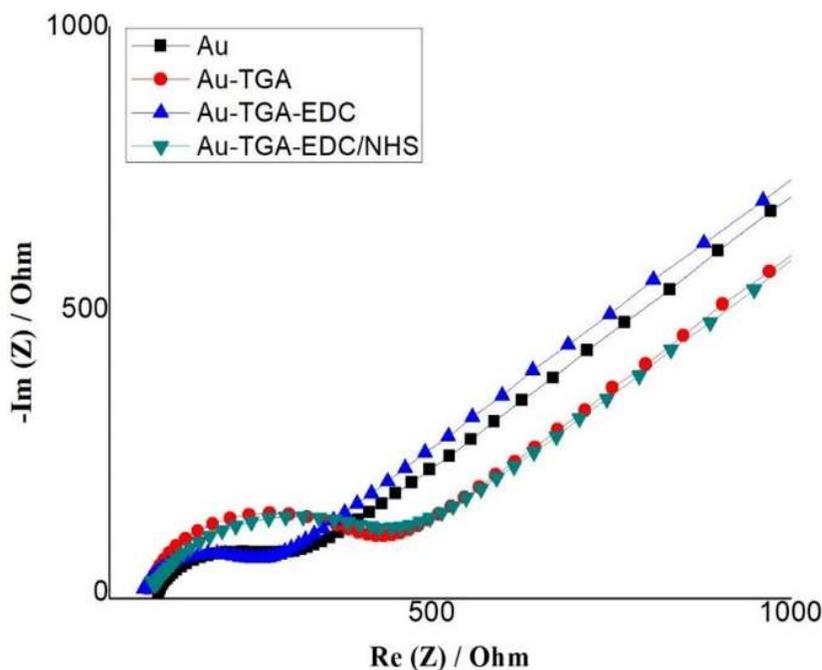


Figura 27. Impedancias de un electrodo másico de oro durante las etapas de la formación y modificación de la SAM inmerso en el par Ferri/Ferro 5 mM. El diagrama de Nyquist presenta cuatro lecturas diferentes, Electrodo de oro limpio (Au), después de la formación de la monocapa de ácido ti glicólico (Au-ATG), después de la reacción EDC (Au-TGA-EDC) y después de la activación con NHS (Au-TGA-EDC/NHS).

10.6 Inmovilización del péptido GP5-B sobre electrodo de oro másico

Una vez formada la monocapa autoensamblada (SAM) fueron conjugadas diferentes concentraciones del péptido GP5-B, de 50 a 500 ng/ml. Se registraron los cambios por cada concentración de péptido anclada sobre la superficie del sensor por técnicas electroquímicas como se muestra en la Figura 28. En los resultados de la espectroscopia de impedancia electroquímica, así como en los ajustes de los valores para el circuito equivalente se observaron los cambios superficiales generados por el correcto anclaje del péptido, donde a mayor concentración hubo un aumento de la resistencia a la transferencia de carga, así como de la capacitancia. Por lo que la monocapa autoensamblada cumplió con la función del anclaje del péptido GP5-B e incluso fue capaz de anclar concentraciones altas de hasta 500 ng/ml. Sin embargo, para los siguientes estudios se utilizó la concentración de 50 [ng/ml]. Las lecturas complementarias de las impedancias de la figura 28 se encuentran en el ANEXO IV.1.

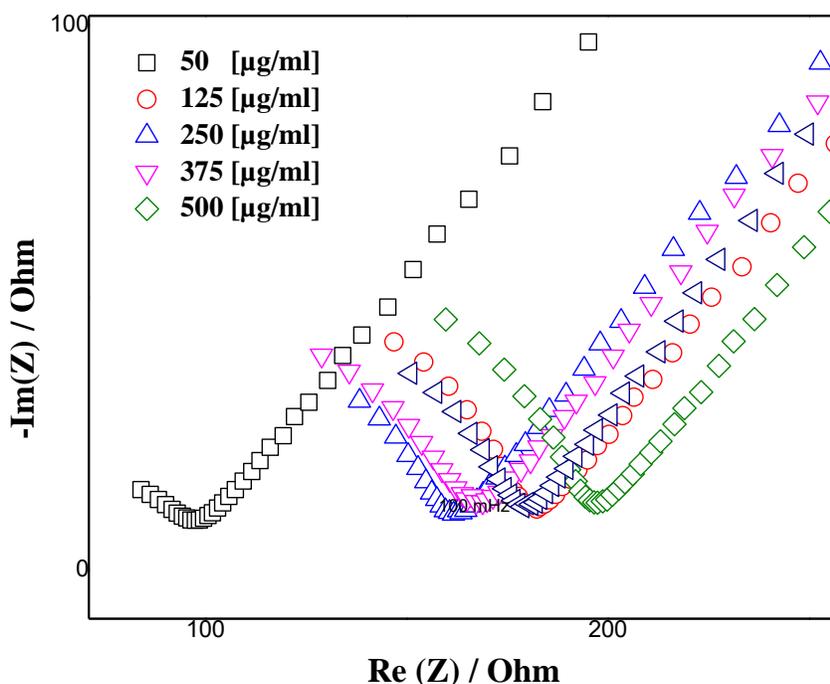


Figura 28. Impedancias de un electrodo másico de oro y su efecto en el anclaje de diferentes concentraciones de péptido GP5-B en presencia del par redox Ferri/Ferro 5 mM. El diagrama de Nyquist presenta cinco concentraciones de péptido GP5-B que fueron incubadas bajo las mismas condiciones.

Derivado de ajustar los datos a un circuito equivalente de Randles se obtuvieron los valores de resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) y se graficaron los datos con la concentración del péptido GP5-B con la que fue incubado el electrodo como se muestra en la Figura 29. Se observó una respuesta creciente en los valores de impedancia, específicamente R_{ct} . Esto conforme aumento la concentración del péptido sobre la superficie, por lo que a mayor concentración mayor fue la resistencia a la transferencia de carga medida en Ohms. Esto sugiere que la monocapa autoensamblada formada sobre la superficie es capaz de conjugados eficientemente el péptido GP5-B sobre su superficie, lo que garantiza la función principal del elemento de bioconocimiento que es interactuar directamente con el analito, en este caso anticuerpos anti péptido. Sin embargo, se determinó una concentración fija para la construcción del inmunosensor basado en estos resultados ya que se comprobó la eficiencia de unión generada por la monocapa auto ensamblada.

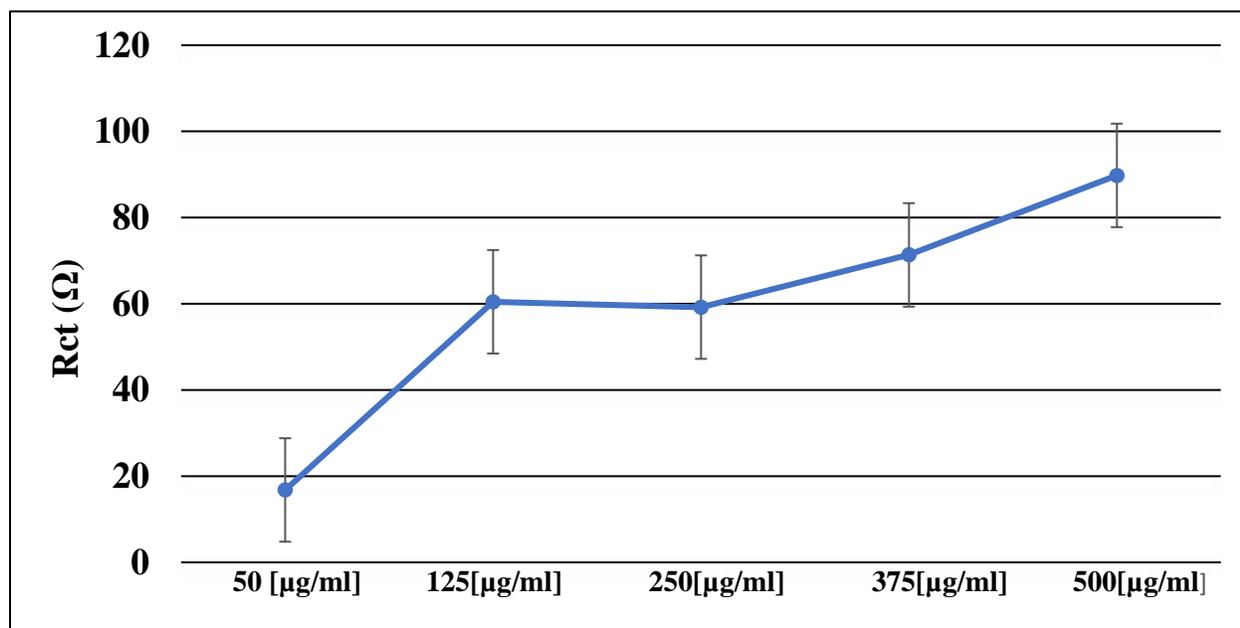


Figura 29. Respuesta de las resistencias a la transferencia de carga (R_{ct}) evaluada a través de la modificación del electrodo con diferentes concentraciones de péptido GP5-B. Los valores de impedancia se ajustaron a un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) de cada experimento. los datos presentan \pm S.D.

10.7 Formación de SAM's y conjugado del péptido GP5B sobre electrodos serigrafiados (AuSPEs)

El perfil del electrodo de oro serigrafiado (AuSPEs) se realizó por Voltametría cíclica en un medio ácido. El perfil del oro (Au) obtenido Figura 30, correspondió a la superficie del electrodo de trabajo Au del electrodo serigrafiado, Los picos registrados corresponden a la formación de una película de óxidos de oro y reducción de óxidos, características de dicha superficie. Los picos registrados corresponden a la formación de una película de óxidos de oro(A), y reducción de óxidos(B), características de dicha superficie. Los picos registrados en el voltamperograma corresponden a la formación de una película de óxidos de oro (A1 y A2), evolución de oxígeno (A3). Además, la reducción de óxidos (B1). Se puede apreciar una diferencia con el resultado obtenido para el electrodo másico, sin embargo, ambos presentan el mismo comportamiento electroquímico. Las diferencias encontradas pueden deberse a las características propias en ambos materiales, ya que en el caso de electrodo másico se trata de un disco de oro con mayor masa que el serigrafiado, además de que las condiciones del experimento son ligeramente diferentes como se muestras en la metodología.

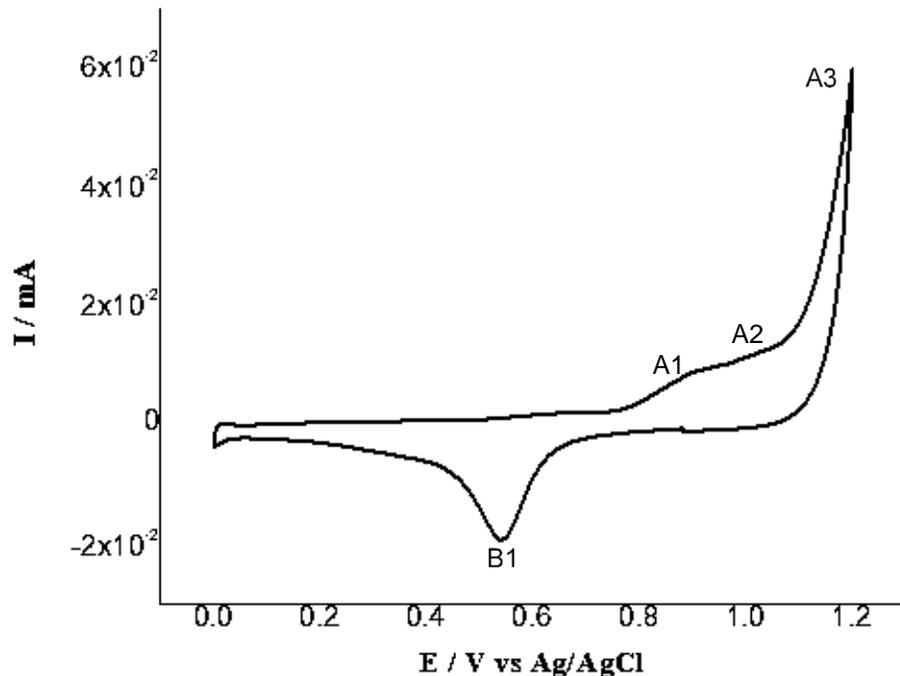


Figura 30. Voltamperometría cíclica de un electrodo serigrafiado (AuSPE) en solución de H_2SO_4 0.5 M velocidad de barrido de 0.05 V/s.

Para la formación de la monocapa auto ensamblada, fue monitoreado cada paso del ensamblaje de las moléculas por espectroscopia de impedancia electroquímica. Se observó la correcta unión de las moléculas que conforman las SAM por medio de la EIE, el cual mostró el comportamiento esperado, Figura 30. Una vez conformada la SAM (en color azul) se tomó de referencia para comprobar el anclaje del péptido GP5-B donde el cambio superficial generado sobre el electrodo de trabajo y se observó la resistencia a la transferencia de carga generado por el bloqueo de la superficie. Una vez comprobada la formación de la SAM se incorporaron sobre el electrodo de trabajo 50 [$\mu\text{g/ml}$] del péptido GP5-B y posteriormente se analizó el cambio superficial generado por EIE. Observamos que la diferencia entre la lectura generada por la SAM contra la lectura generada después de la unión del péptido GP5-B es significativa por lo que el aumento en la resistencia a partir de la SAM fue generado por el anclaje del péptido sobre la superficie, Figura 31A. Fue necesario corroborar la correcta modificación con el péptido debido a que tiene la función de ser el elemento de reconocimiento para los anticuerpos anti-GP5-B, lo que le confiere la especificidad al inmunosensor. Los datos obtenidos por EIE mostraron (Figura 31B) la inmovilización sobre la superficie de la SAM (AuSPEs-TGA-EDC/NHS) del péptido GP5-B dada por el aumento en el valor de la resistencia a la transferencia de carga $R_{ct} = 180.5 \text{ Ohm}$.

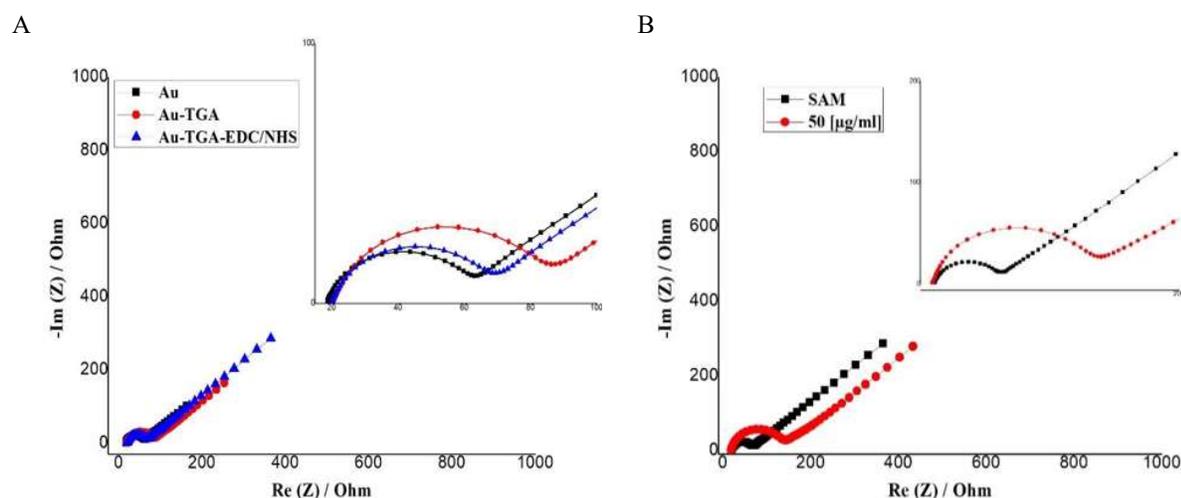


Figura 31. Impedancias en electrodos serigrafados (AuSPEs) durante las etapas de la formación y modificación de la SAM y el conjugado del péptido GP5-B en presencia del par Ferri/Ferro 5 mM. A, el diagrama de Nyquist presenta tres lecturas diferentes, electrodo de oro limpio (Au), después de la formación de la monocapa de ácido ti glicólico (Au-ATG), y después de la activación con NHS(Au-TGA-EDC/NHS). B, comparación con la formación de la SAM y el posterior anclaje del péptido GP5-B a [$50 \mu\text{g/ml}$].

10.8 Bloqueo de uniones inespecíficas

Al finalizar la etapa de la formación de la SAM y el anclaje del péptido GP5-B los sitios no específicos del inmunosensor fueron inactivados mediante la adición de una solución de caseína al 0.3% en buffer de fosfatos durante 30 minutos para finalmente conservar el biosensor en refrigeración hasta su utilización. Posterior al bloqueo de los sitios no específicos se procedió a realizar las lecturas por EIE para corroborar la unión de la caseína sobre el inmunosensor que tendrá la finalidad de evitar la unión de moléculas o proteínas no específicas al péptido GP5-B y así evitar falsos positivos. Los resultados obtenidos indican el anclaje del péptido GP5-B y el bloqueo de las uniones inespecíficas sobre la superficie del electrodo de trabajo (Figura 32-A) donde en cada etapa las lecturas aumentaron, especialmente la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}), que obtuvo un aumento correspondiente a las dimensiones del bloqueo. Para la etapa del bloqueo la resistencia a la transferencia de carga el Diagrama de Nyquist muestra el aumento en el bloqueo del electrodo donde se obtuvo un valor de $R_{ct} = 442.4 \pm 1.2 \text{ Ohm}$ (Figura 32) estos valores, por lo tanto, estuvieron dadas por la integración de las diferentes moléculas unidas sobre la superficie del electrodo de trabajo, conformando la matriz del inmunosensor. A partir de las lecturas de esta matriz que conforman al inmunosensor sin reaccionar con ninguna muestra se le llamó línea base y será la referencia para comparar contra el efecto de la exposición a diferentes muestras.

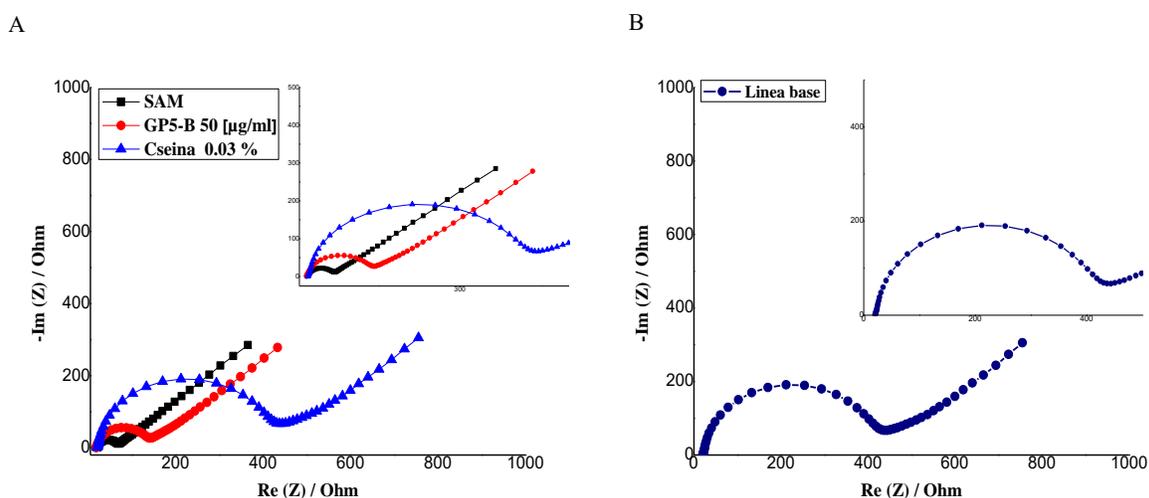


Figura 32. Impedancias en electrodos serigrafados (AuSPEs) durante las etapas de la formación de la SAM, el conjugado del péptido GP5-B y el bloqueo de uniones inespecíficas por caseína 0.03%, en presencia del par Ferri/Ferro 5 mM. A, el diagrama de Nyquist presenta tres lecturas diferentes, monocapa autoensamblada (SAM), el conjugado del péptido GP5-B [50 µg/ml] y el bloqueo de uniones inespecíficas por caseína 0.03%. B, respuesta de la suma de los componentes del inmunosensor (línea base).

10.9 Reproducibilidad de la matriz inmunosensora

Para comprobar la formación reproducible del inmunosensor se llevó a cabo el monitoreo por EIE de diez inmunosensores, cada uno por duplicado, construidos con las especificaciones descritas en la metodología. Los resultados obtenidos por las impedancias se ajustaron a un circuito equivalente de Randles y se graficaron específicamente en los valores correspondientes a la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) en la cual se observaron valores similares entre ellos. La menor de las lecturas del duplicado obtuvo un valor de $R_{ct} = 402.85 \pm 23.0$ Ohms y la mayor, un valor de $R_{ct} = 466.2 \pm 17.8$ Ohms (Tabla 6). Las lecturas complementarias de las impedancias de la Tabla 6 se encuentran en el ANEXO IV.2. El conjunto de todas las R_{ct} obtenidas (Figura 33) muestra el rango de error que pudieron mostrar los inmunosensores al momento de realizar una lectura. Por lo tanto, los inmunosensores presentaron características muy parecidas entre ellos. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que se utilizaron una gran cantidad de electrodos serigrafiados de oro (AuSPEs) cada uno con características ligeramente diferentes, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. Esto podría explicar algunas de las ligeras diferencias en las impedancias entre cada inmunosensor construido.

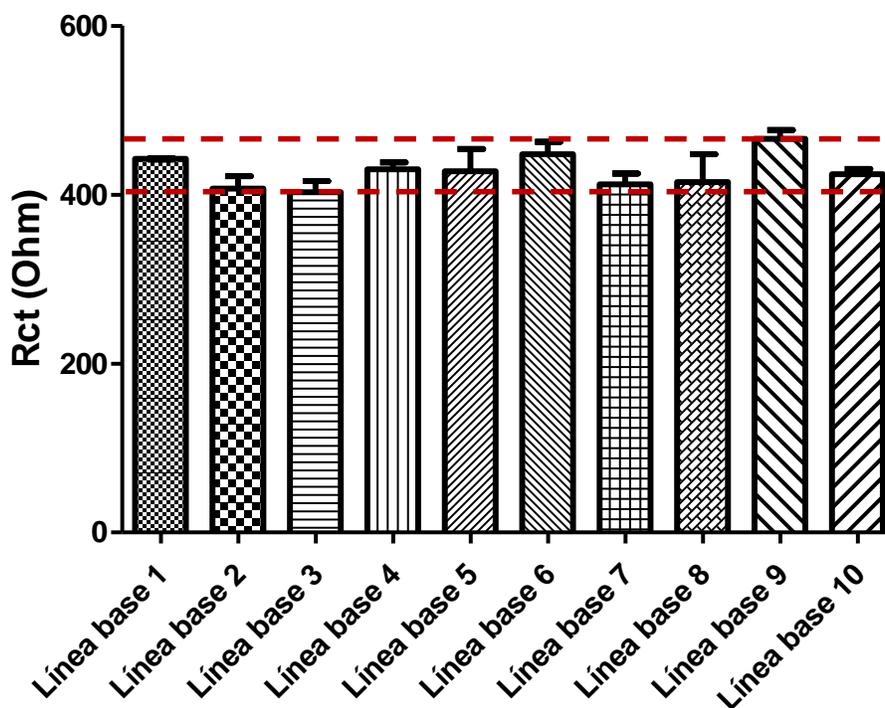


Figura 33. Respuesta reproducible del inmunosensor (línea base) ($n=10$) evaluada a partir de la resistencia a la transferencia de carga promedio de cada grupo. Los valores de impedancia se ajustaron a un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) de cada experimento. Las líneas rojas punteadas destacan las medias menor y mayor. Los datos no presentan diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0.05$). Los datos presentan \pm S.E.M.

Las lecturas por EIE de los 20 inmunosensores se realizaron bajo las mismas condiciones, esto para asegurar la reproducibilidad del método. Todos los valores obtenidos de las impedancias y ajustados al circuito equivalente de Randles como se muestran en la Tabla 6. Todos los valores (R_s , C_{dl} , R_{ct} y W_2) mantuvieron valores similares entre ellos. Las lecturas complementarias de las impedancias de la Figura 33 se encuentran en el ANEXO IV.2.1

Tabla 6. Valores de impedancia en un circuito equivalente de Randles de 10 inmunosensores. Los valores de impedancia se ajustaron a un circuito equivalente de Randles, donde, R_s es la resistencia a la solución; C_{dl} es la capacitancia de la doble capa; R_{ct} es la resistencia a la transferencia de carga y W_2 es la difusión de Warbug. El experimento se realizó por duplicado.

Muestras	R_s	C_{dl}	R_{ct}	W_2
línea base 1	24.62 ± 1.5	2.29E-06 ± 7.76E-08	442.4 ± 1.2	0.00211115 ± 2.675E-05
línea base 2	23.2 ± .1	2.30E-06 ± 1.02E-07	407.1 ± 25.8	0.00217065 ± 5.895E-05
línea base 3	22.525 ± .18	2.45E-06 ± 2.82E-08	402.85 ± 23.0	0.00214095 ± 4.565E-05
línea base 4	23.715 ± 1.24	2.33E-06 ± 8.44E-08	429.85 ± 14.5	0.00213465 ± 6.785E-05
línea base 5	23.97 ± .08	2.26E-06 ± 8.15E-09	427.7 ± 4	0.00221425 ± 0.00005955
línea base 6	24.39 ± .5	2.25E-06 ± 2.90E-09	447.8 ± 25.9	0.0020977 ± 0.000057
línea base 7	23.52 ± .32	2.32E-06 ± 1.11E-07	412.3 ± 22.1	0.00217685 ± 0.00001695
línea base 8	22.66 ± 1.55	2.39E-06 ± 9.88E-08	414.95 ± 37.3	0.0020096 ± 0.0000846
línea base 9	22.83 ± 1.58	2.37E-06 ± 7.86E-08	466.2 ± 17.8	0.00194235 ± 0.00001225
línea base 10	22.48 ± .63	2.39E-06 ± 1.17E-07	424.05 ± 11.0	0.00211915 ± 9.05E-06

10.10 Interacciones no específicas

Las lecturas obtenidas de un inmunosensor que no fue expuesto a ningún tipo de muestra dan como resultado la (línea base) descrita anteriormente, sin embargo, es importante conocer la selectividad del inmunosensor al ser expuesto a moléculas no específicas, en este caso una concentración de [10 µg/ml] de BSA y [10 µg/ml] del anticuerpo IgG cabra anti-ratón. Las muestras del analito objetivo, que es el suero sanguíneo proveniente de ratones y lechones, está compuesto principalmente por agua, además posee proteínas disueltas, hormonas, minerales y dióxido de carbono, por lo que es importante descartar la interacción que se pudiera llevar a cabo por moléculas no específicas. Aunque, como parte del desarrollo experimental presentado posteriormente se realizaron experimentos utilizando suero proveniente de animales control, es decir que no poseían los anticuerpos específicos de péptido GP5-B. Fue necesario hacer este paso previo para garantizar que fuéramos en la dirección correcta.

En los resultados obtenidos de las impedancias realizadas por triplicado, podemos observar que al exponer los inmunosensores a BSA y el anticuerpo inespecífico IgG cabra anti-ratón, no se presentaron interacciones inespecíficas. Las muestras se incubaron bajo las mismas condiciones que todas las muestras (30 min, t° ambiente). El diagrama de Nyquist de la Figura 34 muestra que no aumentaron los valores de la impedancia respecto a la línea base descrita previamente, por lo tanto, no hubo uniones inespecíficas generada por la interacción de ninguna de estas dos proteínas a pesar de que la concentración de las muestras fue alta.

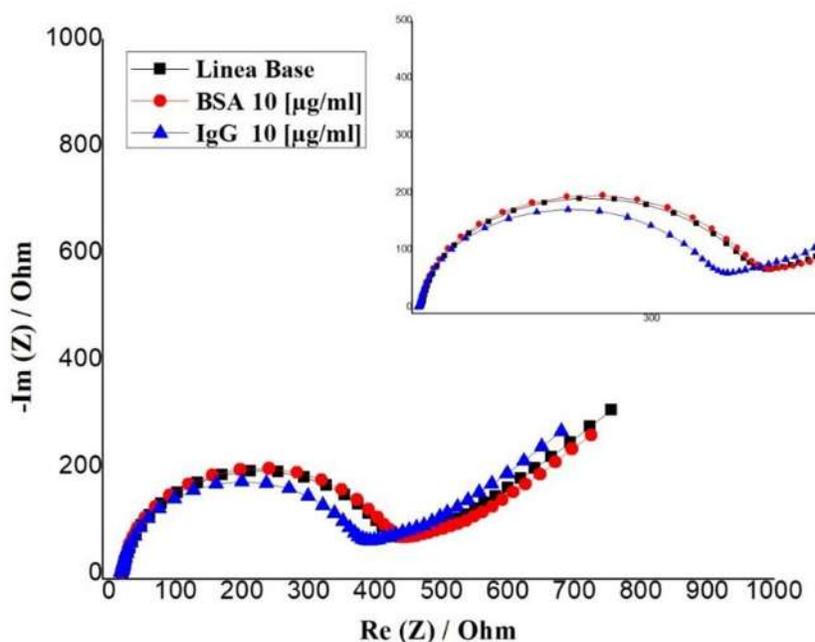


Figura 34. Diagrama Nyquist del inmunosensor (línea base) en respuesta a la interacción con proteínas inespecíficas, BSA [10 µg/ml] y de Goat anti-IgG [10 µg/ml].

De las impedancias realizadas, los valores se ajustaron a un circuito equivalente de Randles. De estos se tomaron los valores de la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) para analizar la comparación de los valores obtenidos.

Se observó una ligera disminución en la R_{ct} de ambos grupos (BSA e IgG) respecto a la línea base, que es el valor de impedancia dado por el inmunosensor y sus componentes, lo cual es una referencia ante los cambios generados por las interacciones de los distintos analitos, así como los

componentes que estos presentan. Probablemente los cambios de disminución observados están atribuidos en parte de la variación entre inmunosensores descrita anteriormente, así como de algún tipo de daño sobre la matriz del inmunosensor producto de la interacción con las moléculas no específicas durante los 30 minutos de incubación a temperatura ambiente (Figura 35). Por otro lado, tampoco se observó un aumento significativo en la resistencia a la transferencia de carga, por lo que la interacción con proteínas no específicas como la albumina de suero bovina o anticuerpos de otra naturaleza (no específicos de péptido) no son capaces de unirse ni de presentar aumentos en los valores de impedancia, que, al momento de evaluar el analito objetivo pudieran generar valores de falsos positivos.

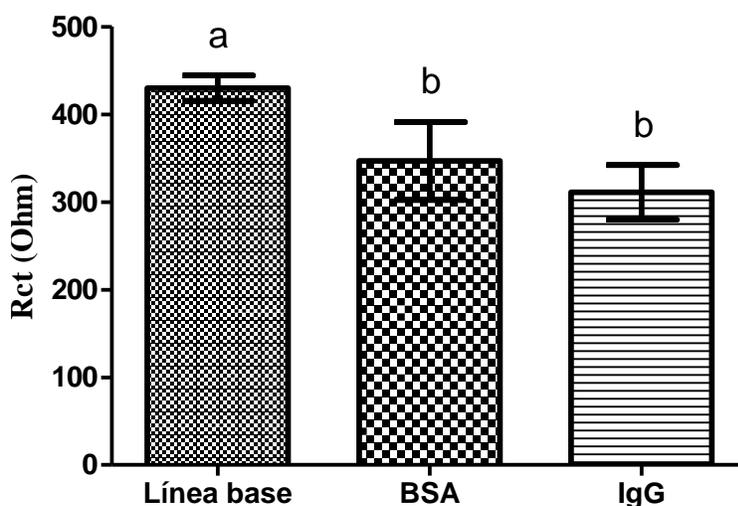


Figura 35. Respuesta del inmunosensor (Rct) a proteínas inespecíficas (n=3 por grupo), BSA [10 µg/ml] y IgG Goat anti-IgG [10 µg/ml] respecto a la línea base. Los valores de impedancia se ajustaron a un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (Rct) de cada experimento. Las letras diferentes representan diferencia significativa entre grupos con respecto a la línea base ($p < 0.05$). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Tukey, los datos presentan \pm S.E.M.

10.11 Selectividad del inmunosensor a suero sanguíneo de ratones control

La selectividad del inmunosensor se evalúa al exponer el suero de los grupos de ratones experimentales preinmunes sobre el inmunosensor durante 30 min a temperatura ambiente, todos los experimentos se realizaron por duplicado, estas muestras provienen de los grupos que no fueron inmunizados con el péptido GP5-B y que por lo tanto no poseen anticuerpos específicos contra el péptido. Los grupos estuvieron conformados por una n=5 cada uno; el grupo control, (suero de animales sin inmunizar), grupo pre-inmune (conformado por muestras de suero de ratón tomadas

el día 0 antes de ser inmunizados con el péptido GP5-B) y grupo control BSA conformado por muestras de suero tomadas el día 45 de animales inmunizados solamente con el acarreador BSA (equimolar con el conjugado peptídico). Para estos experimentos. Los espectros de impedancia electroquímica (Figura 36), muestran los cambios en las impedancias resistencias generada después de la incubación con las diferentes muestras. Los resultados demostraron que este valor no aumento significativamente para ninguno de los grupos control, por lo que la interacción entre los anticuerpos presentes en el suero de los diferentes grupos control además de las diferentes proteínas y moléculas presentes comúnmente en los sueros sanguíneos de mamíferos, no interfirieron en la lectura. Las lecturas complementarias de las impedancias de la Figura 36 se encuentran en el ANEXO IV.3.

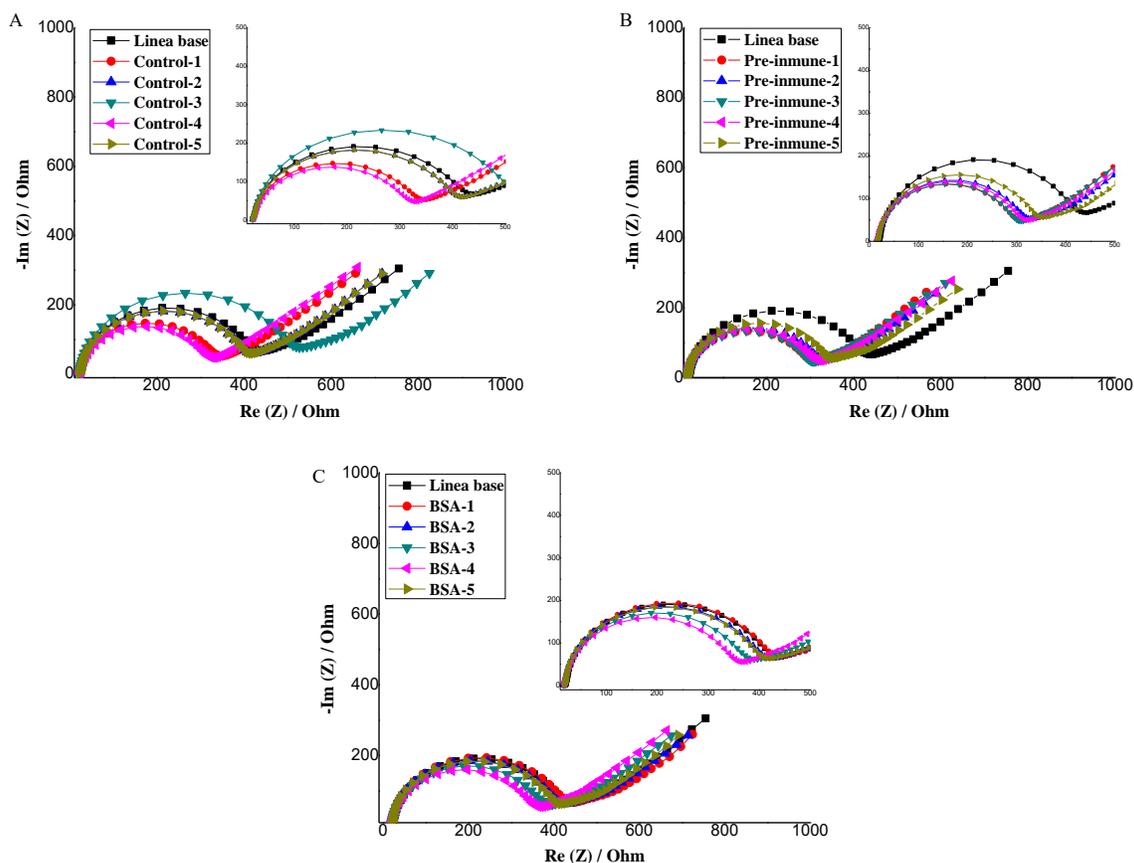


Figura 36. Impedancias de inmunosensores en respuesta a 3 grupos(n=5), suero sanguíneo; Control, BSA y pre-inmune. A, diagrama de Nyquist de las respuestas del inmunosensor (línea base) para el grupo control. B, diagrama de Nyquist de la respuesta del inmunosensor para el grupo pre-inmune. C, diagrama de Nyquist de las respuestas del inmunosensor para el grupo BSA.

Los valores de las impedancias se ajustaron a un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (Rct) de cada experimento comparando entre los grupos y contra la línea base. Los resultados obtenidos para los 3 grupos control no fueron significativos (Figura 37). En los tres grupos comparando los valores con la línea base, no se encontró un aumento en los valores de impedancia, de la misma forma que sucedió con las moléculas inespecíficas IgG y BSA (capítulo 10.10), además de que tuvieron un comportamiento similar, generando un descenso de los valores de impedancia contra la línea base. Es importante tomar en cuenta que para el grupo control BSA utilizados se evaluaron previamente los anticuerpos totales por el método de referencia (ELISA) y se observó un aumento en la concentración de anticuerpos totales, sin embargo, presentó el mismo comportamiento que con los análisis de los grupos control y pre-inmune lo cual demuestra la capacidad para distinguir individuos verdaderos negativos lo que demuestra la especificidad del inmunosensor. La especificidad es la capacidad de indicar los casos negativos como negativos. Por lo tanto, la especificidad del inmunosensor ante estos análisis control fue demostrada ya que la presencia de sueros sanguíneos negativos (sin anticuerpos específicos de péptido) no mostró interferencia significativa.

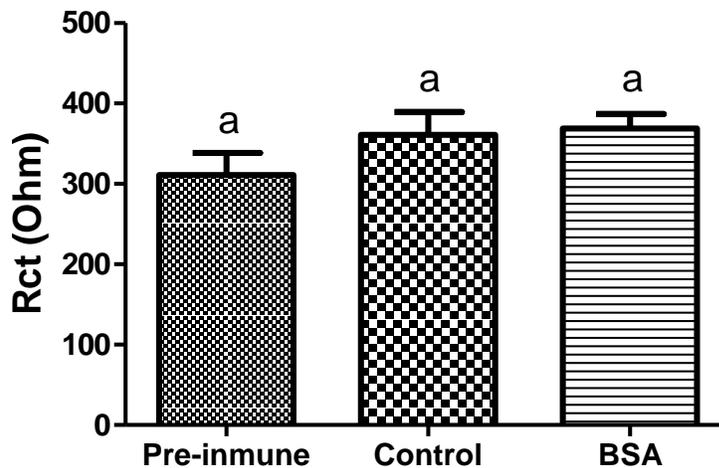


Figura 37. Respuesta del inmunosensor (Rct) de 3 grupos (n=5), suero sanguíneo; Control, BSA y pre-inmune. Los valores de impedancia se ajustaron a un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (Rct) de cada experimento. La comparación con letras sobre la barra se utilizó para identificar diferencias entre grupos con respecto al grupo pre-inmune. No se observaron diferencias significativas entre grupos. ANOVA de una vía, prueba post hoc de Tukey, los datos presentan \pm S.E.M.

10.12 Detección de anticuerpos anti GP5-B en muestras de ratones inmunizados

La prueba del inmunosensor fue aplicado para la detección de anticuerpos anti GP5-B en muestras de suero sanguíneo de animales inmunizados de dos grupos diferentes ($n=5$ por grupo); ratones inmunizados con el péptido GP5-B unido a la proteína acarreadora BSA (BSA-GP5-B) y ratones inmunizados con el péptido GP5-B unido al acarreador PEG (PEG-GP5-B). En la Figura 38, se observan las impedancias realizadas para caracterizar los resultados de las interacciones entre el elemento de reconocimiento (GP5-B) y los anticuerpos anti-GP5-B presentes en suero de los ratones inmunizado. El suero de los grupos PEG-GP5-B y BSA-GP5-B fue evaluado previamente por el método de referencia (ELISA) para la detección de IgG total, así como para la detección de anticuerpos específicos anti-GP5-B mostrando la presencia y concentración de estos anticuerpos. Una vez que estas muestras interactuaron con el inmunosensor incubando durante 30 min a temperatura ambiente y posterior mente realizando la caracterización por las técnicas electroquímicas EIE y VC se observaron comportamientos diferentes a los encontrados en los grupos control. Para las impedancias se obtuvieron aumentos significativos respecto a la línea base para ambos grupos, así como para todos los individuos experimentales. Las lecturas complementarias de las impedancias de la Figura 38 se encuentran en el ANEXO IV.4

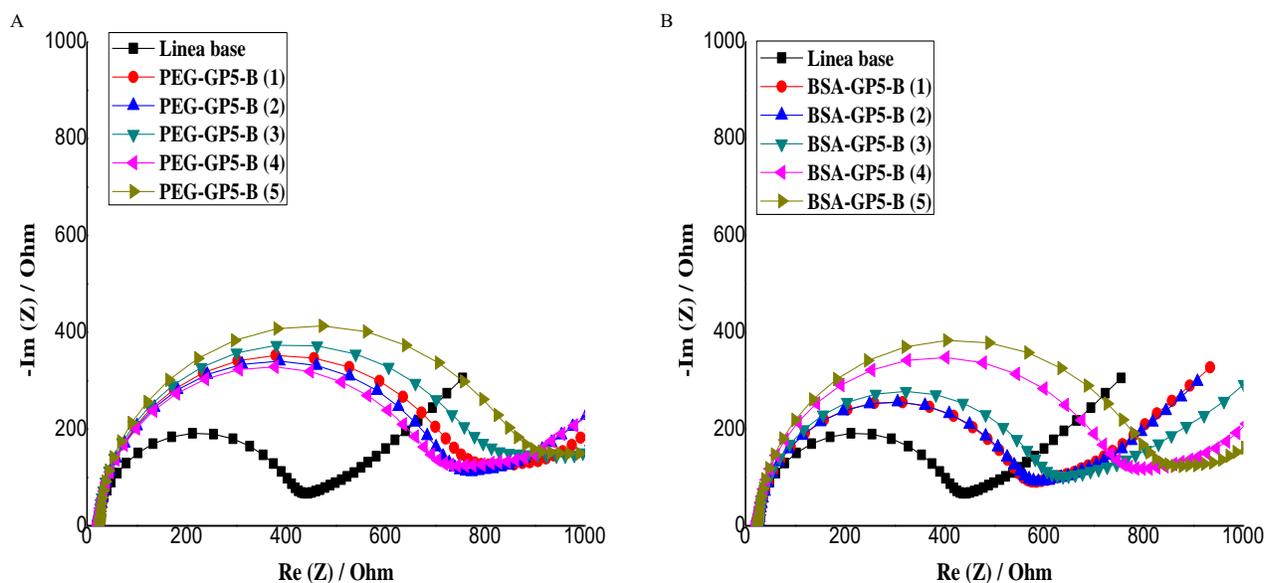


Figura 38. Impedancias de inmunosensores en respuesta a 2 grupos experimentales ($n=5$), sueros sanguíneos; PEG-GP5-B y BSA-GP5-B. A, diagrama de Nyquist de la respuesta del inmunosensor (línea base) para el grupo PEG-GP5-B. B, diagrama de Nyquist de la respuesta del inmunosensor (línea base) para el grupo BSA-GP5-B.

Los valores de impedancia se ajustaron a un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (Rct) de cada experimento respecto a la línea base como se muestra en la Figura 39 donde se agruparon los datos comparando los valores (Ohm) de cada individuo de cada grupo (control, BSA, pre-inmune, PEG-GP5-B, BSA-GP5-B) respecto a la línea base, representada por la línea roja punteada. En la gráfica se puede observar cómo los grupos control se diferencian completamente de los resultados obtenidos para los grupos experimentales lo que demuestra la interacción que ocurre entre los anticuerpos presentes en las muestras de los grupos experimentales aumentando significativamente la resistencia a la transferencia de carga.

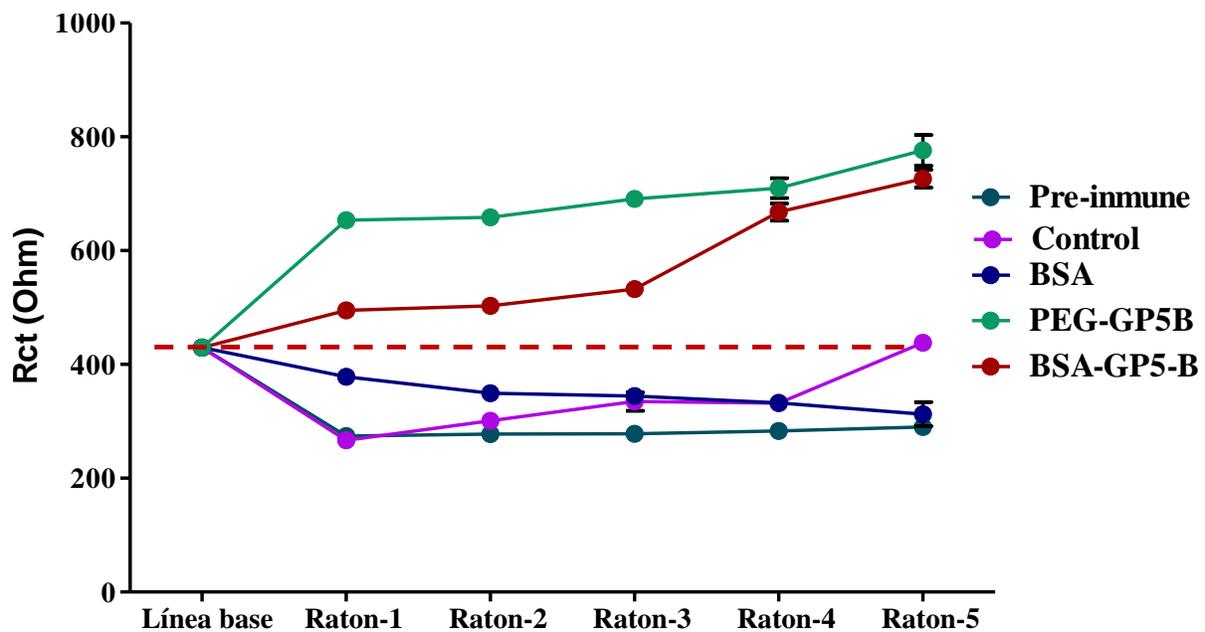


Figura 39. Respuesta del inmunosensor (Rct) de 5 grupos (n=5), suero sanguíneo; Control, BSA, Pre-inmune, PEG-GP5-B y BSA-GP5-B. Los valores de impedancia se ajustaron a un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (Rct) de cada experimento respecto a la línea base. Los datos presentan \pm S.E.M.

Analizando los resultados tomando como indicador la resistencia a la transferencia de carga de los cinco grupos, observamos que los valores (Ohm) para los grupos experimentales (PEG-GP5-B y BSA-GP5-B) contra los grupos control pre-inmune y BSA (todos validados por el método ELISA) los grupos con anticuerpos, mostraron una clara diferencia contra los controles, por lo que se demuestra que el inmunosensor además de tener una alta especificidad (capacidad de distinguir muestras negativas como verdaderas negativas) también posee una alta sensibilidad (capacidad de

distinguir muestras positivas como verdaderas positivas) además de esto, en los resultado es posible observar los diferentes niveles de anticuerpos presentes en las muestras de los grupos PEG-GP5-B y BSA-GP5-B donde para el grupo PEG-GP5-B se observaron valores mayores de anticuerpos anti-GP5-B, como se observó también en el método ELISA. Comparando los resultados con el método ELISA se obtuvieron similitudes en los resultados obtenidos respecto a la concentración de anticuerpos presentes en las muestras, por los que se comprueba la capacidad del inmunosensor de detectar anticuerpos anti-GP5-B a diferentes concentraciones, esto a pesar de que todos los resultados fueron superiores a los grupos control como se observa en la Figura 40. Estos resultados también apuntan a una capacidad del inmunosensor de, además de ser un posible método cualitativo para la detección de anticuerpos específicos, también podría ser un posible método cualitativo, lo cual podría ser una ventaja aun mayor, ya que al poder estimar los niveles de anticuerpos presentes en el analito se puede relacionar con algunos otros aspectos importantes como las etapas de infección que generaron estos anticuerpos y así poder tomar decisiones más oportunas respecto al tratamiento aplicable. Esto puede además de mejorar y aumentar la calidad de los diagnósticos, representar un ahorro de recursos.

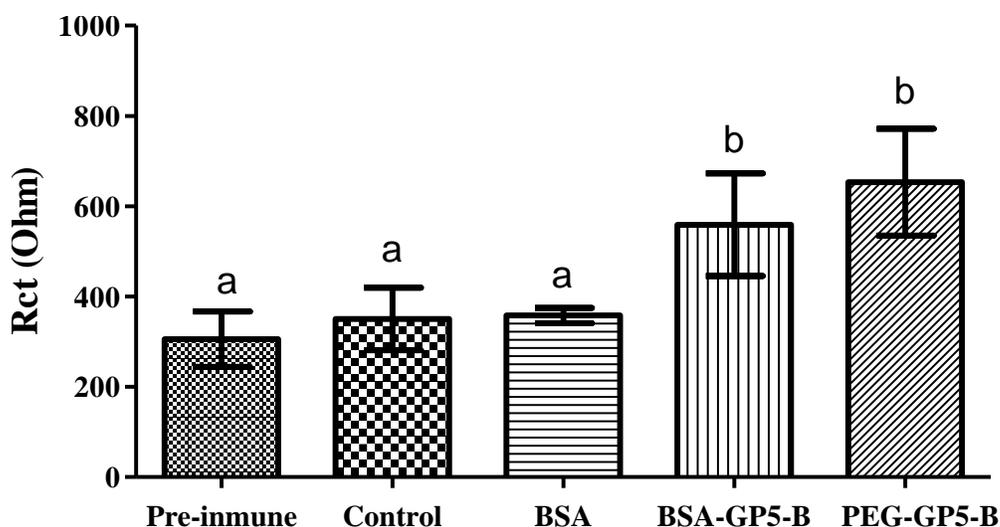


Figura 40. Respuesta del inmunosensor (Rct) de 5 grupos (n=5). Suero sanguíneo; Pre-immune, Control, BSA, PEG-GP5-B y BSA-GP5-B. Los valores de impedancia se ajustaron a un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (Rct) de cada experimento. Las letras diferentes representan diferencia significativa entre los grupos experimentales con respecto a los grupos pre-immune, control y BSA ($p < 0.05$). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Tukey, los datos presentan \pm S.E.M.

10.13 Respuesta lineal del inmunosensor a diferentes concentraciones de anticuerpos anti-GP5-B

Una vez caracterizadas las respuestas del inmunosensor de los cinco grupos control y experimental, se tomó una de las muestras del grupo (PEG-GP5-B) con una concentración

conocida de anticuerpos anti-GP5-B evaluados por el método de referencia ELISA. De esta forma se diluyo la muestra en diferentes concentraciones (6.3, 13.0, 19.4, 26.1, 32.9 y 39.6 [ng/ml]) para caracterizar las respuestas correspondientes a cada concentración evaluados por EIE y VC. En la Figura 41 A se muestra los resultados de la Voltametría cíclica en un voltamperograma donde se comparan los resultados respecto a la línea base, observamos que para cada concentración que interactúa con el inmunosensor provocan cambios tanto en Epc y Epa, así como en la diferencia de ambos picos, lo que se relaciona con la cantidad de anticuerpos unidos sobre la superficie. Para la evaluación que se llevó a cabo por espectroscopia de impedancia electroquímica respecto a la línea base (Figura 41 B) se observó un cambio creciente de los resultados de impedancia conforme fueron aumentando las concentraciones de anticuerpos anti-GP5-B. Las lecturas complementarias de las impedancias de la Figura 41 se encuentran en el ANEXO IV.5.

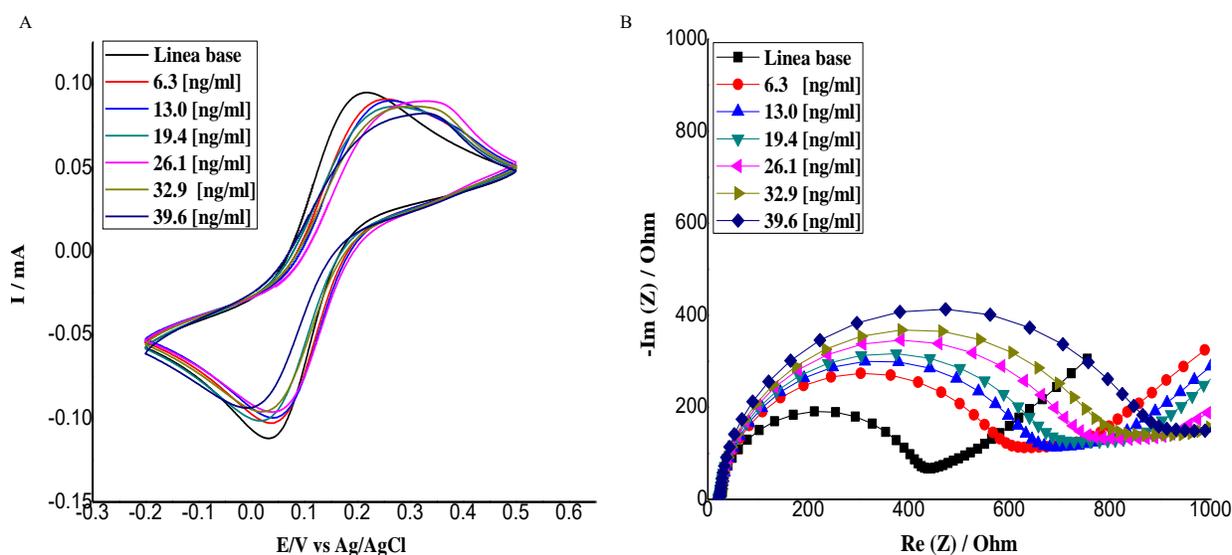


Figura 41. Respuesta lineal del inmunosensor a diferentes concentraciones de anticuerpos anti-GP5-B medidos por VC y EIE. A, Voltamperograma de la respuesta lineal del inmunosensor a diferentes concentraciones de anticuerpo anti-GP5-B. B, Diagrama de Nyquist de la respuesta lineal del inmunosensor a diferentes concentraciones de anticuerpo anti-GP5-B.

Se puede observar también que el área entre la línea base y la concentración más baja de 6.3 ng/ml aun es considerable por lo que podría ser posible evaluar concentraciones aun menores de anticuerpos, así como el aumento sobre la concentración superior a 36.6 ng/ml. Por otro lado, el comportamiento de las impedancias hacia las diferentes concentraciones es uniforme por que se realizó además un análisis de linealidad de los datos como se muestra en la Figura 42, esto para

ambas técnicas electroquímicas. En la figura 42 A se muestra la relación lineal entre concentración de anticuerpos específicos y la diferencia de picos ΔE_p . En el caso de las impedancias los valores se ajustaron a un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) de cada experimento para posteriormente hacer la correlación de este dato. La resistencia a la transferencia de carga, mostro una correlación de $r^2 = 0.94$ y $r^2 = 0.95$ para las Voltametría (Figura 42B). Por lo tanto, la linealidad en ambos métodos de lectura para el gradiente de concentraciones comprueba la capacidad cuantitativa del inmunosensor además de que con estos valores es posible estimar posibles resultados ante analitos de los cuales no se conoce la concentración de anticuerpos presente.

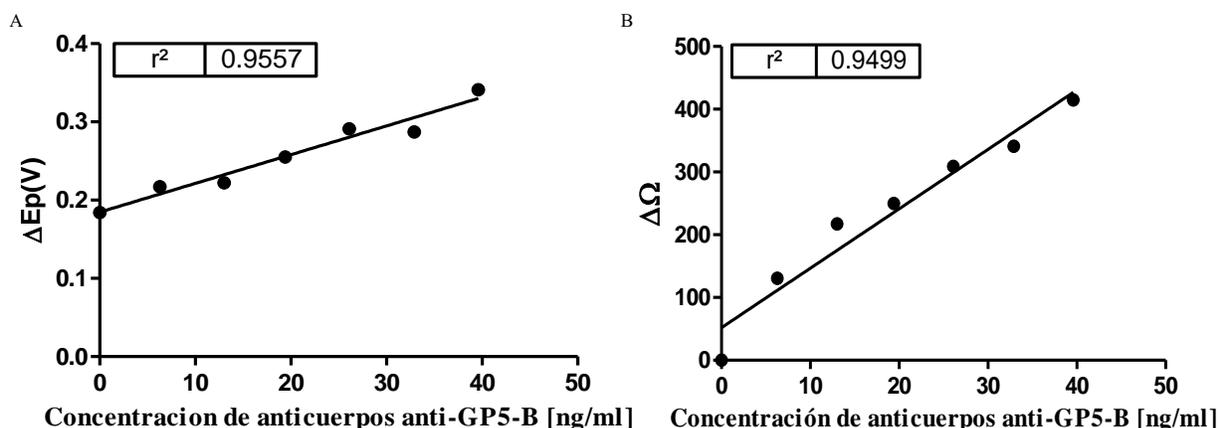


Figura 42. Relación lineal de la respuesta del inmunosensor a diferentes concentraciones de anticuerpos anti-GP5-B evaluados por VC y EIE. A, relación lineal en el ΔE_p respecto a la línea base (0 ng/ml) de la voltametría cíclica realizada en el inmunosensor a diferentes concentraciones de anticuerpo anti-GP5-B. B, relación lineal en el $\Delta \Omega$ (R_{ct}) respecto a la línea base (0 ng/ml) de la impedancia realizada en el inmunosensor a diferentes concentraciones de anticuerpo anti-GP5-B.

10.14 Detección de anticuerpos específicos anti-GP5-B en muestras de lechones infectados y no infectados por PRRSV

Se recolectaron muestras de suero de 5 lechones infectados naturalmente por el virus del PRRS, estas muestras fueron validadas por el método ELISA realizado por un tercero. En total utilizamos 5 muestras de lechones vacunados contra PRRSV. En la Figura 43 se observa el resultado de las impedancias de la interacción de los anticuerpos anti-GP5-B presentes en las muestras de los lechones naturalmente infectados. Debido al diseño del péptido que está basado en la proteína GP5 del virus del PRRS fue posible detectar anticuerpos generados por una infección natural. Estos a

su vez podrían estar relacionados a anticuerpos neutralizantes lo cual podría ser un indicador importante al momento de realizar los monitoreos en animales. El aumento en los valores de impedancia de todos los individuos fue mayor para todos los casos respecto a la línea base, por lo que se pueden agrupar en positivos a anticuerpos. Además, se observa una respuesta irregular pero positiva en las concentraciones de anticuerpos por individuo. Probablemente por los mecanismos naturales de generación de anticuerpos después del curso de una infección natural. por lo tanto, el inmunosensor también es capaz de detectar cuantitativamente anticuerpos anti-GP5-B en cerdos y no solo en ratones. Además de anticuerpos generados por la infección del virus del PRRS. Las lecturas complementarias de las impedancias de la Figura 43 se encuentran en el ANEXO IV.6.

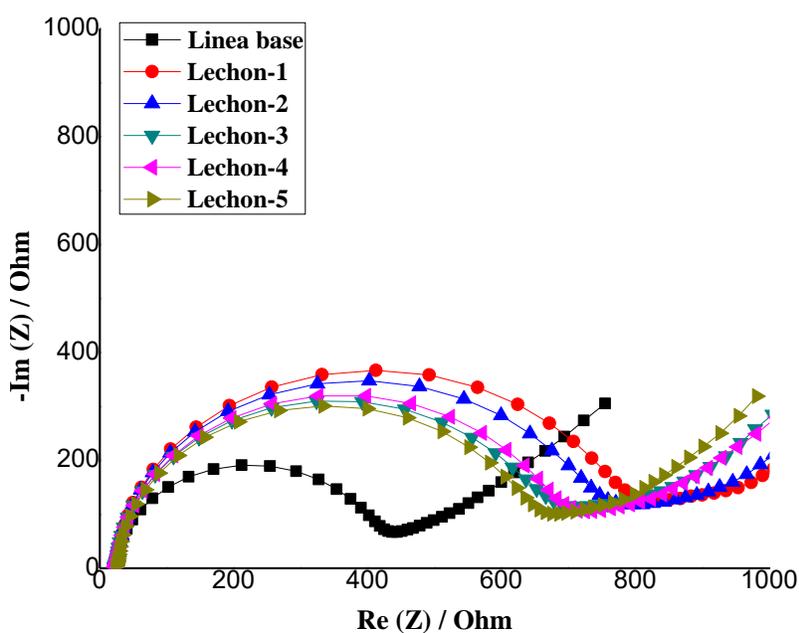


Figura 43. Diagrama Nyquist de la respuesta del inmunosensor respecto a la línea base para el grupo de lechones naturalmente infectados por el virus PRRS (n=5).

Para el grupo de los lechones vacunados cuyas muestras fueron obtenidas de una granja certificada libre de PRRSV, se tomaron un total de 5 muestras y de la misma firma que con los experimentos anteriores se pusieron a incubar por separado durante 30 min a temperatura ambiente para posteriormente realizar las caracterizaciones por EIE y VC. Los lechones vacunados contra el virus del PRRS teóricamente deben de generar una respuesta inmune y por los tantos anticuerpos contra el virus PRRS además de anticuerpos neutralizantes que son los que confieren la protección contra

la infección. En la Figura 44 se muestra el diagrama de Nyquist resultado de las impedancias para este grupo respecto a la línea base. Los 5 individuos presentaron un aumento significativo en los valores de impedancias por lo que presentaron anticuerpos anti-GP5-B además de que mostraron una relación muy estrecha entre concentraciones de individuos lo cual no paso para el grupo de los lechones naturalmente infectados. Esto puede deberse a que bajo un esquema de vacunación se aplican iguales dosis en el mismo tiempo para los lechones por lo que la generación de anticuerpos es regular entre los lechones. Por lo tanto, el inmunosensor fue capaz de detectar anticuerpos vacunales relacionados con la protección contra la infección, esto en muestras de lechones vacunados, de esta forma el inmunosensor posiblemente puede ser aplicable para corroborar la protección contra la infección del PRRSV tras la vacunación lo cual puede ser beneficioso para la industria porcina para monitorear los efectos de la vacunación.

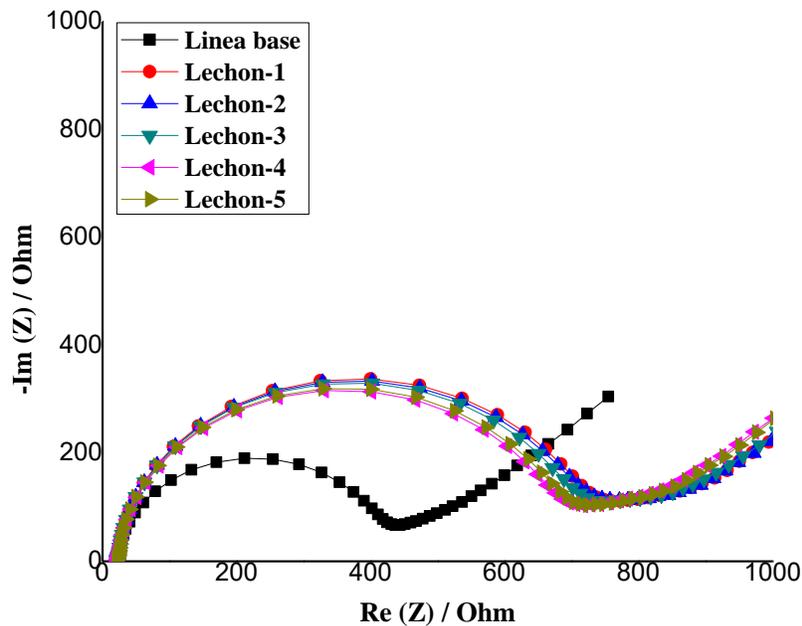


Figura 44. Diagrama Nyquist de la respuesta del inmunosensor respecto a la línea base para el grupo de lechones vacunados contra el virus PRRS (n=5).

Los valores de impedancia se ajustaron a un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) de cada experimento respecto a la línea base

representada en una línea roja punteada en la Figura 45, además se compararon cada uno de los individuos para observar el comportamiento de ambos grupos. Podemos observar en la gráfica que ambos grupos de lechones (lechones vacunados y lechones naturalmente infectados) presentaron anticuerpos específicos anti-GP5-B. Al agrupar las lecturas de los 2 grupos en comparación divididos por la línea base, podemos observar el comportamiento en la concentración de anticuerpos regular para el grupo de los lechones vacunados he irregular para el grupo de los lechones naturalmente infectados. Para los dos grupos de lechones se obtuvieron respuestas positivas con diferentes concentraciones de anticuerpos, presentaron diferencia significativa respecto al grupo control, lo que indica la presencia de anticuerpos específicos anti GP5-B. Las lecturas complementarias de las impedancias de la Figura 44 se encuentran en el ANEXO IV.7.

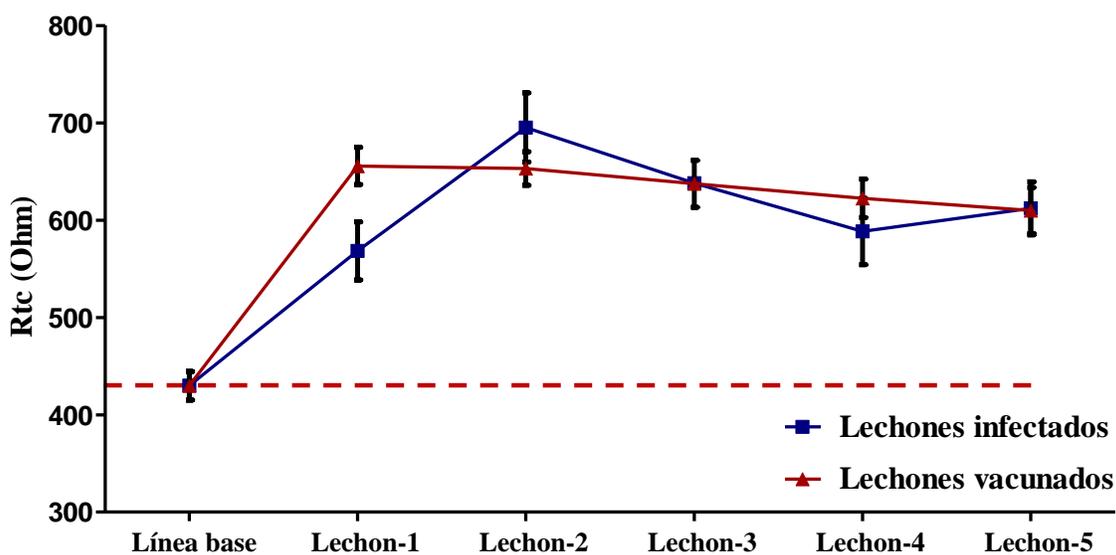


Figura 45. Respuesta del inmunosensor (Rct) de 2 grupos (n=5), suero sanguíneo de lechones naturalmente infectados con el virus PRRS y lechones vacunados contra el virus PRRS. Los valores de impedancia se ajustaron a un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (Rct) de cada experimento respecto a la línea base. Los datos presentan \pm S.E.M.

Sin embargo, ambos grupos positivos a anticuerpos no presentaron diferencia significativa entre ellos como se muestra en el análisis de la Figura 46. Por otro lado, se demostró bajo estos experimentos que el inmunosensor desarrollado no solo es capaz de realizar lecturas en el suero sanguíneo de ratones, que fue el modelo inicial para el desarrollo, sino también en cerdos que son los animales naturalmente infectados por el virus del PRRS por lo que posiblemente puede

representar una nueva herramienta para ayudar a aumentar la validez del diagnóstico del PRRSV en cerdos. Esto aunado a las ventajas que representa frente a otros métodos diagnósticos utilizados comúnmente para diagnosticar infecciones de PRRSV en granjas porcinas. Pudiendo aportar información como la concentración de anticuerpos presentes en una muestra de suero sanguíneo de lechones, lo cual se puede relacionar con el curso de una infección, además de que los anticuerpos específicos anti-GP5-B teóricamente se relacionan a la protección contra el PRRSV por la generación de anticuerpos neutralizantes observada para la proteína GP5, por otro lado al presentar los lechones vacunados anticuerpos específicos puede aportar más datos que comprueben esta relación.

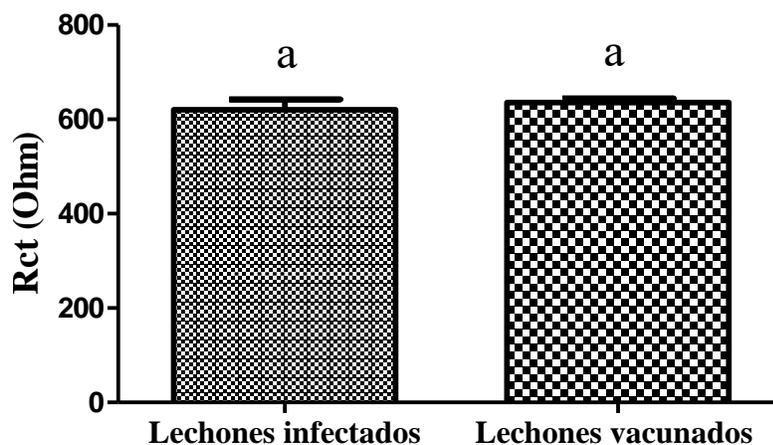


Figura 46. Respuesta del inmunosensor (Rct) de 2 grupos (n=5), suero sanguíneo de lechones naturalmente infectados con el virus PRRS y lechones vacunados contra el virus PRRS. Los valores corresponden a los ajustes en un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (Rct) de cada experimento. Las letras diferentes representan diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Tukey, los datos presentan \pm S.E.M.

10.15 Análisis de datos por curvas ROC

Para determinar la sensibilidad y especificidad de las pruebas realizadas con el inmunosensor se realizó un análisis por curva ROC de esta forma se separan valores entre negativos y positivos. Los datos fueron distribuidos en 2 columnas conformadas por el promedio de cada duplicado de los valores de resistencia a la transferencia de carga. Estos valores corresponden a los ajustes en un circuito equivalente de Randles donde se evaluó la resistencia a la transferencia de carga (Rct) de cada experimento. La columna A (Control) incluyó todas las muestras control (n=15) es decir

sin anticuerpos específicos de péptido GP5-B que son los que interactúan con el inmunosensor y las cuales presentan lecturas negativas en el método de referencia ELISA descrita anteriormente. Para la columna B se incluyeron los datos de los individuos experimentales determinados como positivos (n=15) los cuales fueron inmunizados con el péptido (PEG-GP5-B y BSA-GP5-B), los datos de muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Tabulado de los resultados de impedancias (Rtc) de los grupos control (control, BSA, pre-inmune) (n=15) y los grupos experimentales (PEG-GP5-B, BSA-GPG-B, Lechones vacunados) (n=15) para análisis de curva ROC. Los datos se ordenan en las columnas separando pruebas negativas/positivas. Con estos datos se calculó la especificidad y sensibilidad.

CONTROL	EXPERIMENTAL
266.65	494.90
301.20	503.00
334.70	532.20
331.70	667.95
438.15	726.65
274.25	653.85
277.75	658.80
277.90	691.10
282.85	709.95
289.80	776.20
378.55	655.7
349.25	653.05
344.20	637.35
332.65	622.4
312.70	609.8

Lo ideal para una prueba diagnóstica es obtener los datos de la columna B más altos que la columna A para separar positivos de negativos.

Se obtuvieron los valores de sensibilidad de la prueba que representa los individuos positivos a anticuerpos que el inmunosensor identifico correctamente como positivos. A demás de los valores de especificidad representado por la fracción de individuos sin anticuerpos que la prueba identifico correctamente como negativos como se muestra en la tabla 8. El análisis se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5® el cual calcula la sensibilidad y especificidad utilizando cada valor de cada dato como valor de corte. La grafica del análisis se muestran en la Figura 47, donde se

grafica la especificidad en % y la sensibilidad con un intervalo de confianza de 95% para posible corte entre positivo y negativo.

Tabla 8. Tabulado de los datos agrupados en resultados verdaderos positivos (VP) y falsos negativos (FN) contra verdaderos negativos (VN) y falsos positivos (FP) (n=30). Con estos datos se calculó la especificidad y sensibilidad.

	Prueba estándar positiva	Prueba estándar negativa
Prueba positiva	15	2
Prueba negativa	0	13
Sensibilidad = $VP/(VP+FN)$, Especificidad = $VN/(FP+VN)$.		

Se utilizó cada valor de la tabla 8 de datos como valor de corte para calcular la sensibilidad y especificidad. Derivado del análisis se obtuvo una sensibilidad de 100% y una especificidad de 93%. sin embargo, se debe de tomar en cuenta el número de análisis y las condiciones experimentales de los individuos para, así como el valor de “n” (número de animales) utilizada.

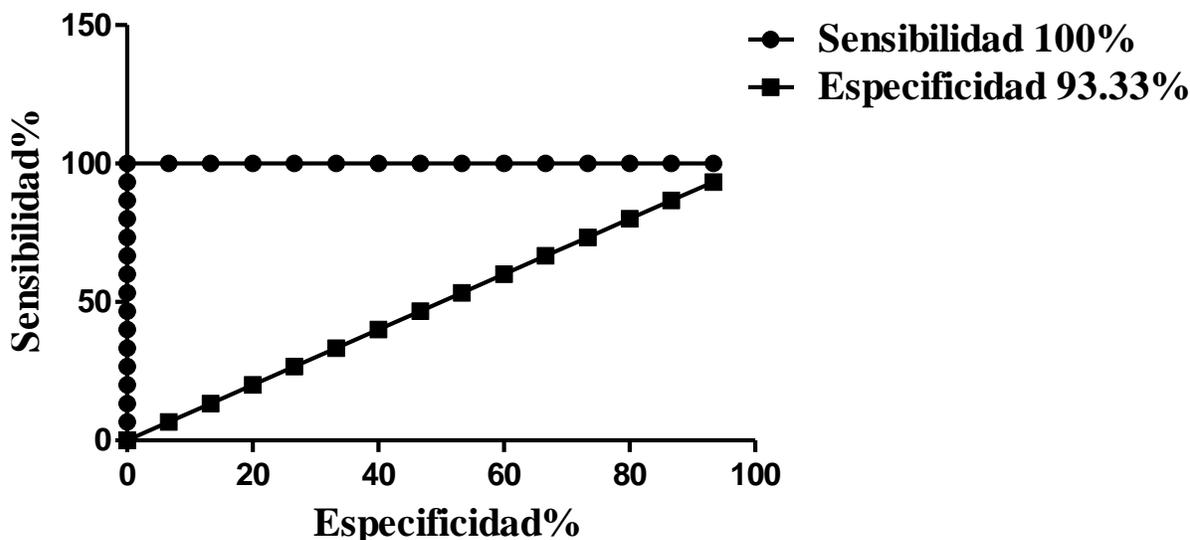


Figura 47. Curva operativa del receptor (ROC) donde se muestra el % de sensibilidad frente al % de especificidad derivado de los resultados de la Rct para los grupos control y experimental los cuales representan el 100% para cada grupo. Se muestra la etiqueta "Sensibilidad y especificidad" y el tabulado de esos valores para cada posible corte entre positivo y negativo. ($p < 0.0001$). Intervalo de confianza de 95%.

11. CONCLUSIONES

Los inmunosensores con base en electrodos de oro serigrafiados son adecuados para utilizarse en la detección de anticuerpos y cada vez aumentan los reportes de su uso como lo muestra la bibliografía publicada hasta ahora.

Para estandarizar los procesos de modificación en la superficie de los electrodos serigrafiados, se evaluaron los electrodos estándar y se demostró que fueron útiles para realizar las modificaciones para la formación de monocapas ensambladas (SAMs) para después aplicarlos en electrodos serigrafiados

Con los resultados se demostró que los electrodos serigrafiados presentan ventajas como la posibilidad de uso de pequeñas cantidades de muestra, el bajo costo en comparación con un electrodo convencional y la obtención de resultados en menos de una hora, lo que es un tiempo mucho menor que los métodos tradicionales para la detección de anticuerpos.

La calibración realizada demostró una linealidad y que puede aplicarse para concentraciones entre 6 y al menos 40 ng/ml. Lo que hace que se pueda aplicar una detección cuantitativa de anticuerpos.

Se probó que el inmunosensor es selectivo hacia anticuerpos específicos, no se presentaron interferencias considerables por proteínas inespecíficas como la albumina sérica bovina (BSA) o de anticuerpos totales presentes en las muestras de suero además se obtuvo una sensibilidad de 100% y la especificidad de 93.3%.

Por lo tanto, esta técnica es aplicable para la detección de anticuerpos específicos anti péptido GP5-B de la proteína GP5 del virus PRRS en muestras de lechones, lo que representa una herramienta útil para la detección de PRRSV y una contribución a la bioseguridad y salud animal.

12. BIBLIOGRAFÍA

Balasuriya, U. B., Patton, J. F., Rossitto, P. V., Timoney, P. J., McCollum, W. H., & Maclachlan, N. J. (1997). Neutralization determinants of laboratory strains and field isolates of equine arteritis virus: identification of four neutralization sites in the amino-terminal ectodomain of the GL envelope glycoprotein. *Virology*, 232(1), 114-128.

Baek, S. H., Kim, M. W., Park, C. Y., Choi, C. S., Kailasa, S. K., Park, J. P., & Park, T. J. (2019). Development of a rapid and sensitive electrochemical biosensor for detection of human norovirus via novel specific binding peptides. *Biosensors and Bioelectronics*, 123, 223-229.

Bard, A. J., Faulkner, L. R., Leddy, J., & Zoski, C. G. (1980). *Electrochemical methods: fundamentals and applications* (Vol. 2). New York: Wiley.

Batista L, Pijoan C, Lwamba H, Johnson CR, Murtaugh MP. (2004). Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico. *Journal of Swine Health and Production*, 12,170-174.

Cajero-Juárez, M., Sánchez-Vázquez, R., Valdéz-Alarcón, J. J., Bravo-Patiño, A., & Nuñez-Anita, R. E. (2017). Opciones vacunales contra los virus patógenos de porcinos PRRS y PCV2, un binomio frecuente. *Entreciencias: Diálogos en la Sociedad del Conocimiento*, 5(12).

Contreras Figueroa X. (2019). Conjugación de péptidos sintéticos a moléculas acarreadoras: PEG-Péptidos con actividad inmunomoduladora. Reporte técnico para obtener el grado de Ingeniería en Biotecnología UTM/ UMSNH. Morelia Michoacán México.

Costa, J. M. (1981). *Fundamentos de electródica. Cinética Electroquímica y sus Aplicaciones*, 63.

Dokland, T. (2010). La biología estructural de PRRSV. *Investigación de virus*, 154 (1-2), 86-97.

Du, T., Nan, Y., Xiao, S., Zhao, Q., & Zhou, E. M. (2017). Antiviral Strategies against PRRSV Infection. *Trends in Microbiology*, 25(12), 968–979. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.06.001>.

E.H.J. Wissink, M.V. Kroese, H.A.R. vanWijk, F.A.M. Rijsewijk, J.J. Meulenberg, P.J.M. (2005) Rottier Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions or porcine reproductive and respiratory syndrome virus J. *Virol.*, 79, pp. 12495-12506.

Garc, L. E. Z., & Garc, C. (2010). Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico. *Inmunoelectroanálisis*, 197–222. <https://doi.org/http://dx.doi.org/ES/monoranf.v0i0.1068>

Gopinath, S. C. B. (2008). Anti-coagulant aptamers. *Thrombosis research*, 122(6), 838-847.

Gopinath, S. C., & Kumar, P. K. (2014). Biomolecular discrimination analyses by surface plasmon resonance. *Analyst*, 139(11), 2678-2682.

Hajian-Tilaki, K. (2013). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Caspian journal of internal medicine*, 4(2), 627.

Hammond, SA, Cook, SJ, Lichtenstein, DL, Issel, CJ y Montelaro, RC (1997). La maduración de las respuestas inmunes celulares y humorales a la infección persistente en caballos por el virus de la anemia infecciosa equina es un proceso complejo y prolongado. *Revista de virología*, 71 (5), 3840-3852.

Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., & Gojobori, T. (2005). The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Molecular biology and evolution*, 22(4), 1024-1031.

Hu, J., Wang, T., Wang, S., Chen, M., Wang, M., Mu, L., ... & Jiang, M. (2014). Development of a surface plasmon resonance biosensing approach for the rapid detection of porcine circovirus type2 in sample solutions. *PloS one*, 9(10), e111292.

Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990.

Karimzadeh, A., Hasanzadeh, M., Shadjou, N., & de la Guardia, M. (2018). Peptide based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*.

Kaushik, A., Yndart, A., Kumar, S., Jayant, R. D., Vashist, A., Brown, A. N., ... & Nair, M. (2018). A sensitive electrochemical immunosensor for label-free detection of Zika-virus protein. *Scientific reports*, 8(1), 1-5.

Kang, X., Wang, J., Wu, H., Liu, J., Aksay, I. A., & Lin, Y. (2010). A graphene-based electrochemical sensor for sensitive detection of paracetamol. *Talanta*, 81(3), 754-759.

Knichel, M., Heiduschka, P., Beck, W., Jung, G., & Göpel, W. (1995). Utilization of a self-assembled peptide monolayer for an impedimetric immunosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 28(2), 85-94.

Knowles, J. D., Thiele, L., & Zitzler, E. (2006). A tutorial on the performance assessment of stochastic multiobjective optimizers. *TIK-report*, 214.

Kuri-Morales, P. A., Guzmán-Morales, E., De La Paz-Nicolau, E., & Salas-Fernández, A. (2015). Enfermedades emergentes y reemergentes. *Gaceta médica de México*, 151(5), 674-680.

Lakshmipriya, T., & Gopinath, S. C. (2019). An introduction to biosensors and biomolecules. In *Nanobiosensors for Biomolecular Targeting* (pp. 1-21). Elsevier.

Leva-Bueno, J., Peyman, S. A., & Millner, P. A. (2020). A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Medical microbiology and immunology*, 209(3), 343-362.

López, O. J., & Osorio, F. A. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary immunology and immunopathology*, 102(3), 155-163.

López-Heydeck, S. M., Alonso-Morales, R. A., & Mendieta-, H. (2015). Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 6(205), 69–89. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-patologia-respiratoria-318-articulo-el-lavado-broncoalveolar-un-procedimiento-X1576989511206784>

Montagnese, C., Barattini, P., Giusti, A., Balka, G., Bruno, U., Bossis, I., ... & Varriale, A. (2019). A diagnostic device for in-situ detection of swine viral diseases: The SWINOSTICS project. *Sensors*, 19(2), 407.

Montaner-Torbes, S., del Portillo, H. A., Montoya, M., & Fraile, L. (2019). Key gaps in the knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV). *Frontiers in veterinary science*, 6.

Music, N., & Gagnon, C. A. (2010). The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 11(2), 135–163. <https://doi.org/10.1017/S1466252310000034>

Music, N., Gagnon, C. A., Du, T., Nan, Y., Xiao, S., Zhao, Q., ... Garc, C. (2010). Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). *Revisión Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Inmunoelectroanalysis*, 25(12), 968–979. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.06.001>

Na Ayudhya, S. N., Assavacheep, P., & Thanawongnuwech, R. (2012). One World–One Health: the threat of emerging swine diseases. an Asian perspective. *Transboundary and emerging diseases*, 59, 9 17.

Nathues, H., Alarcón, P., Rushton, J., Jolie, R., Fiebig, K., Jiménez, M., ... y Nathues, C. (2017). Costo del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino a nivel de granja individual: un modelo de enfermedad económica. *Medicina veterinaria preventiva*, 142, 16-29.

Neethirajan, S. (2017). Recent advances in wearable sensors for animal health management. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 12, 15-29.

Pagano, M., & Gauvreau, K. (2018). *Principles of biostatistics*. Chapman and Hall/CRC.

Pérez- Duran F. (2020) Evaluación de la respuesta inmune contra subunidades proteicas del virus PRRS en un modelo murino. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas UMSNH. Morelia Michoacán México.

Perry, B.; Sones, K. (2019). Dinámica global de la enfermedad del ganado en el último cuarto de siglo: impulsores, impactos e implicaciones; Documento de antecedentes para el SOFA 2009; FAO: Roma, Italia, 2009.

Popescu, L. N., Tribble, B. R., Chen, N., & Rowland, R. R. (2017). GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) as a target for homologous and broadly neutralizing antibodies. *Veterinary microbiology*, 209, 90-96.

Sadik, O. A., Xu, H., Gheorghiu, E., Andreescu, D., Balut, C., Gheorghiu, M., & Bratu, D. (2002). Differential impedance spectroscopy for monitoring protein immobilization and antibody-antigen reactions. *Analytical Chemistry*, 74(13), 3142–3150. <https://doi.org/10.1021/ac0156722>

UNICEF. (2008). *Contributing to one world, one health. A strategic framework for reducing risks of infectious diseases at the animal-human-ecosystems interface*.

Valencia, D. P., Dantas, L. M. F., Lara, A., García, J., Rivera, Z., Rosas, J., & Bertotti, M. (2016). Development of a bio-electrochemical immunosensor based on the immobilization of SPINNTKPHEAR peptide derived from HPV-L1 protein on a gold electrode surface. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 770, 50-55.

Thaa, B., Sinhadri, B. C., Tiesch, C., Krause, E., & Veit, M. (2013). Signal peptide cleavage from GP5 of PRRSV: a minor fraction of molecules retains the decoy epitope, a presumed molecular cause for viral persistence. *PloS one*, 8(6), e65548.

Xu, Q., & Davis, J. J. (2014). The diagnostic utility of electrochemical impedance. *Electroanalysis*, 26(6), 1249-1258.

Yan, F., & Sadik, O. A. (2003). Enzyme-Modulated Cleavage of dsDNA for Supramolecular 7 Design of Biosensors the serial assembly was first achieved by linearizing enzyme. This was followed by a bisulfite-catalyzed trans-, 73(21), 6121–6129.

13. ANEXOS

ANEXO I

ANEXO I. 1

Encuesta aplicada a la granja de Dolores Hidalgo donde se obtuvieron las muestras sanguíneas de lechones vacunados contra PRRSV.

Datos de la granja

Nombre de la granja: _____

Ubicación: Dolores Hidalgo _____

Teléfono: _____ e-mail: _____ Fecha: 4/03/2019

¿Tiene algún certificado de salud y cuál?
Si, Certificado de Buenas Prácticas Pecuarias en Granjas Porcícolas

¿Tiene algún comité de Bioética para el manejo y cuidado de los animales?
No

¿Tiene algún certificado específico de ética animal?
No

¿Qué pruebas hacen para garantizar que la granja está libre de PCV2 y PRRSV?
PCR

¿Tiene sistema de vacunación y cuales vacunas se aplican?
Si

Que punción se utilizara para la toma de muestra
Yugular

Que raza son los cerdos, linaje, línea o especie y si tienen algún estatus de modificación genética
Híbridos Large White con Pietrain

¿Qué salud tienen los animales y que estatus inmune tienen, vacunas o medicación?
muy buena salud, sanos, vacunados si

¿A qué hora del día fue la toma de muestra?
1:00 - 2:38 pm

¿Dónde fue la toma de muestra (corral, laboratorio)?
corral

Qué tipo de granja es (crecimiento o reproducción) Reproducción

Nivel de tecnificación Bajo Medio Alto, tiene: sistema de drenaje, automatización del alimento, automatización del agua, forma de limpieza del suelo: utensilios de escoba y mangera

¿Tiene medidas de bioseguridad el recinto? ¿Cuales?
Si

Tipo de jaulas para los cerdos (pared, rejilla)
Rejilla de pvc cerrado

ANEXO I.2

Certificado de buenas prácticas pecuarias otorgado a la granja Dolores Hidalgo donde se obtuvieron las muestras sanguíneas de lechones vacunados contra PRRSV.



"Con fundamento en los artículos 113, 115, 118 y 119 de la Ley Federal de Sanidad Animal, artículos 7 y 13 de su Reglamento y en cumplimiento de las disposiciones establecidas en el manual de "Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en la Producción de Granjas Porcícolas", se expide el presente certificado con clave OMECEGA-003-PD-11-19-155 para la persona moral denominada Agroalimentos la Concepción, S.A. de C.V., con domicilio fiscal en: Av. Padre Hidalgo No. 410-3, Santa Ana Pacueco, Mpio. Pénjamo, Guanajuato, C.P. 36910; conforme las facultades conferidas por el SENASICA para la certificación de las Buenas Prácticas Pecuarias mediante la aprobación No. OC-120816-09-BPP-003.

Asimismo, hago de su conocimiento que será sujeto de visitas de verificación e inspección oficial, con la finalidad de constatar el cumplimiento de las disposiciones aplicables en materia de Buenas Prácticas Pecuarias"



ANEXO II

ANEXO II.1

Encuesta realizada a la granja ubicada en Álvaro Obregón, donde se obtuvieron las muestras sanguíneas para los lechones infectados naturalmente por el virus del PRRS.

Datos de la granja

Nombre de la granja: _____

Ubicación: Álvaro Obregón _____

Teléfono: _____ e-mail: _____

¿Tiene algún certificado de salud y cuál?
No

¿Tiene algún certificado o norma para el manejo y cuidado de los animales?
No

¿Tiene algún certificado específico de ética animal? (comité de bioética)
No

¿Qué pruebas hacen para garantizar que la granja está libre de PCV2 y PRRSV?
Ninguna

¿Tiene sistema de vacunación y cuáles vacunas se aplican?
No, sólo se aplica Bacterion mixto porcino (E.coli, P.multocida, S.thalerensis)

¿Qué punción se utilizará para la toma de muestra?
Punción en arteria Yugular

¿Qué raza son los cerdos, linaje, línea o especie y si tienen algún estatus de modificación genética?
Hembras Landrace/York y machos Pietrain

¿Qué salud tienen los animales y que estatus inmune tienen, vacunas o medicación?
Malas salud, estatus inmune enfermos, vacunación predetección y posterior sólo bacterioso porcino, medicación Ketoprofeno.
9am - 12pm

¿Dónde fue la toma de muestra (corral, laboratorio)?
corral

¿Qué tipo de granja es (crecimiento o reproducción) crecimiento y reproducción

Nivel de tecnificación: Bajo Medio Alto, tiene: sistema de drenaje, automatización del alimento, automatización del agua, forma de limpieza del suelo: a mano con pala y agua

¿Tiene medidas de bioseguridad el recinto? ¿Cuáles?
No

Tipo de jaulas para los cerdos (pared, rejilla)
Pared para los cerdos en crecimiento y rejilla para los de predetección e inicio

ANEXO III

ANEXO III. 1

Resultado de los análisis enviados a un laboratorio tercero autorizado para la identificación de PRRSV en las muestras de los lechones naturalmente infectados.

FF-CMZC-REV-05-18 Rev 1



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ZOOTECNIA DE CERDOS

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO



Reporte de caso MZC: 20-006
Fecha de ingreso: 14.01.2020
Identificación:

Especie: Porcino
Muestra: 12 sueros

Propietario: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Procedencia: Tarímbaro, Michoacán
Clínico: Dra. Rosa Elvira Nuñez/ Fernando C. Rico

Lote: BIONOTE 4404PO077

Prueba de ELISA para PRRS

Identificación	M/P	Interpretación
1 Sem 4	0.284403893	Negativo
2 Sem 4	0.318734793	Negativo
3 Sem 4	1.316301703	Positivo
4 Sem 4	1.218978102	Positivo
5 Sem 8	2.250906273	Positivo
6 Sem 8	1.99756091	Positivo
7 Sem 8	0.571776196	Positivo
8 Sem 8	1.401489854	Positivo
9 Sem 14	1.895377129	Positivo
10 Sem 14	2.394160584	Positivo
11 Sem 14	2.479318735	Positivo
12 Sem 14	2.858880779	Positivo

Muestras < 0.4 Negativas
Muestras > 0.4 Positivas

ATENTAMENTE

Vo.Bo.

MC. Rosalba C. [Redacted]
Responsable

MCV. Gerardo [Redacted]
Jefe de Departamento

Este resultado ampara solo las muestras analizadas y no podrá ser modificado sin autorización del Jefe de Departamento. Se prohíbe la reproducción total o parcial de este documento.



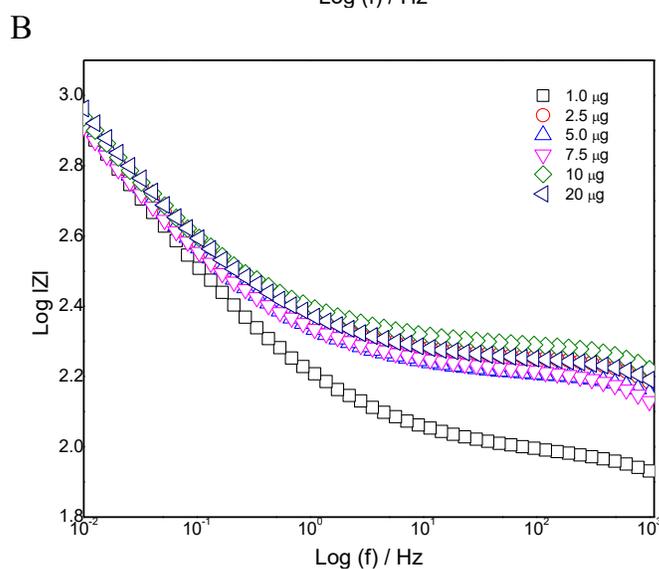
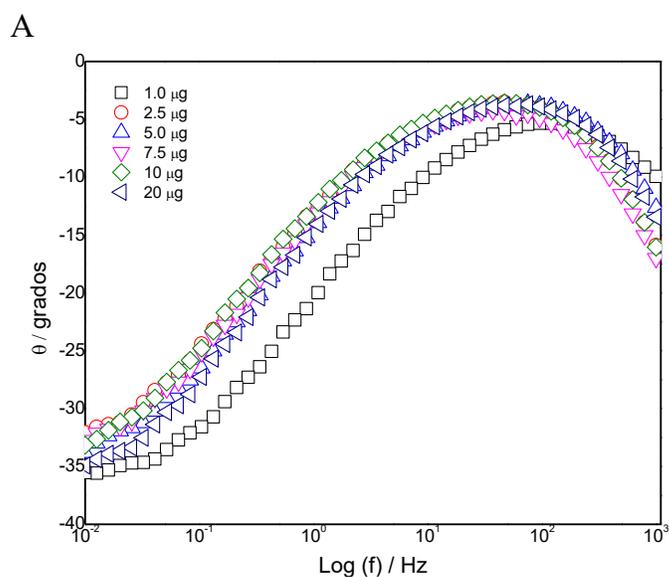
Av. Universidad 3000, Col. UNAM, C.U., Alcatla Crayacán, C.A. Méx., CP 04510.
Tel.: 01 (55) 5622 5869 al 71.

ANEXO IV

Lecturas electroquímicas complementarias.

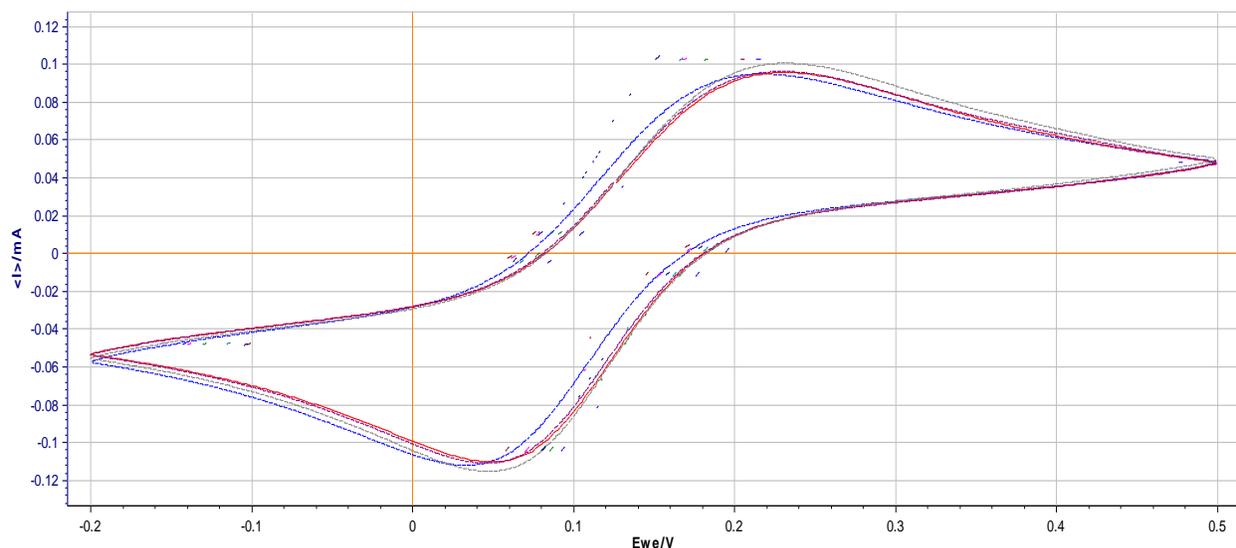
ANEXO IV. 1

Impedancias de un electrodo másico de oro y su efecto en el anclaje de diferentes concentraciones de péptido GP5-B (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20 [$\mu\text{g/ml}$]) en presencia del par redox Ferri/Ferro 5 mM. *A*, Diagrama Bode fase, presenta la respuesta de las cinco concentraciones de péptido GP5-B que fueron conjugadas bajo las mismas condiciones. *B*, Diagrama de Bode módulo presenta la respuesta de las cinco concentraciones de péptido GP5-B que fueron conjugadas bajo las mismas condiciones.



ANEXO IV. 2

Voltametría cíclica de la respuesta reproducible del inmunosensor (línea base) (n=20). El voltamperograma muestra la evaluación de 20 inmunosensores inmerso en el par Ferri/Ferro 5 mM a velocidad de barrido de 0.05 V/s.



ANEXO IV. 2.1

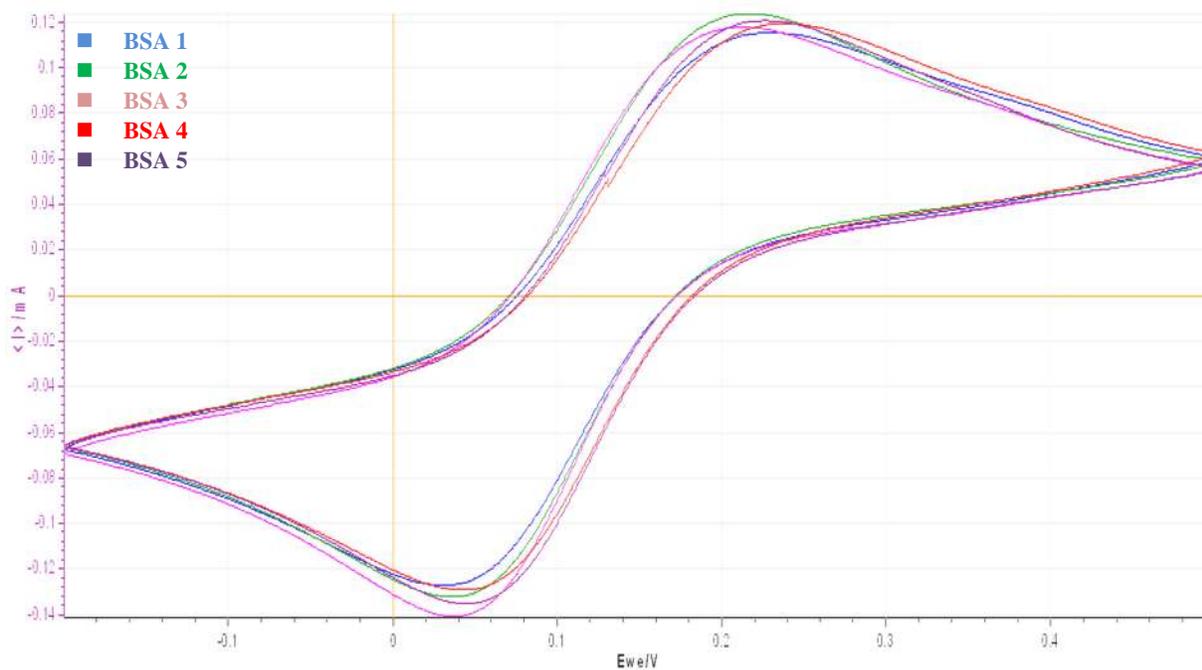
Tabla con los datos de la respuesta reproducible del inmunosensor (línea base) (n=20) evaluados por EIE. Los valores de impedancia se ajustaron a un circuito equivalente de Randles, donde, R_s es la resistencia a la solución; C_{dl} es la capacitancia de la doble capa; R_{ct} es la resistencia a la transferencia de carga y W_2 es la difusión de Warburg.

Muestras	R_s	C_{dl}	R_{ct}	W_2	χ^2
línea Base 1	26.12	2.21E-06	441.2	0.0020844	0.003
línea Base 2	23.1	2.20E-06	381.3	0.0022296	0.0025
línea Base 3	22.34	2.48E-06	379.8	0.0020953	0.0027
línea Base 4	24.96	2.24E-06	444.4	0.0020668	0.0027
línea Base 5	24.05	2.27E-06	381.7	0.0022738	0.0023
línea Base 6	24.89	2.25E-06	421.9	0.0020407	0.003
línea Base 7	23.2	2.43E-06	390.2	0.0021938	0.0027
línea Base 8	21.11	2.48E-06	357.6	0.0020942	0.003
línea Base 9	21.25	2.45E-06	448.4	0.0019546	0.0026
línea Base 10	23.11	2.50E-06	413	0.0021282	0.0027
línea Base 11	23.12	2.36E-06	443.6	0.0021379	0.0027
línea Base 12	23.3	2.40E-06	432.9	0.0021117	0.0032

línea Base 13	22.71	2.42E-06	425.9	0.0021866	0.0027
línea Base 14	22.47	2.41E-06	415.3	0.0022025	0.0029
línea Base 15	23.89	2.26E-06	473.7	0.0021547	0.0029
línea Base 16	23.89	2.26E-06	473.7	0.0021547	0.0029
línea Base 17	23.84	2.21E-06	434.4	0.0021599	0.0027
línea Base 18	24.21	2.29E-06	472.3	0.001925	0.0033
línea Base 19	24.41	2.30E-06	484	0.0019301	0.0027
línea Base 20	21.85	2.27E-06	435.1	0.0021101	0.0026

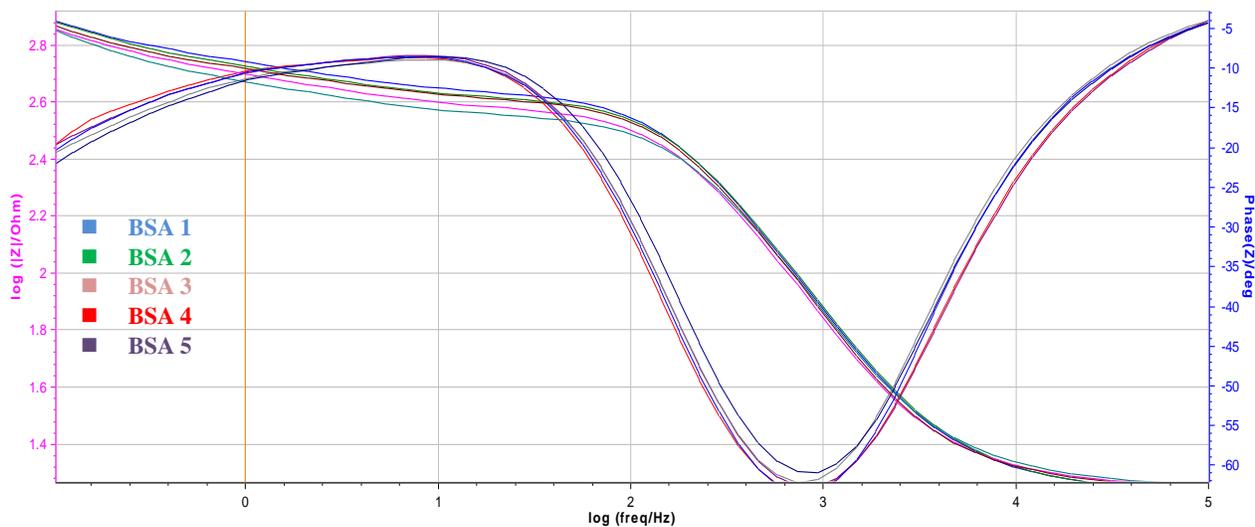
ANEXO IV. 3

Voltametría cíclica (VC) de la respuesta del inmunosensor al suero sanguíneo del grupo BSA (n=5) en presencia de par Ferri/Ferro 5 mM a velocidad de barrido de 0.05 V/s.).



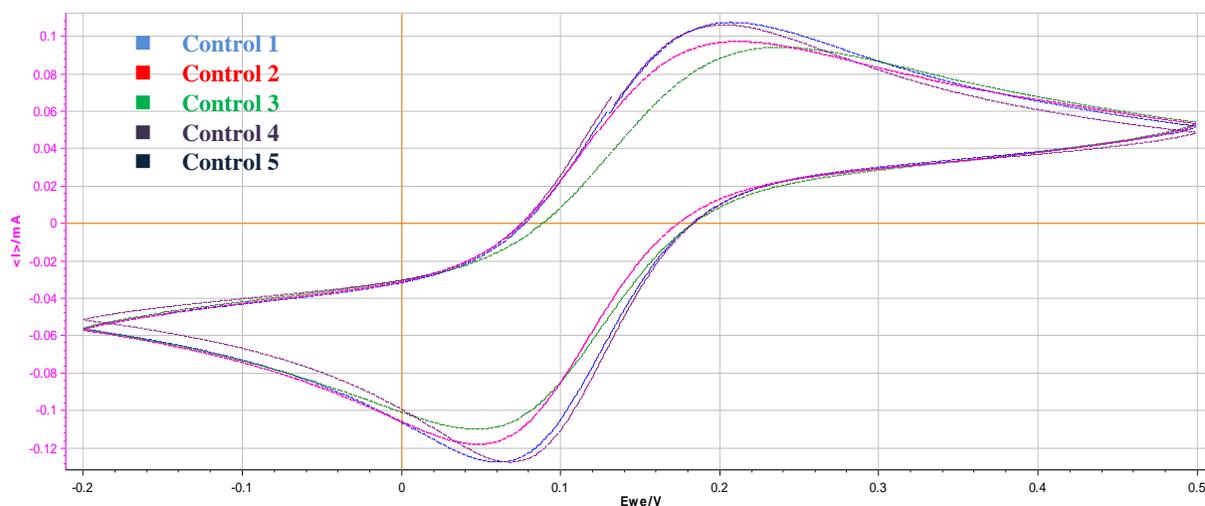
ANEXO IV. 3.1

Impedancias de la respuesta del inmunosensor a muestras de suero sanguíneo del grupo BSA (n=5) en presencia del par redox Ferri/Ferro 5 mM. Los datos se muestran en un diagrama de Bode.



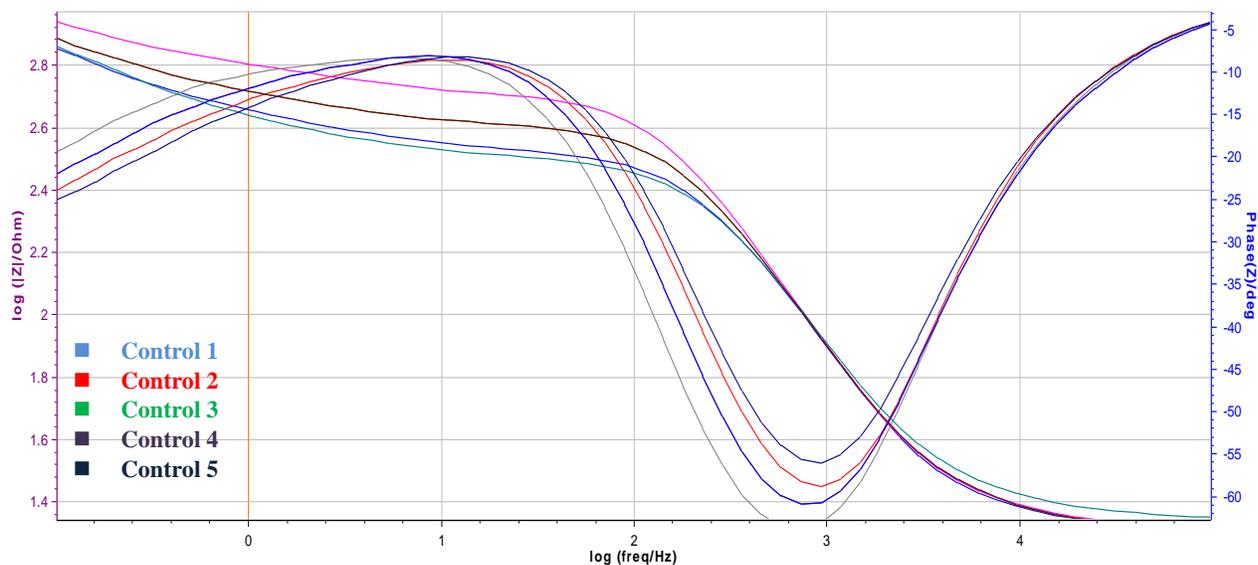
ANEXO IV. 3.2

Voltametría cíclica (VC) de la respuesta del inmunosensor al suero sanguíneo del grupo control (n=5) en presencia de par Ferri/Ferro 5 mM a velocidad de barrido de 0.05 V/s.).



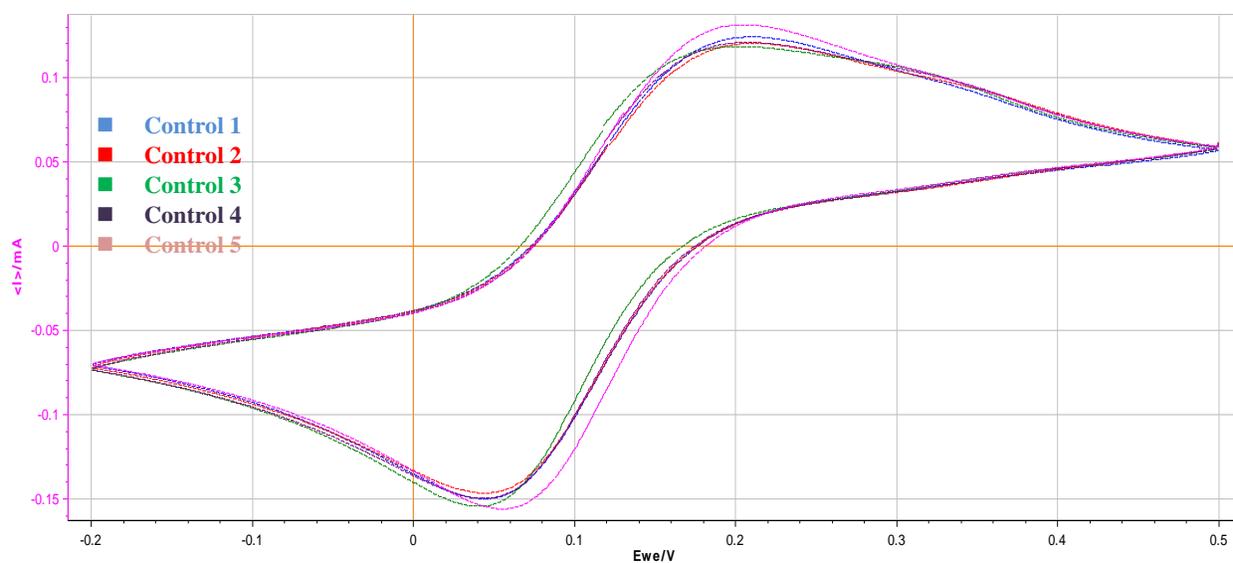
ANEXO IV. 3.3

Impedancias de la respuesta del inmunosensor a muestras de suero sanguíneo del grupo control (n=5) en presencia del par redox Ferri/Ferro 5 mM. Los datos se muestran en un diagrama de Bode.



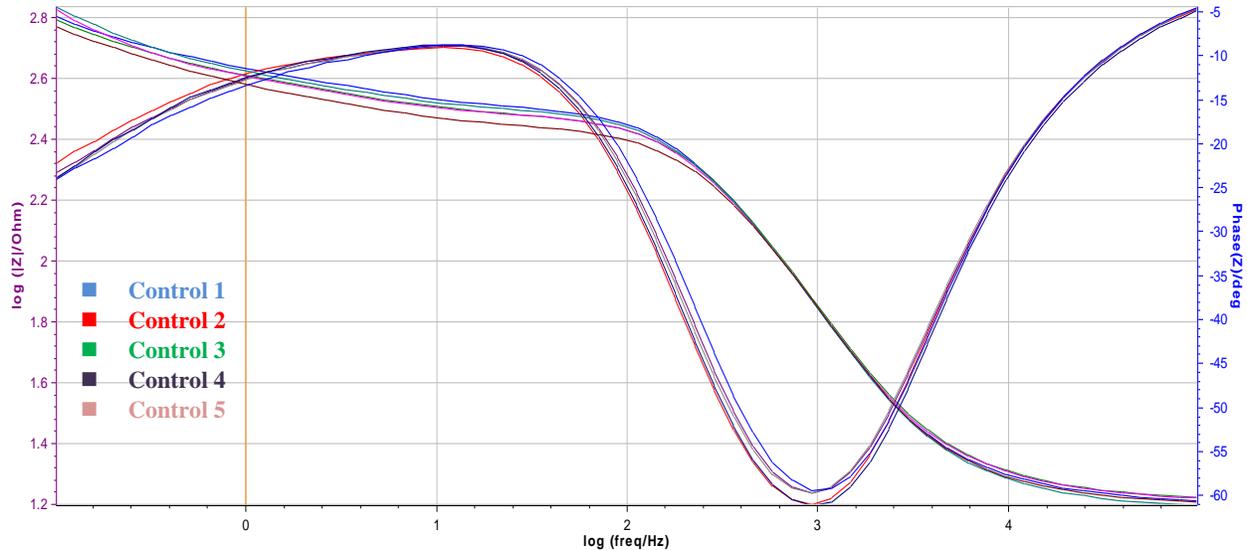
ANEXO IV. 3.4

Voltametría cíclica (VC) de la respuesta del inmunosensor al suero sanguíneo del grupo pre-immune (n=5) en presencia de par Ferri/Ferro 5 mM a velocidad de barrido de 0.05 V/s.).



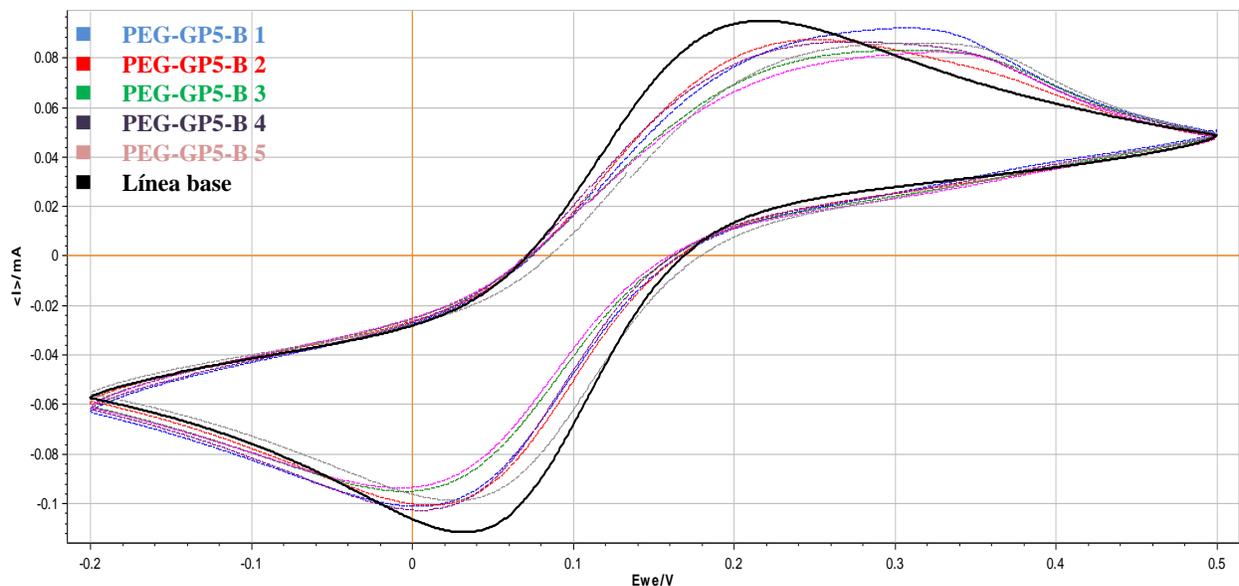
ANEXO IV. 3.5

Impedancias de la respuesta del inmunosensor a muestras de suero sanguíneo del grupo pre-immune (n=5) en presencia del par redox Ferri/Ferro 5 mM. Los datos se muestran en un diagrama de Bode.



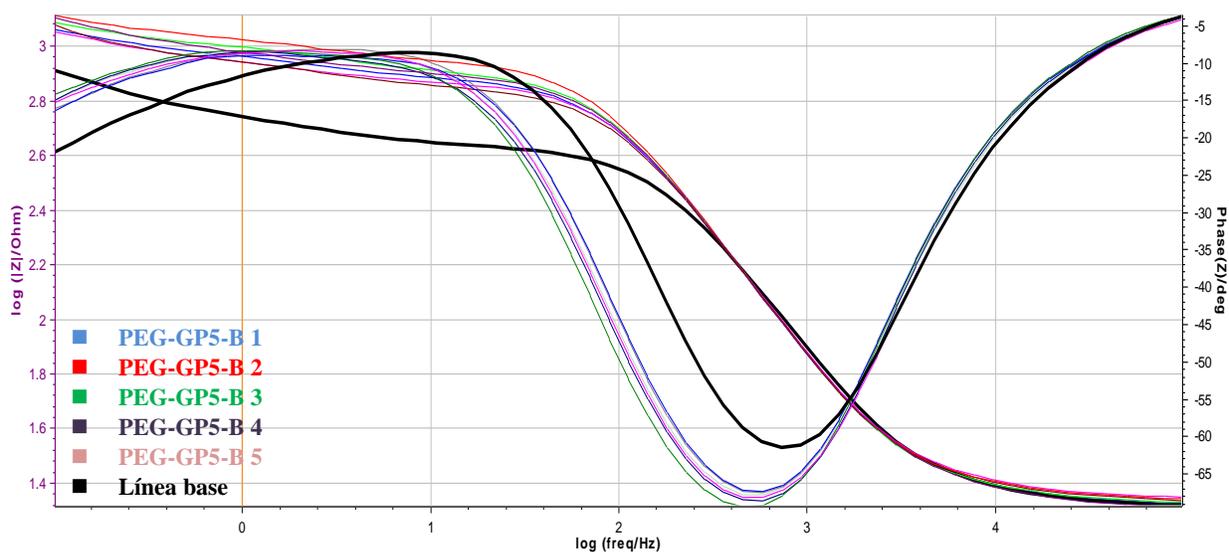
ANEXO IV. 4

Voltametría cíclica (VC) de la respuesta del inmunosensor al suero sanguíneo del grupo PEG-GP5-B (n=5) respecto a la línea base. Lecturas en presencia de par Ferri/Ferro 5 mM a velocidad de barrido de 0.05 V/s.



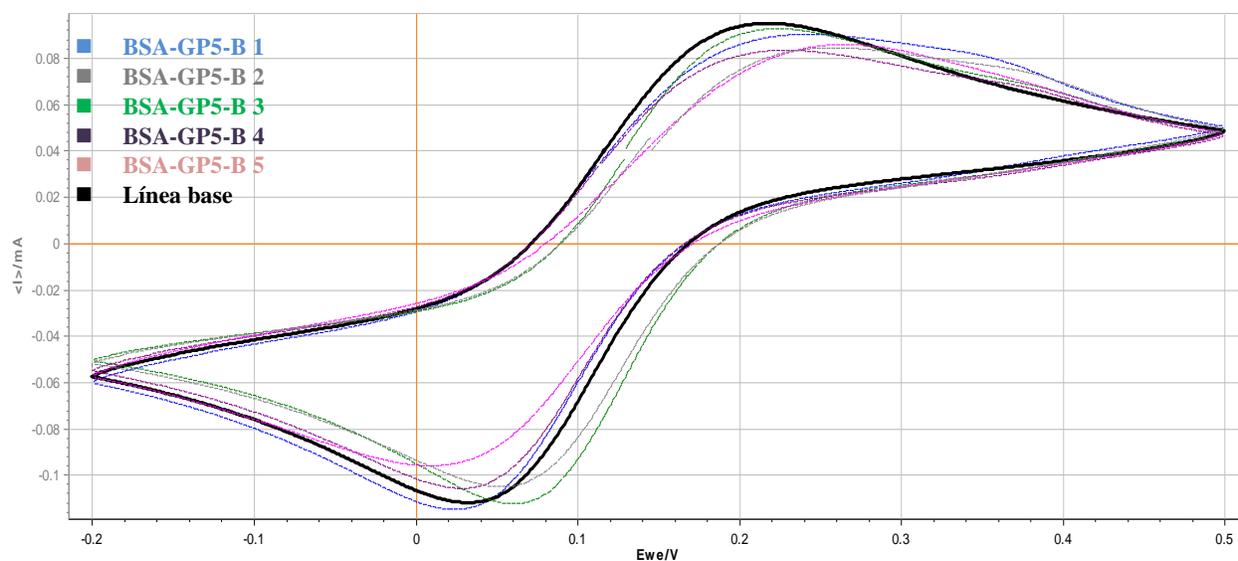
ANEXO IV. 4.1

Impedancias de la respuesta del inmunosensor a muestras de suero sanguíneo del grupo PEG-GP5-B (n=5) en presencia del par redox Ferri/Ferro 5 mM. Los datos se muestran en un diagrama de Bode.



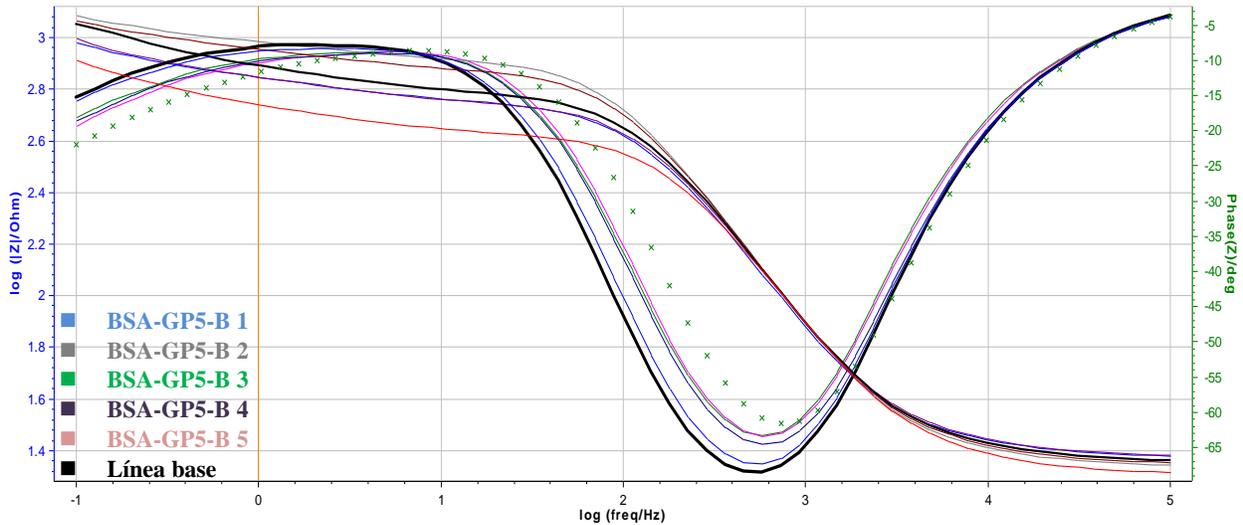
ANEXO IV. 4.2

Voltametría cíclica (VC) de la respuesta del inmunosensor al suero sanguíneo del grupo BSA-GP5-B (n=5) respecto a la línea base. Lecturas en presencia de par Ferri/Ferro 5 mM a velocidad de barrido de 0.05 V/s.



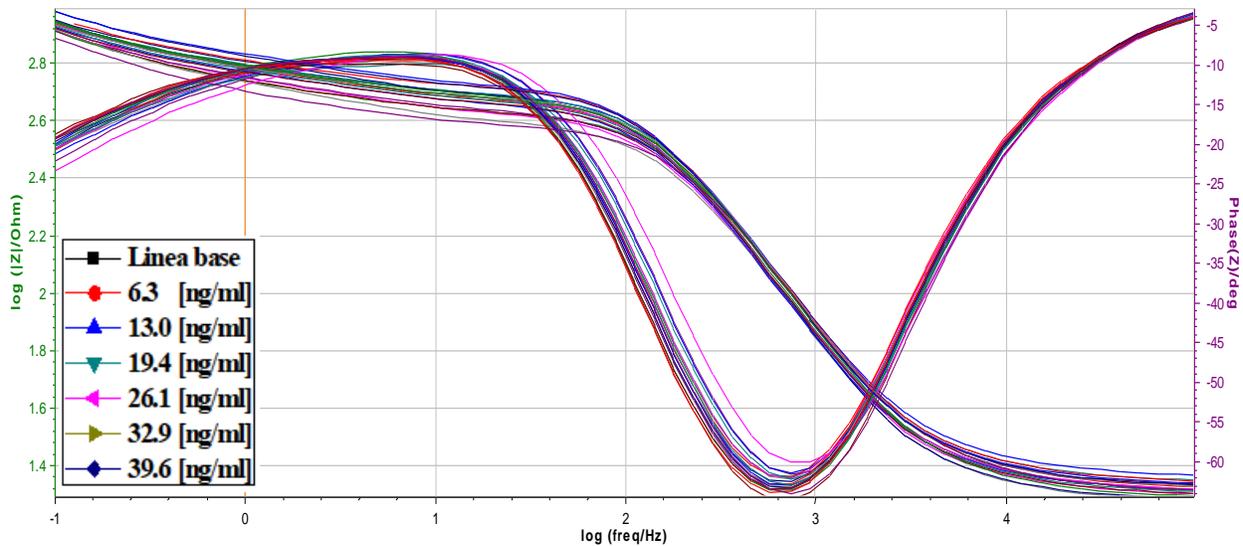
ANEXO IV. 4.3

Impedancias de la respuesta del inmunosensor a muestras de suero sanguíneo del grupo BSA-GP5-B (n=5) en presencia del par redox Ferri/Ferro 5 mM. Los datos se muestran en un diagrama de Bode.



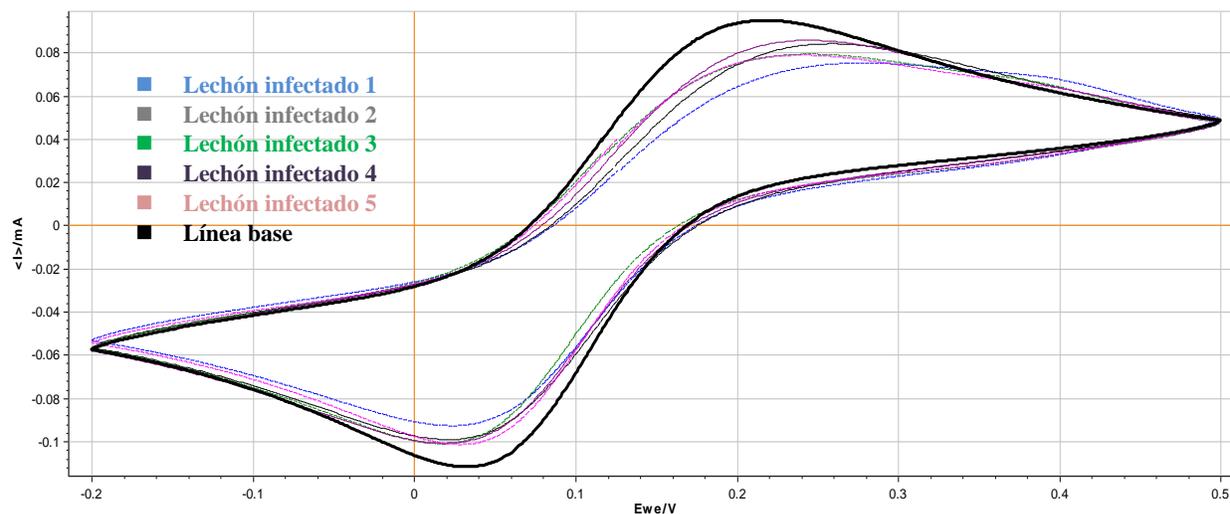
ANEXO IV. 5

Respuesta lineal del inmunosensor a diferentes concentraciones de anticuerpos anti-GP5-B evaluados por EIE. Los datos de las impedancias se presentan en un diagrama de Bode.



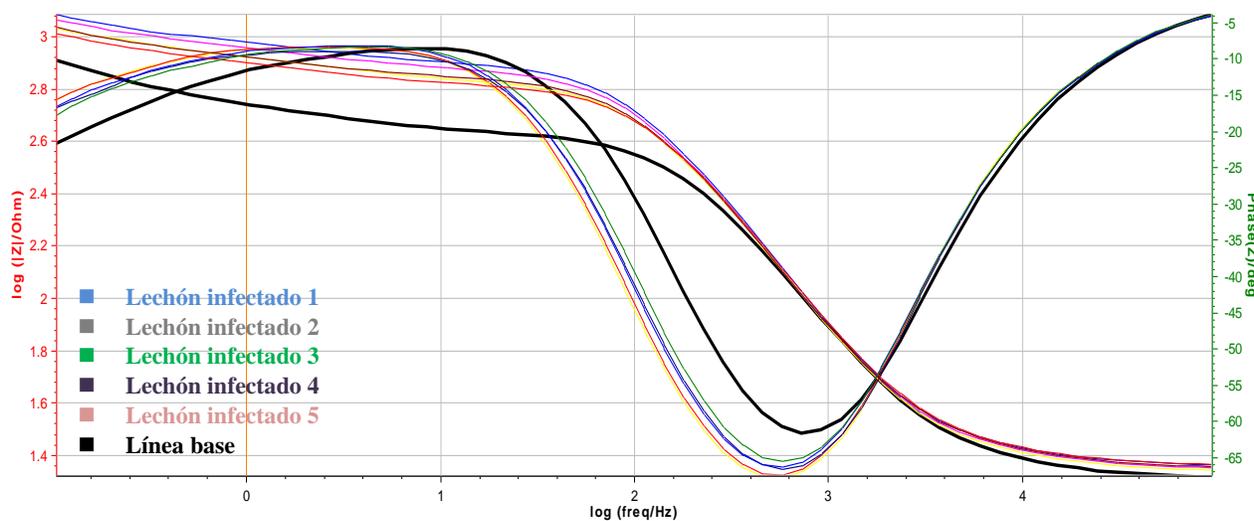
ANEXO IV. 6

Voltametría cíclica (VC) de la respuesta del inmunosensor al suero sanguíneo del grupo de lechones naturalmente infectados con el virus del PRRS (n=5) respecto a la línea base. Lecturas en presencia de par Ferri/Ferro 5 mM a velocidad de barrido de 0.05 V/s.



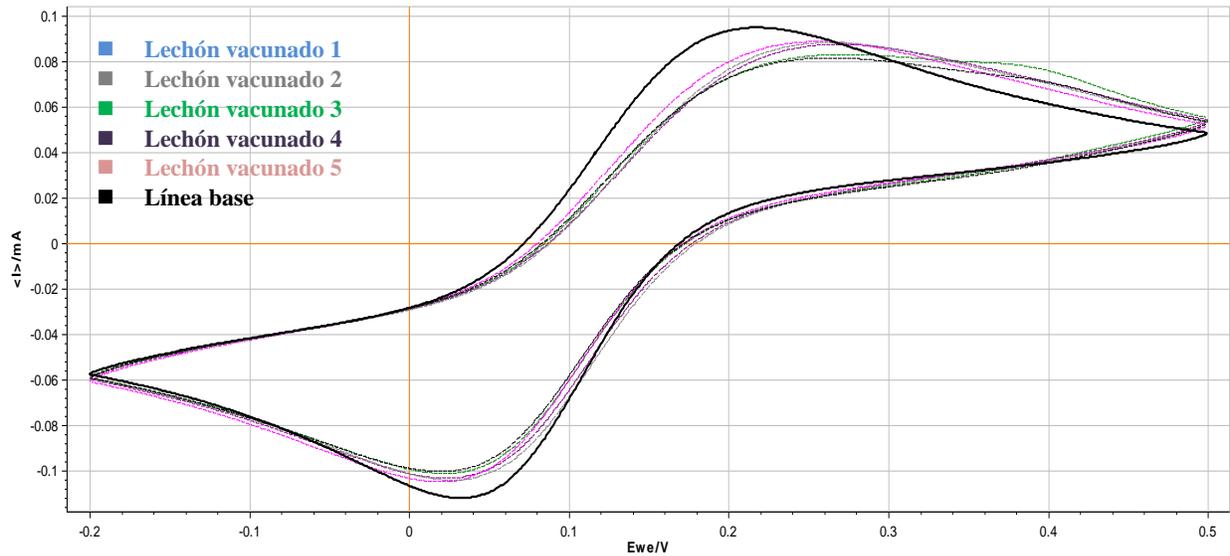
ANEXO IV. 6.1

Impedancias de la respuesta del inmunosensor a muestras de suero sanguíneo del grupo lechones naturalmente infectados con el virus del PRRS (n=5) en presencia del par redox Ferri/Ferro 5 mM. Los datos se muestran en un diagrama de Bode.



ANEXO IV. 7

Voltametría cíclica (VC) de la respuesta del inmunosensor al suero sanguíneo del grupo de lechones vacunados contra el virus del PRRS (n=5) respecto a la línea base. Lecturas en presencia de par Ferri/Ferro 5 mM a velocidad de barrido de 0.05 V/s.



ANEXO IV. 7.1

Impedancias de la respuesta del inmunosensor a muestras de suero sanguíneo del grupo lechones vacunados contra el virus del PRRS (n=5) en presencia del par redox Ferri/Ferro 5 mM. Los datos se muestran en un diagrama de Bode.

