

DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA HEMAGLUTININA 1 DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1 MEDIANTE EL DESARROLLO DE UN INMUNOBIOSENSOR ELECTROQUÍMICO

D. O. Espinosa-Lerma¹, P. C. Morales-San-Claudi^{1a*}

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Biotecnología, Ave. Universidad S/N, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza N.L. México, C.P. 66455.

*Email autor de correspondencia: pilar.moralessnc@uanl.edu.mx

Recibido 20 de marzo de 2023, Aceptado 31 de marzo de 2023

Resumen

Los virus de la influenza están compuestos por varias proteínas, como la hemaglutinina y la neuraminidasa, que el sistema inmunitario detecta como antígenos. Existen diferentes tipos de estas proteínas que se combinan entre sí dando como resultado diferentes subtipos de virus de influenza, este trabajo se enfocó en el virus de influenza A H1N1. Los biosensores son dispositivos analíticos basados en afinidad compuestos por un transductor y un elemento biológico inmovilizado se une selectivamente a la molécula que se detecta y produce una señal medible; que es recogida por un procesador. El transductor del biosensor desarrollado es un electrodo y el cambio de señal se midió por voltamperometría cíclica. La metodología consistió en la inmovilización del anticuerpo anti-H1 sobre la superficie del electrodo de trabajo de oro, para luego realizar la reacción antígeno-anticuerpo entre dicho anticuerpo y la proteína específica con H1 puro. Luego de observar que se detectó la proteína, se repitió la prueba en suero humano, para determinar si el biosensor puede discriminar entre el antígeno y otras proteínas presentes en la matriz. Los resultados indican que el biosensor desarrollado es capaz de detectar la proteína viral H1 tanto en estado puro como en una matriz compleja como el suero humano.

Palabras clave: Influenza, hemaglutinina, biosensor electroquímico, voltamperometría cíclica

1. Introducción

1.1 Virus influenza

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda causada por un virus de la familia Orthomyxoviridae el cual es capaz de causar graves pandemias que pueden resultar en una gran morbilidad y mortalidad. De acuerdo con las diferencias antigénicas en la proteína de matriz (M) y la nucleoproteína (NP), este virus se puede clasificar en tres grupos conocidos como virus de influenza A, B y C. Entre ellos, los virus tipo A son los más contagiosos y los que causan alta mortalidad en la población debido a sus variaciones antigénicas, [1] destacando la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N) que se combinan entre sí dando como resultado diferentes subtipos de virus de influenza A que se designan, entre otros, con base en los subtipos de dichas proteínas que presentan; hay diecisiete subtipos de hemaglutinina (H1, H2, H3... H17) y diez subtipos de neuraminidasa (N1, N2... N10) [2]. Este trabajo se enfoca en el virus de la influenza A H1N1.

1.2 Biosensores

1.2.1 Generalidades de los biosensores.

Un biosensor es un dispositivo para análisis compuesto por un transductor, y al menos un componente de

naturaleza biológica (por ejemplo, un anticuerpo, una enzima, etc.) que permite diferenciar el analito de la matriz de la muestra. Generalmente se basan en la afinidad, es decir, utilizan un elemento biológico inmovilizado que se une selectivamente a la molécula que se detecta, el objetivo o el analito, que generalmente es una molécula bioquímica, como una secuencia de ADN o una proteína particular (por ejemplo, un antígeno), luego, el transductor produce una señal; que es recopilada, amplificada y mostrada por un procesador de señal y se puede medir de diferentes formas dependiendo del transductor; Así, existen biosensores que miden cambios de temperatura, cambios de haces de luz, cambios de pH, cambios de parámetros electroquímicos, etc. [3, 4].

1.2.2 Biosensores electroquímicos

Son aquellos en los que el transductor es un conjunto de electrodos, generalmente se utilizan de dos a tres electrodos, un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un contraelectrodo; generalmente son de oro y plata, debido a sus excelentes propiedades eléctricas y mecánicas, y debido a su bajo costo, baja potencia y facilidad de miniaturización, y el hecho de que pueden ser utilizados para aplicaciones donde minimizar el tamaño y el costo del equipo son cruciales, como el diagnóstico de un patógeno en el punto central de atención, son uno de los biosensores más prometedores porque dependen

únicamente de la medición de corrientes y/o voltajes para detectar la unión del anticuerpo con el antígeno. [5, 6]. Estos se pueden subdividir función de cómo se realiza la medición eléctrica, incluidos los sensores voltamétricos, potenciométricos, coulométricos y de impedancia. La técnica de medida electroquímica en la que se centra este proyecto es la voltamperometría, que se basa en la relación entre la intensidad de la corriente y el voltaje aplicado a la celda. [4].

1.3 Voltamperometría.

1.3.1 Generalidades de la voltamperometría

La voltamperometría es una técnica en la que se obtiene información tanto cinética como termodinámica a partir de las curvas de intensidad-potencial (i-E). Es decir, determina directamente la velocidad a la que se produce una reacción en un electrodo (reacciones de transferencia electrónica) ya que mide la corriente (I) en cada instante; Se basan en la alteración continua del potencial que se aplica a la solución a través del electrodo, conjugado con la medida de la corriente resultante. En voltamperometría, la intensidad de la corriente se mide en función del potencial, voltaje o señal de excitación aplicada en condiciones que favorezcan la polarización del electrodo de trabajo; Se aplica un potencial a dicho electrodo de trabajo y finalmente se mide la corriente. Dicha corriente es el resultado de la electrólisis a través de una reducción u oxidación electroquímica en el electrodo de trabajo de manera que la corriente de electrólisis está limitada por la velocidad de transporte de masa de las moléculas al electrodo. [7].

Algunos de los tipos de voltamperometría más importantes incluyen la voltamperometría de barrido lineal, la voltamperometría cíclica, la voltamperometría hidrodinámica, la voltamperometría de pulso diferencial, la voltamperometría de onda cuadrada, la voltamperometría de decaído, etc. La técnica que se utilizó en este proyecto es la voltamperometría cíclica (VC).

1.3.2 Voltamperometría cíclica (VC).

En un experimento de VC, la diferencia de potencial eléctrico aplicada entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia varía linealmente entre un valor inicial (potencial inicial) y un valor límite (primer potencial de giro). En este punto, la dirección del barrido de potencial cambia hasta que el potencial vuelve al valor inicial o a un potencial diferente. Durante el barrido de potencial se registra la corriente eléctrica que circula por la celda electroquímica y que está asociada, entre otros, a procesos de reducción u oxidación que tienen lugar en el electrodo de trabajo. [5].

La celda electroquímica también incluye un contraelectrodo cuya función es asegurar que la corriente circule entre ella y el electrodo de trabajo, evitando que pase a través del electrodo de referencia y por lo tanto se

polarice debido a que su potencial debe ser constante en todo momento. [5].

El comportamiento observado en un voltamograma del par redox se debe al equilibrio de estas especies; lo cual se explica por la ecuación de Nerst que relaciona el potencial de una celda electroquímica (E) con el potencial estándar de una especie (E^0) y las actividades relativas del analito oxidado (Ox) y reducido (Red) en el sistema en equilibrio.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(Ox)}{(Red)}$$

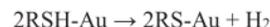
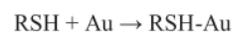
Donde R: es la constante universal de los gases, T: es la temperatura, n es el número de electrodos y F es la constante de Faraday

Esta ecuación proporciona información valiosa para predecir cómo responderá un sistema a un cambio en la concentración de especies en solución o un cambio en el potencial del electrodo [8]

1.4 Teoría del proceso

14.1 Modificación de la superficie

Las moléculas del tiol Ditiobisucínimidil Propionato (DSP) se adsorben en la superficie del oro y, gracias a las interacciones intermoleculares, forman estructuras muy organizadas en ella que se puede escribir de la siguiente manera:



En la primera etapa, las moléculas tiol (RSH) se adsorben en la superficie del Au y luego pierden el átomo de H del grupo tiol, generando el radical tiol (RS) para formar un enlace (S-Au). Esto se considera un enlace covalente. [9, 10].

DSP también es capaz de formar enlaces cruzados entre proteínas bio-catalíticas; se crean matrices complejas que permiten inmovilizar los anticuerpos sobre la superficie modificada, lo cual se logra porque el tiol contiene grupos terminales con N-hidroxi-succinimida (NHS) activo en su estructura, el grupo éster es capaz de formar enlaces amida con las aminas primarias de los anticuerpos.

De esta forma, los grupos éster terminales activos forman enlaces amida entre ellos y la región Fc de los anticuerpos, lo que permite que la región Fab (la región donde se une el antígeno) se oriente fuera de la superficie del electrodo, lo que resulta en un eficiente enlace anticuerpo-antígeno. [11, 12] Se agrega albúmina sérica bovina (BSA) para

bloquear los sitios donde el anticuerpo no se ha unido, evitando uniones inespecíficas

1.4.2 Medición de voltamperometría cíclica

La corriente se mide en el electrodo de trabajo. Para establecer el voltaje deseado entre el electrodo de trabajo y la solución, se debe hacer contacto eléctrico con la solución usando un electrodo de referencia y/o contraelectrodo. El electrodo de referencia mantiene un potencial eléctrico fijo y reproducible entre el contacto metálico y la solución, lo que permite aplicar un voltaje conocido y el contraelectrodo suministra corriente a la solución para mantener el voltaje deseado de la solución del electrodo, generalmente en retroalimentación electrónica con el electrodo de referencia monitoreando el voltaje de la solución. La solución actúa de la siguiente manera: el ferricianuro que se encuentra en la solución se acerca al electrodo de trabajo donde tiene lugar la reducción, luego el ferrocianuro se difunde en la solución. Con cada modificación realizada en la superficie del biosensor, esta transferencia cambia, lo que permite medir la voltamperometría [5, 13, 14].

La voltamperometría se utiliza para aquellas técnicas en las que el potencial se escanea en un rango de potencial establecido. La respuesta generalmente se ve en un gráfico llamado voltamograma cíclico, que es una corriente resultante (a) vs potencial (v) [15].

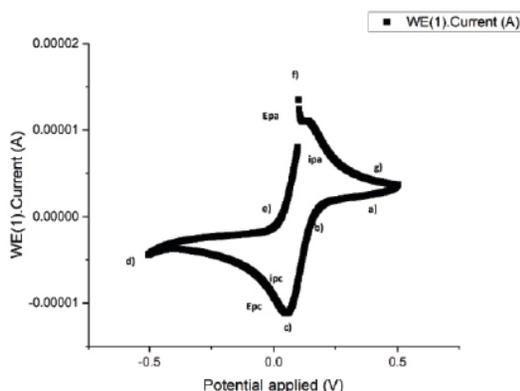


Figura 1. Voltamperograma típico de un par redox (Reducción a la izquierda y oxidación a la derecha según IUPAC). Comienza con el proceso de reducción que ocurre desde el potencial inicial (a) hasta el potencial de conmutación (b). En esta región, el potencial se explora negativamente para provocar una reducción. La corriente resultante se llama corriente catódica (ipc). El potencial correspondiente se produce en (c) y se denomina potencial catódico (Epc). El Epc se alcanza cuando se ha reducido todo el sustrato en la superficie del electrodo. Una vez que se ha alcanzado el potencial de conmutación (d), el potencial pasa positivamente de (d) a (g). Esto da como resultado una corriente anódica (ipa) y oxidación. El potencial en (f) se llama potencial anódico (Epa) y se alcanza cuando todo el sustrato en la superficie del electrodo se ha oxidado.

A partir de estos datos se pueden obtener diferentes parámetros como el potencial redox $E_0 = \frac{(E_{pa} + E_{pc})}{2}$, la relación pico-corriente $= \frac{i_{pa}}{i_{pc}}$, la diferencia de potencial $\Delta E = E_{pc} - E_{pa}$, y, por último, como el parámetro más importante en este caso, para determinar si hay diferencia en los picos de corriente de reducción (Ipc) en los voltamogramas después de modificar la superficie del electrodo $\Delta I_{pc} = I_{pc0} - I_{pc\text{muestras}}$.

3. Materiales y métodos

3.1 El biosensor

La parte del transductor del biosensor constó de una lámina de tres electrodos: un electrodo de trabajo de oro, cuyo potencial depende del potencial del analito, un electrodo de referencia de plata con potencial constante y un contraelectrodo de oro, que ayudaba a mantener constante el potencial del electrodo de referencia. [14].

3.2 Modificación superficial

3.2.1 Inmovilización de anticuerpos

La técnica de modificación de la superficie se basó en la descrita por Diouani et al 2016 [11]. El electrodo de trabajo se puso en contacto durante 1 hora a 4 ° C en cámara húmeda en una solución de acetona que contenía 1 mM de ditiobissuccinimidil propionato (DSP). Posteriormente se añadió una solución de 0.1 µg/ml de anti-H1 en buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.4. Los electrodos se incubaron durante 16 horas en cámara húmeda a 4 ° C. Los anticuerpos no inmovilizados se eliminaron mediante tres lavados con PBS y se añadió una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% (p/v) a 4 ° C. en cámara húmeda durante 1 hora. Se realizó un lavado con PBS para eliminar los excesos. Para asegurar la validez de los resultados obtenidos, se realizaron diversos controles en cada caso del proceso, que son los siguientes.

- 1: electrodo desnudo; No se agregó ningún reactivo
- 2: electrodo con DSP
- 3: electrodo con DSP y anticuerpo
- 4: electrodo con DSP, anticuerpo y BSA

De esta forma, se comprueba que efectivamente hay un cambio en la corriente cuando se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo en los ensayos.

3.2.2 Adición de antígenos.

La reacción antígeno-anticuerpo se llevó a cabo añadiendo el antígeno H1 a los electrodos a diferentes

concentraciones (0.01 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$) PBS, pH 7.4. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de un lavado con PBS, pH 7.4.

3.3 Medida de voltamperometría

Las mediciones electroquímicas de voltamperometría se realizaron poniendo los electrodos en contacto con una solución que contenía 5mM de $K_4[Fe(CN)_6]$ y 5mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ y conectándolos a un potencióstato galvanostato. Marca BAS que se controla a través de una computadora con un software llamado Nova.

Las medidas de voltamperometría se realizaron de acuerdo con las condiciones estipuladas en la tabla 1.

Los datos de voltamperometría se trazaron en un gráfico de potencial (v) frente a corriente (A) en el software Nova 2.1.2. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Tabla 1. Condiciones de medición

Parámetro	Valor
Voltaje	100 mv/s
Potencial	-0.5/0.5 v

3.4 Ensayos de muestras "reales"

El suero se obtuvo de un humano sano y se usó para preparar muestras de suero con el antígeno a las mismas concentraciones que se usaron para las pruebas con las proteínas puras. Además, se utilizó suero sin antígeno añadido como control de matriz.

La superficie del biosensor se modificó como se describió anteriormente, con la excepción de que se agregó suero con antígeno en lugar del antígeno puro y se utilizó una matriz de control adicional (en lugar de agregar suero con antígeno, se agregó solo suero del individuo sano). Las medidas de voltamperometría se llevaron a cabo de la misma manera que se ha mencionado anteriormente.

3.5 Análisis de los datos.

Todos los cálculos se realizaron en Microsoft Excel. Los gráficos se realizaron en el software Origin Pro.

Resultados

Los resultados tanto de los controles (figura 2) como de las pruebas (figura 3) se observan en una gráfica de potencial (eje x) vs corriente (eje y). A partir de estas medidas y de las posteriores, los datos de ΔE_{pc} , potencial redox, relación pico-corriente y valores de ΔI_{pc} se encuentran en la Tabla 2.

En cuanto a los controles, se observa que el voltamograma del electrodo desnudo tiene un comportamiento típico del par redox Ferro/ferricianuro y que a medida que se modifica la superficie del electrodo dicho comportamiento se altera, manifestándose en una disminución de la conductividad en los picos, principalmente el pico de reducción, siendo primero leve para el caso de los electrodos tratados con DSP y anticuerpo y finalmente tras la adición de la BSA. Esto confirma que se realizó la modificación de la superficie del electrodo.

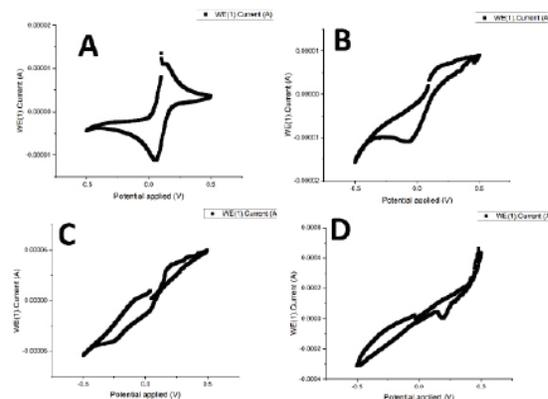


Figura 2. Voltamperogramas (potencial vs corriente) correspondientes a los controles donde A. Es el electrodo desnudo, B. Es el que solo tiene DSP C: Tiene DSP y el anticuerpo y finalmente D: DSP + Anticuerpo + BSA.

Finalmente, en los ensayos se observa que la reducción de los picos es dependiente de la concentración de antígeno.

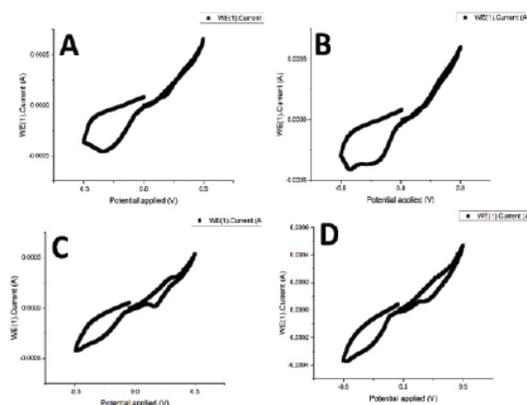


Figura 3. Voltamperogramas (potencial vs corriente) correspondientes a los ensayos a diferentes concentraciones de H1. La corriente se midió el mismo día que se realizó la reacción antígeno-anticuerpo donde A. es 10 $\mu\text{g/mL}$, B. es 1 $\mu\text{g/mL}$, C es 0.1 $\mu\text{g/mL}$, y D es 0.01 $\mu\text{g/mL}$ del antígeno.

Después de esto, se quiso probar si el biosensor desarrollado era capaz de detectar la proteína

hemaglutinina 1 en una muestra real; Para ello, se obtuvo suero sanguíneo de un individuo sano y luego se adicionó antígeno a ese mismo suero; Manteniéndose en las mismas concentraciones utilizadas anteriormente. Se prepararon nuevas laminillas de controles y pruebas de la misma forma que en los procesos anteriores con dos diferencias principales; la primera es la adición de nuevo control, es decir, una laminilla en el que se siguió el mismo proceso de inmovilización del anticuerpo, y finalmente, en lugar de añadir antígeno, se añadió suero sano (figura 4), esto para determinar si el biosensor está capaz de llevar a cabo la reacción específica antígeno-anticuerpo ignorando así la presencia de otras proteínas en la matriz. La segunda diferencia es que, en lugar de usar el antígeno puro para los ensayos, se utilizó el suero al que previamente se le añadió la proteína (figura 5).

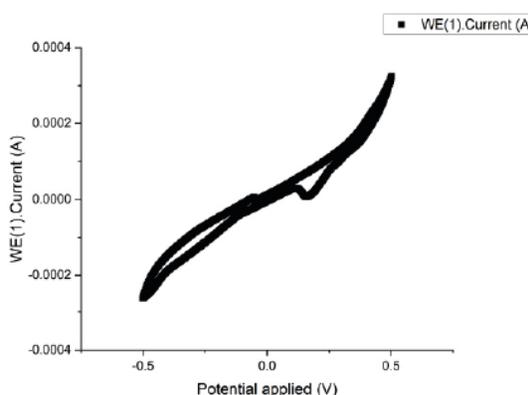


Figura 4. Voltamperograma del control negativo. Laminilla con DSP + Anticuerpo + BSA + Suero sin antígeno. El suero no parece tener una influencia significativa en la medición, lo que indica que el biosensor es capaz de discriminar entre el antígeno específico y otras posibles proteínas presentes en la matriz.

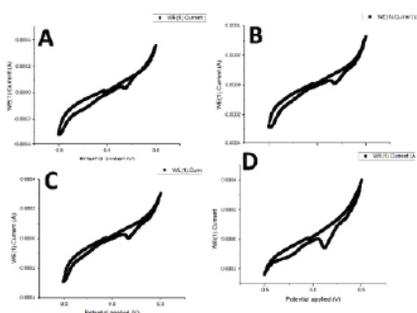


Figura 5: Voltamperogramas de los electrodos con el suero al que se añadió HI, que muestran el patrón ya mencionado anteriormente con las muestras de antígeno puro. Es decir, una reducción de los picos dependiente de la concentración de antígeno. Donde A. es 10 µg/mL, B es 1 µg/mL, C es 0.1 µg/mL y finalmente, D es 0.01 µg/mL.

Al agregar el suero no se observa el aumento de corriente producido por la reacción antígeno-anticuerpo, lo que indica que el biosensor es capaz de discriminar entre el antígeno específico y otras posibles proteínas presentes en la matriz; Esto lo confirman las mediciones de los electrodos con el suero al que se adicionó el antígeno, que presentan el patrón ya mencionado anteriormente con las muestras de antígeno puro, es decir, la reducción de corriente es dependiente de la concentración de la proteína.

Tabla 2. Parámetros voltamperométricos.

Electrodo	Ipc	Epc	Ipa	Epa	ΔE	Potencial redox	Relación pico-corriente
Blanco	-1.1x10 ⁻⁵	0.05218	0.1010	0.1010	-0.488	0.076	-9.056.08
DSP	-1.6x10 ⁻⁵	-0.5014	0.5020	0.5020	-1.003	0.0003	-
DSP/Anti-H1	-5.4x10 ⁻⁶	-0.5	4.98x10 ⁻¹	0.5009	-1.0009	0.00045	-0.9189
DSP/Anti-H1/BSA	-3.1x10 ⁻⁶	-0.5008	0.000454	0.4806	-	-0.01	-1.4489
DSP/Anti-H1/BSA/Suero	-2.4x10 ⁻⁶	-0.5012	0.00318	0.4997	-1.010	-0.00076	-1.22039
Antígeno	-4.60x10 ⁻⁶	-0.3363	0.000656	0.501	-	0.0823	-1.4374
10 µg/mL (1)	-4.1x10 ⁻⁶	-0.422	0.000001	0.5007	-	0.0396	-1.4951
1 µg/mL (1)	-4.1x10 ⁻⁶	-0.5002	0.000536	0.5008	-	0.000305	-1.26049
0.1 µg/mL (1)	-3.70x10 ⁻⁶	-0.4661	0.000472	0.5006	-	0.017242	-1.27343
Antígeno	-3.2x10 ⁻⁶	-0.4992	0.00036	0.5017	-	0.001221	-1.13682
10 µg/mL (2)	-2.8x10 ⁻⁶	-0.4884	0.000326	0.5003	-	0.005951	-
Antígeno	-2.8x10 ⁻⁶	-0.5014	0.000307	0.5020	-	0.00876	1.144553
1 µg/mL (2)	-2.4x10 ⁻⁶	-0.5008	0.000401	0.5002	-	0.00341	1.09293
0.1 µg/mL (2)	-2.4x10 ⁻⁶	-0.5008	0.000401	0.5002	-	-0.00031	-1.68418

Finalmente, es importante determinar el límite de detección (LD), es decir, la cantidad más baja de hemaglutinina 1 en una muestra que podría detectarse en el biosensor desarrollado, el LD se obtiene de la siguiente manera

$$LD = 3 \sigma / m$$

Donde: σ = desviación estándar del blanco y m = pendiente de la curva de calibración.

Los datos que se utilizarán para obtener el LD son los correspondientes a las pruebas de suero al ser las más cercanas a las muestras reales, por lo que.

$$\sigma = 1.5 \times 10^{-6}$$

Y obteniendo la ecuación de la recta

$$y = -5 \times 10^{-6} x - 0.0003$$

$$LDD = 8.97 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$$

Discusión

Los resultados de las mediciones indican que el biosensor desarrollado es capaz de detectar la proteína por la reacción antígeno-anticuerpo tanto en estado puro como en una matriz compleja como el suero humano; Esto es congruente con lo que ya han reportado otros investigadores como Tang et al en 2006, Malecka et al en 2011 y Diouani et al en 2016 [11, 15, 16], en sus voltamogramas se observa que a medida que se modifica la superficie, se perturba la transferencia de electrones en el par redox de ferrocianuro/ferricianuro, hecho que se manifiesta en la reducción de los picos de las gráficas, lo cual es consistente porque estas modificaciones actúan como barreras y la inmovilización de dicha sustancia en la superficie del se verifica el electrodo.

Se pudo observar que las reducciones por la inmovilización de DSP y el anticuerpo son leves, sin embargo, esto es diferente para el caso de BSA, con esta sustancia se presentó la mayor disminución de corriente. Se encuentra que este fenómeno también ha ocurrido en otros trabajos, destacándose el de Diouani et al 2016 [11]. Tras el bloqueo con BSA y la adición de antígenos, se produjo un ligero aumento en la transferencia de electrones, lo que se atribuye al ensamblaje de estas capas, además de que dicho aumento de corriente es dependiente de la concentración de antígeno, siendo mayor cuanto menor la concentración de antígeno, de forma que aquellos electrodos tratados con mayor concentración tienen una menor conductividad respecto al blanco, es decir, que, aunque la reacción antígeno-anticuerpo permite que la transferencia de electrones aumente ligeramente tras el bloqueo con BSA, esto ocurre principalmente a concentraciones más bajas, bloqueándose nuevamente a medida que aumenta la concentración de antígeno, lo que es una indicación de que la inmovilización se realizó como se esperaba.

También es importante mencionar que los resultados obtenidos también son consistentes con lo informado por Nidzworski et al en 2017, Talan et al en 2018 y Bhradwaj en 2019 [17, 18, 19]; Donde se obtuvo la diferencia entre los picos del voltamograma del electrodo no modificado con los correspondientes a las diferentes pruebas con los respectivos antígenos. Se encontró que esta diferencia depende efectivamente de la concentración de los antígenos; Atribuyéndolo a lo anterior, la obstrucción de la transferencia de electrones entre la solución redox y el electrodo aumenta a medida que aumenta la concentración de la proteína.

Cabe mencionar que se realizó una prueba de detección de antígenos en suero humano y los resultados indican que el biosensor es capaz de discriminar entre las diferentes proteínas presentes en la matriz de una muestra; Esto es consistente con Diouani et al 2016 [11] donde para probar la especificidad de su biosensor, llevó a cabo el mismo procedimiento de modificación de la superficie, solo que en lugar de agregar el antígeno específico, utilizó otra proteína que también está presente en la bacteria y sus Resultados indicaron que el anticuerpo inmovilizado fue capaz de discriminar entre su antígeno específico y otra proteína similar.

Conclusiones

Se logró desarrollar un biosensor electroquímico capaz de detectar la presencia de la proteína hemaglutinina 1 a través de una reacción antígeno-anticuerpo.

Se realizaron las pruebas de detección del antígeno, tanto con la proteína en estado puro, es decir una muestra con las condiciones controladas, y como era de esperarse se logró la detección de la proteína, y finalmente se planteó detectar el antígeno en muestras “reales”; se utilizó suero de un individuo sano al que se le adicionó antígeno. Los resultados obtenidos permiten determinar que efectivamente el biosensor desarrollado es capaz de discriminar entre la hemaglutinina 1 y el resto de las

proteínas presentes en esta compleja matriz debido a la reacción antígeno-anticuerpo específica.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma de Nuevo León, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas por permitirnos utilizar sus laboratorios para desarrollar este proyecto. Asimismo, nos gustaría agradecer al comité de tutoría por las revisiones dadas a este proyecto cuando se trabajó como tesis.

Referencias

- 1) Vargas-Córdoba M. (2016) *Virología médica* (2da edición). Editorial El Manual Moderno Colombia. ISBN: 9587758226.
- 2) Tepeli, Y & Anik, Ü. (2018) “Electrochemical biosensors for influenza virus a detection: The potential of adaptation of these devices to POC systems *Sensors and Actuators B*; 254, pp: 377–384. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.126>
- 3) Krejcova, L., Hynek, D., Adam, V., Hubalek, J. & Kizek, R. (2012) “Electrochemical Sensors and Biosensors for Influenza Detection”. *Int. J. Electrochem. Sci.*; 7, pp: 10779 – 10801. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)16902-1](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)16902-1)
- 4) Caygill, R., Blair, G. & Millner, P. (2010) A review on viral biosensors to detect human pathogens *Analytica Chimica Acta*; 681, pp: 8–15. <https://doi:10.1016/j.aca.2010.09.038>
- 5) Daniels JS & Pourmand, N. (2007) Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges *Electroanalysis*; 19, pp:1239–1257. <https://doi:10.1002/elan.200603855>
- 6) Ronkainen, N., Halsal, HB. & Heineman, WR. (2010) “Electrochemical biosensors” *Chem. Soc. Rev.*; 39, pp: 1747– 1763. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815053-5.00009-X>
- 7) Chen, A. & Shah, B. (2013) “Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry” *Anal. Methods*, 5, pp: 2158-2173. <https://DOI:10.1039/c3ay40155c>
- 8) Elgrishi, N., Rountree, K., McCarthy, B., Rountree, E., Eisenhart, T. & Dempsey, J. (2018) “A Practical Beginner’s Guide to Cyclic Voltammetry”. *J. Chem. Educ.*; 95, pp: 197-206. <https://DOI:10.1021/acs.jchemed.7b00361>
- 9) Pensa, E., Cortés, E., Corthey, G., Carro, P., Vericat, C., Fonticell, M., Benítez, G., Rubert, A. & Salvarezza, R. (2011) “The Chemistry of the SulfurGold Interface: In Search of a Unified Model” *ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH*; 45, pp:1183–1192
- 10) Frederix, F., Bonroy, K., Laureyn, W., Reekmans, G., Campitelli, A., Dehan, W. & Maes, G. (2003) “Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiols on Gold”

- Langmuir*; 19, pp: 4351-4357.
<https://doi.10.1021/la026908f>
- 11) Diouani, M., Ouerghi, O., Refai, A., Belgacem, K., Tlili, C., Laounin, D. & Essafi, M. "Detection of ESAT-6 by label free miniature immunoelectrochemical biosensor as a diagnostic tool for tuberculosis" *Materials Science and Engineering: C*; 74, pp: 465-470.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.051>
 - 12) Jazayeri, MH., Amani, H., Pourfatollah, A., Pazoki-Toroudi, H., & Sedighimoghaddam, B. (2016) Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies *Sensing and Bio-Sensing Research*, 9, pp: 17-22.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.04.002>
 - 13) Gómez-Biedma, S., Soria, E. & Vivó, M. (2002) "Análisis electroquímico" *Rev Diagn Biol*, 51 no.1, pp: 1-16.
http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732002000100005
 - 14)) Zhang, B., Wang, R., Wang, Y. & Li, Y. (2013) "A Portable Impedance Biosensor for Detection of Multiple Avian Influenza Viruses" *Arkansas Biosciences Institute*, 1, pp: 1-4.
[https://doi.978-1-4673-4642-9/13/\\$31.00](https://doi.978-1-4673-4642-9/13/$31.00)
 - 15) Tang, D., Yuan, D., Chai, Y., Zhong, X., Liu, Y., & Dai, J. (2006) "Electrochemical detection of hepatitis B surface antigen using colloidal gold nanoparticles modified by sol-gel network interface" *Clinical Biochemistry*, 39; pp: 309-314.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.12.003>
 - 16) Malecka, K., Grabowska, I., Radecki J., Stachya, A., Góra-Sochacka, A., Sirko, A. & Radecka, H. (2011) "Voltammetric Detection of a Specific DNA Sequence of Avian Influenza Virus H5N1 Using HS-ssDNA Probe Deposited onto Gold Electrode" *Electroanalysis*; 24, pp: 439-446.
<https://DOI:10.1002/elan.201100566>
 - 17) Nidzworski, D., Siuzdak, K., Niedziałkowski, P., Bogdanowicz, R., Sobaszek, M., Ryl, J., Weiher, P., Sawczak, M., Wnuk, E., Goddard, W., Jaramillo-Botero, A. & Ossowski, T. (2017) "A rapid-response ultrasensitive biosensor for influenza virus detection using antibody modified boron-doped diamond"; 7, pp: 1-10.
<https://DOI:10.1038/s41598-017-15806-7>
 - 18)) Talan, A., Mishra, A., Eremin, S., Narang, J., Kumar, A. & Gandhi, S. (2018) "Ultrasensitive electrochemical immuno-sensing platform based on gold nanoparticles triggering chlorpyrifos detection in fruits and vegetable" *Biosensors and Bioelectronics*; 105, pp: 14-21.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.013>
 - 19) Bhradwaj, J., Chaudhary, N., Kim, H. & Jang, J. (2019). "Subtyping of Influenza A H1N1 virus using a label-free electrochemical biosensor based on the DNA aptamer targeting the stem region of HA protein" *Analytica Chimica Acta*; 1064, pp: 94-103.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.005>