

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**DETECCIÓN DE *FLAVIVIRUS* MEDIANTE EL DESARROLLO DE UN
INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO**

POR

LISDALYS BARBERÁ BORROTO

**CON REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

ABRIL, 2021

**DETECCIÓN DE *FLAVIVIRUS*, MEDIANTE EL DESARROLLO DE UN
INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO**



Dra. Pilar del Carmen Morales san Claudio
Director de tesis

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado
Comité tutorial

Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez
Comité tutorial

Dr. José Rubén Morones Ramírez
Comité tutorial

RESUMEN

Lic. Lisdalys Barberá Borroto

Diciembre 2021

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Autónoma de Nuevo León

Título del estudio: Detección de Flavivirus, mediante el desarrollo de un inmunosensor electroquímico.

Número de páginas: 63

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada.

Área de estudio: Materiales funcionales

Propósito y método de estudio: El objetivo de la investigación es desarrollar un método de diagnóstico que detecte la proteína E del virus del dengue, mediante un inmunosensor electroquímico que presenta un electrodo de trabajo serigrafado de oro.

Contribuciones y conclusiones: La superficie del electrodo de trabajo fue modificada para formar la SAM exitosamente, ya que se pudo constatar la reacción antígeno-anticuerpo, es decir el electrodo desarrollado, es capaz de detectar la proteína E de DENV 1,2 y 3, en diluciones de 1:5, 1:10 y 1:50, así como DENV 1 y 2 aislados de pacientes. Además, los resultados demostraron que el electrodo discrimina entre las muestras con DENV y las que presentan otros arbovirus como es el caso de Chikungunya, el cual presenta sintomatología similar DENV y puede confundirse su diagnóstico; por otro lado, también diferencia las muestras de personas sanas.

FIRMA DEL ASESOR:

_____ Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas y en Laboratorio de tratamientos superficiales y fotocátalisis de la Facultad de Ciencias Químicas, dichas unidades de investigación se encuentran en las instalaciones de Ciudad Universitaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se otorgó una beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de becario 1009674

Financiamiento

El presente trabajo de investigación fue financiado por:

El Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Por el apoyo brindado a la investigación científica de este trabajo por parte del Laboratorio de Biotecnología de la FCQ, UANL bajo la dirección de la Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio, al Laboratorio de tratamientos superficiales y fotocátalisis de la FCQ, UANL bajo la dirección del Dr. Juan Hernández y al departamento de Bioquímica y biología molecular de la Facultad de Medicina, UANL bajo la dirección de la Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla y la colaboración del Dr. Daniel Arrellano Soto y la Dra. Natalia Martínez Acuña.

Agradecimientos

A Saúl mi pareja por motivarme a comenzar juntos esta maestría y brindarme siempre su apoyo incondicional, incluso en tiempos de pandemia.

A mis padres, mi hermano, mis suegros, Argelia y Sergio por la protección emocional a pesar de estar lejos y por incentivar me a conseguir mis metas.

A la UANL y la FCQ por la oportunidad de seguir estudiando al ofrecer estudios de posgrado.

A mi directora de tesis la Dra. Pilar, por la asesoría y preocupación por sacar adelante el proyecto a pesar de las adversidades de los momentos en que vivimos, por las observaciones realizadas a mi trabajo y por la adquisición de los reactivos necesarios para llevar a cabo los experimentos

Al comité tutorial por toda su dedicación y tiempo empleado. Especialmente al Dr. Raúl por siempre estar dispuesto y pendiente ante cualquier duda. Al igual que le agradezco a la Dra. Melissa y al Dr. Rubén por las clases impartidas que me sirvieron para enriquecer el proyecto con estos nuevos conocimientos.

A CONACYT por la beca otorgada que me sirvió para sustentarme como único ingreso durante los dos años del proyecto.

Al departamento de Bioquímica y biología molecular de la Facultad de Ciencias Médicas de la UANL y a los Doctores Ana María Rivas, Daniel Arrellano y Natalia Martínez por permitirme trabajar en el laboratorio y facilitarme instrumentos, reactivos y demás materiales.

Al Dr Juan Hernández del laboratorio de tratamientos superficiales y fotocátalisis de la Facultad de Posgrado de Ciencias Químicas y a sus estudiantes de posgrado Jawer y Laura por permitirme realizar las mediciones en el potencióstato-galvanostato.

A la Dra. Marielena Cantú que me apoyo mucho con el ingreso al posgrado y en el proceso de adaptación a México y su cultura.

A Karina y Ricardo que siempre se encuentran dispuestos a aclarar cualquier duda o situación de la manera más amable, así como todo el personal administrativo de posgrado

A todos los profesores porque sus clases me ayudaron en la realización del proyecto y fomentaron en mis habilidades de comunicación. Con especial cariño al Dr. Alberto que me compartió su experiencia de estudiar en un país extranjero.

A mis compañeros y amigos por la compañía, el apoyo durante las clases y el trabajo en equipo realizado

Al Dr. Xristo, por siempre mantenernos informados y apoyarnos ante cualquier eventualidad.

A las licenciadas Cortes y Luisa por apoyarme con los trámites migratorios.

RESUMEN	10
LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
NOMENCLATURA.....	14
CAPÍTULO 1	15
Introducción.....	15
CAPÍTULO 2	17
Antecedentes	17
2.1 Virus del dengue	17
2.1.1 Estructura general del virión.....	17
2.1.2. Estructura del genoma.....	18
2.1.3 Características de las proteínas virales	19
2.1.4 Replicación viral	20
2.1.5. Serotipos del virus del dengue	22
2.1.6 Situación epidemiológica	22
2.1.7 Cuadro clínico	25
2.1.8 Transmisión de DENV en la naturaleza.....	25
2.1.9 Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por DENV	26
2.1.10 Tratamiento.....	27
2.2 Biosensores.....	28
2.2.1 Inmunosensor electroquímico	28
2.2.2 Voltamperometría Cíclica	31
2.2.4 Inmunosensores para el diagnóstico de enfermedades	32
CAPÍTULO 3	35
3.1 Hipótesis.....	35
3.2 Objetivo general.....	35
3.3 Objetivos específicos	35
3.4 Metas	35
CAPÍTULO 4	36
Materiales y métodos	36
4.1 Equipo	36
4.2 Reactivos	36

4.3 Metodología.....	37
4.4 Modificación de la superficie del electrodo	39
4.5 Adición de antígenos	41
4.6 Controles	42
4.7 Medición de voltamperometría cíclica	43
4.8 Disposición de residuos	44
CAPÍTULO 5	45
Resultados	45
6.1 Modificación de la superficie del electrodo de oro.....	45
6.2 Comprobación de la reacción antígeno-anticuerpo DENV1	47
6.3 Comprobación de la reacción antígeno-anticuerpo DENV2	49
6.4 Comprobación de la reacción antígeno-anticuerpo DENV3	51
6.5 Comprobación de los controles del virus de Chikungunya y el suero de una persona sana	51
CAPÍTULO 6	53
Discusión	53
CONCLUSIÓN	56
PERSPECTIVAS	57
REFERENCIAS	58

RESUMEN

En las últimas décadas las enfermedades causadas por Flavivirus, principalmente dengue y zika han ido en aumento, convirtiéndose en un problema de salud mundial. Para poder combatir estas enfermedades de una manera eficiente y brindarle al paciente la mejor atención se hace necesario desarrollar métodos de diagnóstico económicos que puedan llegar a todos y al mismo tiempo rápidos y confiables. Una alternativa que está cobrando mucha fuerza son los sensores para la detección de agentes infecciosos. Por estas razones nuestro trabajo se centra en desarrollar un inmunosensor voltamperométrico para detectar la proteína E de Flavivirus.

Los resultados de los voltamperogramas cíclicos demuestran que en cada paso de la modificación del electrodo hubo una disminución en las corrientes anódicas y catódicas; por tanto, la metodología que llevamos a cabo permitió la correcta modificación de la superficie del electrodo para anclar el bioresceptor, que en este caso es el anticuerpo anti-flavivirus 4G2. Además, se comprobó la reacción antígeno-anticuerpo de los serotipos 1,2 y 3 del virus del dengue y de un aislado del serotipo 1 y otro del serotipo 2 de pacientes de Nuevo León, resultando en picos disminuidos con respecto al electrodo sin modificar, por las barreras físicas aislantes que representan las partículas de dengue al unirse al electrodo.

Se pudo demostrar, además, que el sensor es capaz de discriminar entre muestras que tienen dengue y las que tienen otros virus como es el ejemplo de Chikungunya, este es un virus que al igual que dengue es transmitido por artrópodos pero no pertenece a los Flavivirus, por tanto el electrodo no lo reconoce, esto es muy importante para el objetivo del diagnóstico porque al presentar síntomas y signos similares se puede dar un falso resultado, con este electrodo al enfrentarlo a Chikungunya no hubo disminución de la corriente y se puede decir que no se unió. Otro control fue que se utilizó suero de personas sanas, en este caso tampoco el electrodo pudo reconocer ninguna partícula.

Cumpliendo así con los objetivos planteados en el trabajo podemos decir que el electrodo desarrollado funciona como método de diagnóstico para el virus del dengue.

Palabras Clave: Dengue, Flavivirus, inmunosensor, voltamperometría cíclica

LISTA DE TABLAS

1: Incidencia de casos de dengue, proporción de dengue grave, letalidad y serotipo, en 11 países seleccionados de la región de América. Fuente: OPS 2020.....	24
2: Características de los virus prototipos empleados.....	36
3: Parámetros de las voltamperometrías cíclicas de la modificación del electrodo.....	44
4: Parámetros de las voltamperometrías cíclicas de la reacción antígeno-anticuerpo DENV1.....	46
5: Parámetros de las voltamperometrías cíclicas de la reacción antígeno-anticuerpo DENV1.....	48

LISTA DE FIGURAS

1. Estructura del virión de DENV.....	18
2. Representación esquemática de la estructura genómica del virus. Fuente: Martínez <i>et al.</i> , 2017.....	18
3. Esquema de replicación de DENV.....	21
4. Estructura de IgG. Fuente: Kergaravat 2013.....	29
5. Estructura de un biosensor electroquímico. Fuente: Ronkainen <i>et al.</i> , 2010.....	30
6. Magnitudes de un voltamperograma cíclico de acuerdo con el convenio planteado por la IUPAC.....	31
7. Ecuación de Nernst. Donde R: Es la constante universal de gases, T: es la temperatura, n es el número de electrodos y F es la constante de Faraday.....	32
8. Metodología seguida para la modificación de superficie de oro.....	38
9. Laminilla de electrodos marca Metrohm DroSens.....	38
10. Esquema general de la reacción entre el oro y los tioles. En la primera etapa, las moléculas de tioles (RSH) se adsorben sobre la superficie de Au y luego pierden el átomo de H del grupo tiol, generando el radical tiol (RS) para formar una unión (S–Au). Este es considerado un enlace covalente. Fuente: Pensa 2011, Frederix 2003.....	39
11. Esquema de la metodología para la modificación de la superficie de oro.....	40
12. Voltamperograma cíclico de la laminilla desnuda, sin modificación de la superficie del electrodo.....	45
13. Voltamperogramas cíclicos de cada paso de la modificación de la superficie del electrodo.....	45
14. Voltamperograma cíclico de la reacción antígeno-anticuerpo A: comparación entre las diluciones 1:5, 1:10 y 1:50 de DENV1, B: comparación entre las diluciones 1:5, 1:10 y 1:50 de DENV1 y el electrodo desnudo.....	47
15. Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la reacción antígeno-anticuerpo de las diluciones 1:5, 1:10 de DENV1 paciente.....	47
16. Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la reacción antígeno-anticuerpo de las diluciones 1:5, 1:10 y 1:50 de DENV2.....	48

17. Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la reacción antígeno-anticuerpo de la dilución 1:10 de DENV 2 paciente con el electrodo no modificado.....	49
18. Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la reacción antígeno-anticuerpo de la dilución 1:5 de DENV 3 con el electrodo no modificado.....	50
19. Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la dilución 1:5, 1:10 y 1:50 del virus de Chikungunya con el electrodo sin modificar.....	51
20. Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la dilución 1:5, 1:10 y 1:50 del suero de persona sana.....	52

NOMENCLATURA

11-MUA	Ácido 11-mercaptoundecanoico
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina
DENV	Virus del Dengue
EDC	1-etil-3-(3- diaminopropil) carbodiimida
EIS	Espectroscopía de impedancia electroquímica
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EM	Electrodo modificado
FD	Fiebre del Dengue o Dengue clásico
FHD	Fiebre hemorrágica del dengue
Ig	Inmunoglobulinas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NHS	N-hidroxisuccinimida
ORF	Marco abierto de lectura
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena De Polimerasa
RE	Retículo Endoplasmático
SAM	Monocapa autoensamblada
SE	Semana Epidemiológica
SSD	Síndrome de choque por dengue
UTR	Regiones no traducidas
VC	Voltamperometría cíclica
µg	Microgramos
µL	Microlitros

CAPÍTULO 1

Introducción

Los virus son agentes infecciosos constituidos por macromoléculas, principalmente ácido nucleico y proteínas. A través de los años han sido un problema de salud en todo el mundo, causando brotes de enfermedades que pueden diseminarse rápidamente provocando epidemias e incluso pandemias. La diversidad de los virus que afectan al humano hacen que el diagnóstico, tratamiento y recuperación de la enfermedad infecciosa sea más complejo que el de otros agentes patógenos, lo que trae como consecuencia la pérdida de incontables vidas [Esparza *et al.*, 2016]. Por tanto, es de primera prioridad contar con métodos diagnóstico rápido y certeros para poder administrar un tratamiento adecuado en cada caso.

Una de las enfermedades virales que ha cobrado importancia al paso de los años es el dengue, considerada la infección viral transmitida por mosquitos *Aedes aegypti* y en menor grado por *Aedes albopictus* de más rápida propagación en el mundo [Brady y Hay 2019]. El agente etiológico de la enfermedad es el Virus del Dengue (DENV), que tiene cuatro serotipos distintos, pero estrechamente emparentados: DENV 1, DENV 2, DENV 3 y DENV 4 [OMS 2019], con la capacidad de causar el mismo cuadro patológico al infectar al hospedero humano a través de la picadura del mosquito hembra [Yung *et al.*, 2015, Tsai *et al.*, 2019]. Sus manifestaciones clínicas varían en severidad, desde un síndrome febril en su forma más leve a hemorragias internas y daños en los órganos en su manifestación más grave que pueden llegar a ser fatales [Correa *et al.*, 2016]. Otro problema que es necesario afrontar para el control de la enfermedad es que el mosquito vector presenta una gran adaptabilidad a cualquier zona, tanto en localidades rurales, semirurales o urbanas, sin embargo, se desarrolla mejor en ambientes tropicales donde abundan la humedad y los cuerpos de agua fresca [Yung *et al.*, 2015].

En las últimas décadas la situación epidemiológica ha ido empeorando, con la expansión de la enfermedad hacia más países, siendo endémica en África, el Mediterráneo Oriental, el Sudeste Asiático, el Pacífico Occidental y en América. Según datos de la Organización Mundial de la Salud solamente en América se notificaron en el año 2019 un número de 3,1 millones de casos, de los cuales 25 000 se clasificaron como graves [OMS 2020].

La situación en México no se aleja del panorama internacional, visto que el dengue es la infección viral, transmitida con mayor frecuencia, por artrópodos en el país. A pesar de las estrategias de control del vector implementadas por las autoridades sanitarias y de que se cuenta con protocolos de diagnóstico estandarizados en el sistema de salud, cada año la cantidad de personas que se enferman es mayor a las cifras reportadas con anterioridad, pasando a ser un problema importante para la salud pública. Este desafortunado panorama nos conduce a la necesidad de contar con métodos de diagnóstico innovadores que favorezcan la detección de la infección de manera más rápida y eficiente de lo que se ha logrado hasta ahora [Arredondo *et al.*, 2020].

Con tal motivo esta investigación se enfocará en el diseño de un inmunosensor voltamperométrico para la detección del virus Dengue. Los inmunosensores son artefactos fundamentados en la afinidad antígeno-anticuerpo que han demostrado su capacidad para el diagnóstico de agentes tanto virológicos como bacterianos. La funcionalidad del dispositivo es a partir de un sensor electroquímico, que consiste en un arreglo de electrodos donde ocurre la reacción específica (antígeno-anticuerpo); dicha reacción se puede medir mediante técnicas electroquímicas, entre las que destacan las voltamperometrías, por proporcionar resultados rápidos de la diferencia en el potencial del electrodo cuando se coloca en una solución con un par redox. Se espera que el método pueda implementarse en los puntos primarios de atención para la detección eficiente del virus e incluso utilizarse para el análisis de muestras de campo [Espinosa 2019].

CAPÍTULO 2

Antecedentes

2.1 Virus del dengue

A nivel mundial, el dengue es la enfermedad por arbovirus más común, se le denomina arbovirus a el grupo conformado por todos los virus transmitidos por artrópodo hematófago, principalmente mosquitos y garrapatas a un vertebrado susceptible [Arredondo *et al.*, 2016; Le J y Nathanson 2016]. Las familias que tienen miembros dentro de este grupo son:

- *Bunyaviridae* (que comprende los *Bunyavirus*, *Flebovirus*, *Nairovirus* y *Hantavirus*)
- *Togaviridae*
- *Reoviridae* (que comprende a *Coltivirus* y *Orbivirus*)
- *Togaviridae* (que comprende a los *Alfavirus*)
- *Flaviviridae* (que comprende solo a los *Flavivirus* y donde se incluye el virus del dengue)

Otras especies de importancia clínica que conforman el género *Flavivirus* son: el virus de la fiebre amarilla, el virus del Nilo Occidental y el virus del Zika [Le J and Nathanson N. 2016].

2.1.1 Estructura general del virión

La morfología que presenta DENV es esférica al observar la microscopía electrónica. El virión tiene un diámetro entre 40-60 nanómetros, son envueltos en una membrana lipídica donde se encuentran dos proteínas estructurales: la de envoltura (E) y la de membrana (M), las cuales cumplen importantes funciones. La proteína E es el mayor determinante antigénico del virión ya que es la que media la unión y fusión durante la entrada del virus a la célula, la proteína M es un pequeño fragmento obtenido por proteólisis de la proteína precursora de membrana (prM) y se produce durante la maduración viral en la ruta secretora de la célula. La tercera de las proteínas estructurales es la de cápside (C) [Byk 2016], que tiene simetría icosaédrica y confiere protección al material genético del virus, como se puede observar en la figura 1. Además, tiene siete proteínas no estructurales que se forman e intervienen en los procesos de replicación del virus, pero no forman parte de la partícula final, que se denominan NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (NS del inglés- nonstructural) [Laredo *et al.*, 2012].

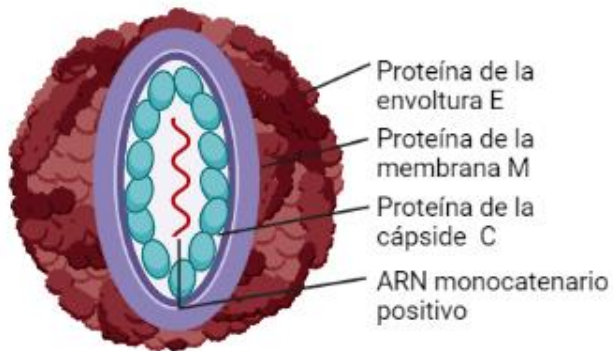


Figura 1. Estructura del virión de DENV

2.1.2. Estructura del genoma

El genoma de DENV consiste en una molécula de RNA de polaridad positiva. Tiene una longitud de unas 11 kb y un peso molecular de 4,2 kD, con una estructura en forma de caperuza en su extremo 5' que sirve para estabilizar el RNA viral, iniciar la traducción y subvertir los mecanismos celulares iniciales de defensa. [Dafis *et al.*, 2010]. La molécula de ARN viral cumple con varias funciones en el ciclo de vida del virus: sirve como ARNm para la traducción de las proteínas virales y como molde para la replicación, hasta obtenerse el genoma que será empaquetado en la nucleocápside de la progenie viral [Plevka *et al.*, 2011]. La organización general del genoma es como se observa en la figura 2, Siendo C cápside; prM precursor de membrana; E envoltura. Los genes que codifican para las proteínas estructurales se encuentran hacia el extremo 5' terminal, mientras que el segmento restante se ocupa de las proteínas no estructurales [Martínez *et al.*, 2017].

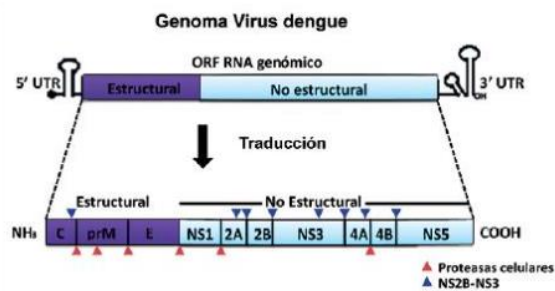


Figura 2. Representación esquemática de la estructura genómica del virus. Fuente: Martínez *et al.*, 2017

A diferencia de los ARNm celulares, el genoma de DENV carece de cola poliadenilada en su extremo 3'. Contiene un solo marco abierto de lectura (ORF del inglés Open Reading Frame) de unos 3400 codones (10 250 nucleótidos) flanqueado por regiones 5'y 3'no traducidas (UTR del inglés Untranslated Regions), que codifica para un precursor polipeptídico, del cual se derivan 10 proteínas virales a través del procesamiento co y post-traducciona por peptidasas celulares y virales [Junjhon *et al.*, 2010]. Estas regiones UTR influyen en la traducción del genoma viral y en la replicación, ya que a la región UTR 5'se une la RNA polimerasa-RNA dependiente/metiltransferasa viral (NS5). La síntesis de la poliproteína ocurre en el citoplasma, en el Retículo Endoplasmático (RE) [Laredo *et al.*, 2012, Arredondo *et al.*, 2016].

2.1.3 Características de las proteínas virales

Las proteínas estructurales y no estructurales de DENV juegan importantes papeles para la correcta replicación del virus en la célula. La proteína C es el componente básico de la nucleocápside debido a la presencia de residuos aminoacídicos de lisina y arginina, lo cual hace posible que interactúe con el RNA viral. Es el primer polipéptido viral sintetizado durante la traducción, con un peso molecular de unos 11 kD. La proteína recién sintetizada contiene en su extremo C-terminal una cola hidrofóbica que sirve como péptido señal para la translocación al retículo endoplasmático (RE) de prM, que es una glicoproteína de membrana de 26kD, precursora de la proteína de membrana (M) madura, a la cual da lugar mediante su escisión proteolítica por la enzima celular furina [Gonçalves *et al.*, 2018, Plevka *et al.*, 2011]. E es la principal proteína en la superficie de los viriones de *Flavivirus* (53 kD) y también la más conservada del género, es una proteína que media tanto la unión al receptor celular como la fusión de la membrana de la célula hospedera y la partícula viral. Además, E es la mayor responsable de la inmunidad contra el DENV, la cual es mediada por anticuerpos neutralizantes contra esta proteína. La proteína E tiene una estructura de tres dominios: DI) que forma un barril de hojas β y es el dominio central; DII) un dominio de dimerización y DIII) un dominio inmunoglobulínico. [Siew *et al.*, 2021, Messer *et al.*, 2014].

Por otro lado, las proteínas no estructurales cumplen roles diferentes, los cuales son los siguientes: la glicoproteína NS1 (46 kD) forma homodímeros estables y adquiere afinidad por las membranas. Se ha planteado que juega un papel en la replicación temprana. Esta glicoproteína presenta determinantes antigénicos específicos de serotipo y de grupo, esta característica la hace útil en el

desarrollo de métodos de diagnóstico que se explicaran más adelante en este escrito. La proteína NS2 está constituida por dos proteínas: NS2a y NS2b. NS2a es una proteína hidrofóbica de unos 22kD, que se origina en el citoplasma debido a la escisión por NS2b-NS3. Puede estar relacionada en función con el reclutamiento de los RNA moldes para la replicasa, así como inhibir la señalización vía interferón [Simmons *et al.*, 2012]. NS2b forma un complejo estable con NS3 y sirve para anclar este complejo a las membranas celulares, además de actuar. como un cofactor necesario para la actividad serina-proteasa del complejo NS2bNS3 [Gonçalves *et al.*,2018]. NS3 tiene un peso molecular de 70 kD. Está altamente conservada en los *Flavivirus* y es un componente de la maquinaria enzimática de la replicación del RNA viral, llevando a cabo funciones importantes requeridas para el procesamiento de la poliproteína y la replicación del RNA. Funciona como proteasa, helicasa, y RNA-trifosfatasa, esta última actividad es necesaria para la formación de la caperuza en el extremo 5`del genoma viral [Wu *et al.*, 2003]. Además de su papel en la replicación viral, el dominio helicasa de NS3 se encuentra implicado en el ensamblaje de las partículas virales [Kümmerer *et al.*, 2002, Pérez *et al.*, 2015]. La proteína NS4 se modifica post-traduccionalmente y da lugar a NS4a y NS4b, proteínas hidrofóbicas pequeñas (16kD y 27kD respectivamente). NS4a está implicada en la replicación del RNA viral a través de su interacción con NS1. NS4b es una proteína de membrana que se localiza con NS3 en los presuntos sitios de replicación de RNA. NS5 es la proteína de mayor tamaño (103 kD), altamente conservada y multifuncional con actividades necesarias para la formación de la caperuza de RNA como metiltransferasa y RNA polimerasa-RNA dependiente (RpRd) [Davidson, 2009]. NS3 y NS5 funcionan juntas durante la formación de la caperuza del RNA viral [Tittarelli *et al.*,2017].

2.1.4 Replicación viral

Una vez establecida la infección, la replicación viral tanto en el hombre como en el mosquito se inicia con el acercamiento del DENV a la superficie celular; luego, la proteína E interactúa con proteínas o proteoglicanos de la membrana celular que median la unión. Posterior al reconocimiento por parte de los receptores de membrana, el virión de DENV entra a la célula por endocitosis. Dentro de la célula la replicación comienza con la síntesis de una cadena RNA de polaridad negativa que sirve como molde para la síntesis de nuevos RNA progenie de polaridad positiva. La síntesis del RNA viral es asimétrica, con una acumulación de RNA (+) diez veces mayor que la cantidad de RNA (-) sintetizada. En las células infectadas por DENV pueden

apreciarse cambios estructurales en membranas perinucleares [Beita *et al.*, 2016]. La traducción es dependiente de caperuza, y la metilación de la caperuza 5' ayuda a evadir las defensas antivirales innatas que inhiben la traducción en células infectadas. La traducción del único ORF produce una poliproteína larga que es co- y postraduccionalmente escindida en 10 proteínas. Los cortes son llevados a cabo por proteasas celulares y virales. Para el ensamblaje de las nuevas partículas el extremo N-terminal de la proteína C actúa como una secuencia señal [Lorch *et al.*, 2020]. Los viriones parcialmente ensamblados son transportados al RE de la célula hospedera, donde las nucleocápsides son envueltas con la membrana del RE que ya contiene las proteínas virales E (envoltura) y prM (pre-membrana), formándose viriones inmaduros de unos 60 nm de diámetro. Finalmente, estas partículas son transportadas a través de la ruta secretora celular, mientras las proteínas prM son escindidas por la proteasa celular furina y se obtiene proteína M, lo cual desata una redistribución de las moléculas de M y E para formar los viriones maduros. Tras el ensamblaje los viriones y su transportación a través de la ruta secretora, son liberados en la superficie celular. Pasos adicionales de maduración ocurren durante la salida del virus, como la modificación de prM y E por adiciones y deleciones terminales [Junjhon *et al.*, 2010]. El esquema general de la infección por dengue puede observarse a continuación en la figura 3.

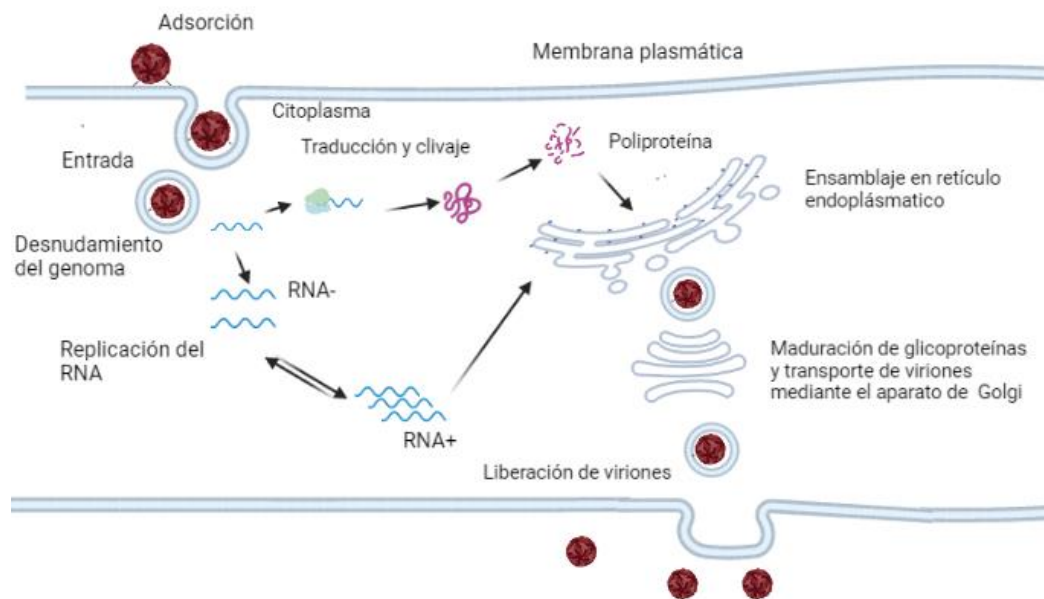


Figura 3. Esquema de replicación de DENV

2.1.5. Serotipos del virus del dengue

Se han descrito cuatro serotipos de virus: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV -4, capaces de causar la fiebre del dengue y un quinto DENV-5 que hasta el momento no representa interés clínico, porque solo sigue el ciclo selvático [Mustafa *et al.*, 2015]. Estos virus tienen epítomos comunes en la proteína de la envoltura, lo que ocasiona una elevada reactividad cruzada en las pruebas serológicas, por lo que cada serotipo crea inmunidad específica a largo plazo contra infecciones por el mismo serotipo (homólogas), de por vida. En cuanto a organización genómica, los serotipos difieren en su secuencia nucleotídica un 30% aproximadamente. Cada uno de los 4 serotipos en particular presenta diversidad genética, en forma de clúster filogenéticamente distintos llamados genotipos [Arredondo *et al.*, 2016].

Los genotipos presentan un rasgo biológico importante que es su distribución geográfica. Unos genotipos son cosmopolitas, ya que pueden infectar al hombre en distintos continentes, mientras que otros genotipos están más restringidos geográficamente. Sin embargo, no está claro si este fenómeno se debe a la exportación de linajes específicos o refleja las diferencias intrínsecas en la adaptabilidad [Galán 2013].

2.1.6 Situación epidemiológica

En la antigua China en la Enciclopedia de Síntomas de las Enfermedades y Remedios, publicada por primera vez durante la Dinastía Chin (265-420 D.C). se describe una enfermedad con síntomas similares a los de la fiebre por DENV. Esta enfermedad fue llamada por los chinos como “agua venenosa” y ellos pensaban que de algún modo estaba conectada con insectos voladores asociados al agua [Galán 2013]. Los primeros casos de dengue se presentan en la isla de Java en 1779 y Filadelfia (EE.UU.) en 1780 y es en este mismo año cuando se describe por primera vez el cuadro sintomático de la enfermedad por Benjamín Rush, después de comparar pacientes en Filadelfia durante la epidemia en Estados Unidos. Benjamín Rush es además el que acuña el término “Fiebre Rompehuesos” por los síntomas asociados a la enfermedad [Aguar *et al.*,2016].

La Organización mundial de la salud (OMS) calcula que cada año se producen entre 50 y 100 millones de infecciones y 2.5 billones de personas están en riesgo de contraerlo [OMS 2020]. Los brotes suelen ser explosivos o progresivos, dependiendo de diversos factores como la densidad y

susceptibilidad del vector, la cepa del virus de dengue, el nivel de inmunidad en la población humana, y la intensidad de contacto vector-humano. En los últimos 50 años, su incidencia ha aumentado 30 veces con la creciente expansión geográfica hacia nuevos países y, en la última década, se ha diseminado de áreas urbanas a rurales. La OMS estima cerca 2,500 millones (40% de la población mundial) de personas procedentes de zonas urbanas, peri-urbanas y rurales se encuentran en riesgo de contraer la infección [Were *et al.*, 2012]. Históricamente el dengue se ha considerado una enfermedad típica de países tropicales, no obstante, hoy en día la epidemiología ha cambiado, otras zonas geográficas del mundo están siendo afectadas y la incidencia del dengue se ha incrementado dramáticamente. La enfermedad ha sido reconocida en más de 100 países y es endémica en África, el Mediterráneo Oriental, el Sudeste Asiático, el Pacífico Occidental y en América [Kurane *et al.*, 2001].

Es importante mencionar que la OMS considera el Dengue como enfermedad emergente que constituye un problema de salud pública. Además, representa una carga económica y social para los sistemas de salud pública en las zonas endémicas.

Entre la semana epidemiológica (SE) 1 y la SE 52 de 2019 en la región americana se notificaron 3,139,335 casos (incidencia de 32,158 casos por 100,000 habitantes), incluidas 1,538 defunciones. Del total de casos 28,169 (0,9%) fueron clasificados como dengue grave. La tasa de letalidad fue 0.049%. Esta impresionante cifra (3,139,335) representa el mayor número de casos registrado en la historia del dengue América, superando en 30% al número de casos reportados en el año epidémico 2015. Respecto a la proporción de casos de dengue grave (0.9%), se observó un incremento con lo visto en los cuatro años anteriores. Entre la SE 1 y la SE 5 de 2020, se reportaron 155,343 casos de dengue, incluidas 28 defunciones. Del total de casos notificados, 15,392 fueron confirmados por laboratorio y 715 fueron clasificados como dengue grave [OPS 2020].

Durante el 2019, 34 países y territorios de Centro y Sur América reportaron un incremento de casos a nivel nacional o en algunas áreas del país en comparación con el 2018. Países como Belice, Costa Rica, El Salvador, México, Nicaragua reportaron tres veces más casos que en el año previo. Otros países y territorios como Antigua y Barbuda, Brasil, Guadalupe, Guatemala, Honduras, Jamaica, Martinica y República Dominicana reportaron entre siete a diez veces más casos de dengue [OMS 2019].

Según la información obtenida de sistemas de vigilancia epidemiológica se ha podido constatar que en Latinoamérica circulan los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV 1, DENV 2, DENV 3 y DENV 4), y en 2019 se detectó la circulación simultánea de todos ellos en Brasil, Guatemala y México; mientras que, en Colombia, Martinica, Panamá, República Dominicana y Venezuela, circulan los serotipos DENV 1, DENV 2 y DENV 3, en Paraguay y Perú, DENV 1, DENV 2 y DENV 4, y en Islas Caimán se reportó la circulación de los serotipos DENV 2, DENV 3 y DENV 4 [OPS 2020]. Siendo los países con las tasas de incidencia más altas Nicaragua, Belice, Honduras, Brasil y El Salvador. El caso de México que es el que nos interesa, ocupó el noveno lugar con 205,39 casos por 100,000 habitantes, esta información se puede observar en la tabla 1[OPS 2020].

Tabla 1. Incidencia de casos de dengue, proporción de dengue grave, letalidad y serotipo, en 11 países seleccionados de la región de América. Fuente: OPS 2020

País	Incidencia por 100.000 hab.	Casos	Proporción de dengue grave %	Letalidad (%)	Serotipos reportados
Nicaragua	2.962,18	186.173	0,65	0,016	2
Belice	2.173,30	8.302	1,31	0,000	1-2
Honduras	1.230,71	112.708	17,24	0,160	1-2
Brasil*	737,40	2.226.865	0,06	0,035	1-2-3-4
El Salvador	428,42	27.470	0,39	0,051	2
Guatemala	285,20	50.432	0,22	0,131	1-2-3-4
Colombia	475,40	127.553	1,10	0,068	1-2-3
Jamaica	260,61	7.555	0,04	0,318	2-3
México	205,31	268.458	1,25	0,071	1-2-3-4
Costa Rica	189,78	9.400	0,12	0,000	1-2
Paraguay	171,25	11.811	SD	0,076	1-2-4

* Este valor se refiere a la tasa de incidencia del total de casos de dengue notificados en Brasil, en el periodo correspondiente.

Nota: Para el cálculo de la tasa de incidencia, la proporción de casos de dengue grave y la tasa de letalidad, se excluyeron los casos descartados.

SD: sin datos disponibles.

En México, después de la reintroducción de dengue en México con los brotes reportados en 1980 y 1997, se tuvieron cinco años de baja endemia (2000-2004). Entre 2010 y 2019, existieron cinco principales brotes en 2007, 2009, 2012, 2013 y el más reciente en 2019 con 41,505 casos confirmados al cierre del año, dato muy superior al compararlo con el año 2018 (12,706 casos) [Arredondo *et al.*, 2020].

En otros países también se tuvo un incremento, alcanzando hasta la SE 42 el mayor número de casos registrados en la historia (2,733,635). Estos datos son preocupantes ya que demuestran que,

a pesar de los esfuerzos para controlar el vector, el virus presenta un patrón cíclico de brotes que puede coincidir en otras regiones [Arredondo *et al.*, 2020].

2.1.7 Cuadro clínico

El Dengue se puede clasificar como una enfermedad febril infecciosa, de etiología viral, ocasionada por cualquiera de los cuatro serotipos diferentes del virus. La infección en humanos causa un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde una infección asintomática (cerca del 50% de los casos), a una fiebre autolimitada (FD, fiebre del Dengue o Dengue clásico) o las formas severas de la enfermedad (FHD, fiebre hemorrágica del dengue/SSD, síndrome de choque por dengue), que representan el 5% de los casos [Correa *et al.*, 2016].

Una presentación clásica de FD comprende un periodo de incubación de 3 a 7 días, con un posterior desarrollo abrupto de fiebre acompañada por otros síntomas y signos inespecíficos. Estos incluyen dolor frontal de cabeza, dolor retro-orbital, articular y muscular, náuseas, vómitos y debilidad, erupción en la piel, sensibilidad a la luz, etc. [Sánchez *et al.*, 2020]. No hay un grupo de signos clínicos específicos para diferenciar la FD de otras enfermedades virales agudas similares a la gripe común, de ahí la importancia de un adecuado diagnóstico.

La FHD/SSD son enfermedades severas que se diferencian principalmente de la FD por la presencia de una permeabilidad vascular aumentada. Estas formas de la enfermedad se caracterizan por fiebre ($\geq 38.5^{\circ}\text{C}$), trombocitopenia, manifestaciones hemorrágicas y evidencia de permeabilidad vascular incrementada con infiltración de líquido intravascular en espacios intersticiales, lo cual contribuye significativamente a la severidad de la enfermedad y al estado de shock con amenaza para la vida del paciente. La patogénesis de la FHD/SSD es compleja. El SSD es la forma más grave de dengue, necesariamente requiere tratamiento hospitalario, ya que el sistema circulatorio del paciente se ve muy comprometido [Simmons *et al.*, 2012].

2.1.8 Transmisión de DENV en la naturaleza

DENV en la naturaleza presenta dos distintos ciclos de transmisión: endémico y selvático. En el ciclo endémico, DENV circula entre humanos, quienes sirven como reservorio y hospederos de amplificación del virus, y están los vectores peridomésticos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. El vector se ha adaptado a la convivencia con los humanos, reproduciéndose en espacios donde se

pueden dar acumulaciones de agua en basureros, patios y jardines o en contenedores desechados. El ciclo comienza cuando el virus es inoculado en los seres humanos con la saliva del mosquito vector hembra, luego se localiza y se replica en diversos órganos diana [de Souza *et al.*, 2010] Posteriormente se libera en la sangre para infectar a los leucocitos y otros tejidos linfáticos Cuando un nuevo mosquito ingiere sangre de una persona infectada, este pasa al mosquito y se replica en el tubo digestivo, los ovarios, el tejido nervioso y el cuerpo graso, luego se difunde en la cavidad corporal y posteriormente infecta las glándulas salivales, donde se replica. El ciclo se cierra cuando otro hombre sano es picado [Dejnirattisai *et al.*, 2010].

Existen también un ciclo de transmisión selvático del virus del dengue en bosques y selvas de Asia y África que involucra a primates inferiores como hospederos. Sin embargo, el humano es el hospedero de excelencia debido a la alta viremia sistémica que se produce, eliminando la necesidad de un hospedero enzoótico para amplificar al virus. Otra característica es que el mosquito hembra puede pasar el virus a su prole mediante transmisión transovárica [Galan *et al.*, 2013].

Aunque la hembra del mosquito se alimenta durante el día, el riesgo de ser picado es más alto durante el inicio de la mañana y en la tarde antes de la puesta del sol, ya que son los horarios en los cuales las hembras se alimentan con mayor frecuencia [Galan *et al.*, 2013].

2.1.9 Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por DENV

Cuando existe la sospecha de infección por dengue en pacientes se debe realizar una biometría hemática completa. En caso de un descenso en la cuenta de leucocitos hace muy probable el diagnóstico de dengue. También una disminución rápida en el recuento de plaquetas, concurrente con un hematocrito que aumenta en relación con el basal es sugestiva de progresión a la fase crítica de fuga plasmática. Estos resultados deben ser corroborados con una prueba confirmativa de la infección por DENV, para poder dar un diagnóstico apropiado, ya que los resultados de la biometría pueden asociarse a otros padecimientos [Yung *et al.*, 2015].

DENV se encuentra entre los Arbovirus más difíciles de detectar y propagar, en gran parte debido a la no existencia de un buen modelo animal para su estudio. Entre los métodos disponibles para el diagnóstico se encuentra el aislamiento viral, el cual provee el resultado más específico, pero no siempre se cuenta con instalaciones aptas para el trabajo con cultivo viral. Líneas celulares de mosquito como la C6/36 de *A. albopictus* y de mamíferos son utilizadas con este objetivo.

Generalmente se utiliza suero para el aislamiento, pero también se puede realizar a partir de plasma, leucocitos, sangre completa y tejidos obtenidos de autopsia [Moriel *et al.*, 2014].

Las pruebas serológicas, como la inmunoadsorción enzimática (ELISA), son las más utilizadas en el diagnóstico de Dengue debido a que presentan ventajas sobre los métodos moleculares y el aislamiento, ya que son más económicas y fáciles de realizar. Estas técnicas detectan IgM a partir de una semana después de la infección, detectándose los mayores niveles entre la segunda y la cuarta semana, estos resultados evidencian una infección reciente. También detectan los niveles de IgG en el suero, estos tardan en más aparecer que la IgM pero duran años dando a entender que se trata de una infección antigua [Siew *et al.*, 2021].

Dentro de este grupo de pruebas está también la detección del antígeno viral NS1. Esta proteína es secretada al torrente sanguíneo y se han desarrollado diferentes dispositivos basados en su detección. Este tipo de prueba rápida solo muestra la presencia del antígeno NS1 de dengue, pero no discrimina serotipos, ni debe usarse como el único criterio para el diagnóstico [Muller *et al.*, 2017].

Las pruebas moleculares son otra opción para el diagnóstico de DENV, estas técnicas permiten obtener resultados desde cuantitativos hasta utilizarse para fenotipificar. Entre estas pruebas destacan todas las variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés: Polymerase chain reaction). Se han descrito varios ensayos de Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa (RT-PCR), que utilizan diferentes procedimientos de amplificación y van dirigidos a distintos genes. Los ensayos más usados son RT-PCR simples, ensayos de RT-PCR anidados, o ensayos de RT-PCR multiplex de un solo paso. Por ejemplo, se tiene la Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (RT-qPCR), que permite cuantificar el título viral en poco tiempo, además no requiere de electroforesis, ya que utiliza sondas fluorescentes unidas al blanco amplificado. Otra ventaja es que permite hacer ensayos “singleplex”, para detectar un solo serotipo por reacción, o “multiplex” identificando los 4 serotipos de una sola reacción [Tsai *et al.*, 2019].

2.1.10 Tratamiento

La primera vacuna contra dengue que recibió autorización por parte de las entidades reguladoras para su comercialización fue la CYD-TDV de Sanofi Pasteur. Dicha autorización se le otorgó por

primera vez en diciembre de 2015 en México para ser utilizada en personas de 9 a 45 años que vivían en zonas endémicas. Se trata de una vacuna recombinante tetravalente con virus vivos, que se administra con una pauta de tres dosis a intervalos de seis meses (al inicio, a los 6 y a los 12 meses). Sin embargo, con el uso de la vacuna se observó un aumento del riesgo de hospitalización y de dengue grave en individuos seronegativos (personas que no han padecido la enfermedad) [Sridhar *et al.*, 2018].

Por otro lado, el tratamiento de las formas no complicadas de la enfermedad, radica en hacer reposo, mantener hidratado al paciente y el uso de analgésicos para controlar los síntomas. Además, se debe observar cualquier cambio que pueda indicar complicaciones de la enfermedad para actuar de manera rápida y ver si se requiere de cuidados hospitalarios [Sánchez *et al.*, 2020].

2.2 Biosensores

Los biosensores son dispositivos compactos que permiten el reconocimiento de un componente biológico, asociado a un sistema de transducción que procesa la señal producida por la interacción del elemento de reconocimiento y el analito. Esta interacción se basa generalmente en la afinidad, del elemento biológico inmovilizado con la molécula de interés en el analito. Estos dispositivos pueden clasificarse dependiendo del tipo de interacción que se establece (biocatalítica o Bioafinidad), el método utilizado para detectar la interacción (directa o indirecta), la naturaleza del elemento de reconocimiento (ácidos nucleicos, anticuerpos, enzimas, tejidos, células, etc.) o del sistema de transducción (electroquímico, óptico, piezoeléctrico, termométrico y nanomecánico). Teniendo en cuenta la amplia diversidad de estos dispositivos, es apropiado enfocarse en los inmunosensores electroquímicos, que serán los utilizados en este estudio [Hassanpour *et al.*, 2018].

2.2.1 Inmunosensor electroquímico

Los inmunosensores son aquellos cuyo reconocimiento se basa en la unión antígeno-anticuerpo. Los antígenos (Ag) son sustancias extrañas al organismo y por lo general son dañinas, la presencia de estos desencadena la producción de anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Ig), como también se conocen. Los Ac son un grupo de glicoproteínas del sistema inmune que se unen a los Ag para marcarlos y destruirlos posteriormente. Existen cinco tipos de Ac o Ig designadas como IgG, IgA,

IgM, IgD e IgE, que se diferencian entre sí en sus propiedades fisicoquímicas y serológica [Hardeep *et al.*, 2018, Jazib *et al.*, 2017].

Para el análisis electroquímico en un inmunosensor la inmunoglobulina más utilizada es la IgG. La estructura que presenta su molécula es de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H), unidas por puentes disulfuro y otras uniones de tipo no covalente. Presenta región variable (V) en la secuencia de aminoácidos de los extremos amino terminal (VH, VL) y regiones constantes (C) en los extremos carboxilo en cada una de las cadenas (CH, CL). Las IgG constan, además, de tres fragmentos (figura 4), uno denominado Fc, que contiene el alotipo y determina la actividad biológica y la clase de cadena pesada, y dos denominados Fab, que contienen el idiotipo y es por donde la molécula se une al antígeno [Abbas y Lichtman 2004, Fernández 2015].

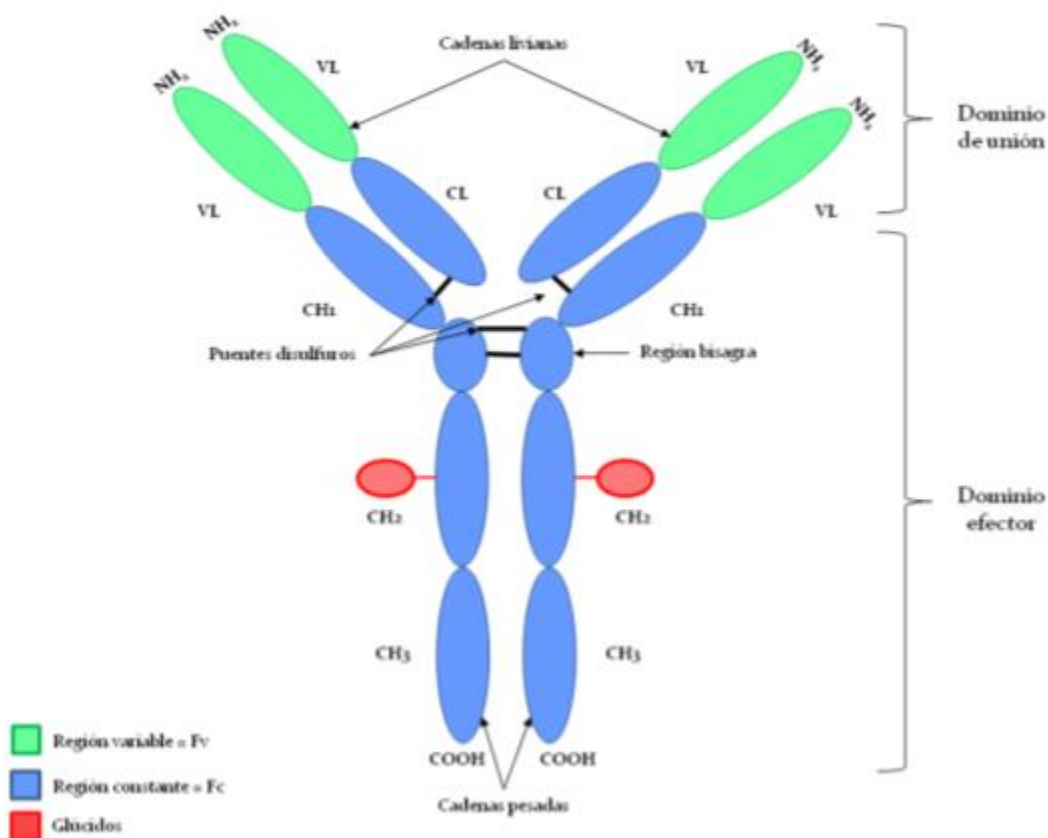


Figura 4. Estructura de IgG Fuente: Kergaravat 2013

El termino electroquímico se debe a que el transductor en este caso es un conjunto de electrodos diseñados para la detección electroquímica. Existen cuatro tipos de sensores electroquímicos que

son: conductimétricos, potenciométricos, amperométricos e impedimétricos, de acuerdo con que, si los cambios que detectan son en la conductividad, en el potencial, en una corriente generada o en la impedancia. En la figura 5 se puede ver un esquema general de un biosensor electroquímico. Este tipo de sensores muestran prometedoras ventajas con respecto a los otros, por ejemplo, la naturaleza interfacial de las medidas electroquímicas posibilita la monitorización de volúmenes extremadamente pequeños de muestra, lo que los hace adecuados para la monitorización “in vivo”. También son altamente sensibles, sencillos, de fácil manejo, bajo coste y fácil miniaturización [Kaur *et al.*, 2018]. Estas ventajas favorecen el uso de estos dispositivos para el diagnóstico en puntos primarios de atención.

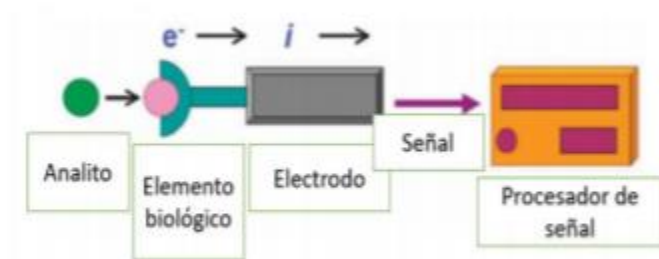


Figura 5. Estructura de un biosensor electroquímico Ronkainen *et al.*, 2010

Las técnicas electroquímicas miden propiedades eléctricas de una disolución en una célula o celda electroquímica. Una de las desventajas que pudiera presentar esta medición es respecto a las interferencias que se pudieran aparecer, pero como los inmunosensores se basan en la unión específica antígeno-anticuerpo, la diferencia de potencial en teoría debe deberse solamente a la unión [Ronkainen *et al.*, 2010, Espinosa 2019]

El arreglo de electrodos más utilizado en estas celdas electroquímicas incluye el electrodo de trabajo que es donde ocurre la reacción, un contraelectrodo y un electrodo de referencia. La función del contraelectrodo es lograr que la corriente circule entre este y el electrodo de trabajo evitando que pase por el electrodo de referencia y por tanto que este se polarice. En el electrodo de referencia el potencial debe ser constante durante la medición.

2.2.2 Voltamperometría Cíclica

La voltamperometría es una técnica versátil que permite estudiar propiedades tanto cinéticas como termodinámicas, a través de la información gráfica que se obtiene de intensidad de corriente contra potencial (i-E). [Chen 2013, Espinosa 2019]

Existen varios tipos de voltamperometría entre los que se incluyen: voltamperometría de barrido lineal, voltamperometría cíclica, voltamperometría hidrodinámica, voltamperometría de pulso diferencial, voltamperometría de onda cuadrada, voltamperometría de decapado, etc. Una de las voltamperometrías más utilizadas para las mediciones electroquímicas en un inmunosensor es la voltamperometría cíclica (VC). Durante la 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 el sentido del barrido del potencial cambia hasta que el potencial vuelve al valor inicial, o bien a otro potencial distinto. En la figura 6 se muestra el resultado de la VC y sus magnitudes físicas, el cual se denomina voltamperograma cíclico [Baeza *et al.*, 2011].

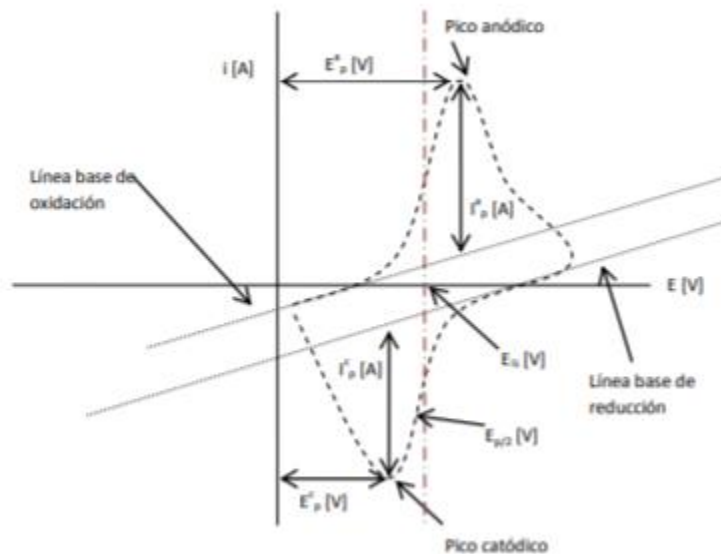


Figura 6. Magnitudes de un voltamperograma cíclico de acuerdo con el convenio planteado por la IUPAC

E_p^- = potencial de pico catódico

E_p^a = potencial de pico anódico

i_p^c = intensidad de corriente de pico catódico

i_p^a = intensidad de corriente de pico anódico

El comportamiento en un voltamperograma se debe al equilibrio que se establece entre las especies del par redox, este efecto es explicado por la ecuación de Nernst (figura 7) 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.

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

Figura 7. Ecuación de Nernst. Donde R: Es la constante universal de gases, T: es la temperatura, n es el número de electrones y F es la constante de Faraday

Con la información que nos brinda la ecuación de Nernst se puede predecir cómo responderá un sistema a un cambio de concentración de especies en solución o un cambio en el potencial del electrodo [Elgrish *et al.*, 2018]. Los resultados del voltamperograma permite examinar diferentes parámetros como el potencial redox $E^0 = E_{ap} + E_{cp} / 2$, la relación pico-corriente = i_{ap} / i_{cp} , la diferencia de potencial $\Delta E = E_{cp} - E_{ap}$ y la corriente de reducción (I_{pc}) que nos permite determinar mediante la ecuación $\Delta I_{cp} = I_{cp}^0 - I_{cp_{muestras}}$, si existe diferencia en los picos de corriente de reducción después de que ocurre la unión antígeno-anticuerpo [Elgrish *et al.*, 2018].

2.2.4 Inmunosensores para el diagnóstico de enfermedades

Existen varias investigaciones que han mostrado buenos resultados con el uso de los inmunosensores como método de diagnóstico. Entre las que destacan la detección de agentes virales. Como por ejemplo, un estudio realizado por Bai *et al.*, 2012 detectó el virus de la influenza aviar H5N1 en muestras de saliva de aves de corral, mediante un biosensor portátil de Resonancia de Plasmón de Superficial, pero también se ha logrado la detección del virus H1N1 en humanos, en 2010 por Endo *et al.*, mediante reflectometría utilizando anticuerpos inmovilizados de nano

impresión flexible con un biosensor de cristal fotónico bidimensional, el cual demostró un límite de detección 1 ng/mL^{-1} .

También existen varios trabajos enfocados a dengue, como la investigación de Arshad *et al.*, 2020, que desarrollaron un sensor impedimétrico basado en MIP para detectar biomarcadores de fiebre del dengue, pudiendo detectar concentraciones de NS1 tan bajas como 0.3 ng / mL y en muestras de suero humano se obtuvieron recuperaciones satisfactorias que variaban del 95 al 97,14% con desviaciones estándar de menos del 5%. Otro trabajo del mismo año de Omar *et al.*, dirigido a la detección de la proteína E de DENV-2, en este caso mediante un sensor de resonancia de plasmón de superficie basado en una capa delgada autoensamblada de dendrímero de poliamidoamina-óxido de grafeno reducido, pudo detectar con éxito la concentración más baja de proteínas E de DENV-2 de $0,08 \text{ pM}$ en 8 min, según la conclusión de los autores. El sensor también mostró una alta selectividad hacia las proteínas E de DENV-2.

También con la reciente pandemia por SARS-CoV-2 se han trazado estrategias de todo tipo para controlar la enfermedad y los sensores prometen ser una alternativa para el diagnóstico, como lo demostraron investigadores Raziq *et al.*, 2021 con el desarrollo de un sensor electroquímico portátil basado en MIP para la detección del antígeno SARS-CoV-2.

El uso de los biosensores se aplica también a la detección de antígenos bacterianos y no solo virales. Tal es el caso del estudio realizado por Diouani *et al.*, en 2016 detectándose la proteína bacteriana ESAT-6 perteneciente a la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* mediante una reacción antígeno-anticuerpo utilizando el anticuerpo monoclonal anti-ESAT-6, lo que puede dar como resultado avances importantes en el diagnóstico exitoso de la tuberculosis.

Escherichia coli es otra bacteria para la que también se han desarrollado biosensores para su detección, como ejemplo se puede mencionar el estudio realizado por Barreiros dos Santos *et al.*, en 2013, en el cual se utilizó la técnica de formar SAMS en la superficie del biosensor para inmovilizar los anticuerpos y detectar a las bacterias mediante EIS con un límite de detección de 2 UFC/mL .

Pese a que se han desarrollado inmunosensores electroquímicos para la detección de disimiles patógenos, incluyendo dengue, todavía no se han explotado todas las posibilidades de estos dispositivos. Las ventajas que brindan sobre otros métodos de diagnóstico es que requieren de poca

muestra, son portables, presentan alta sensibilidad dada por la unión específica Ag-Ac También, los electrodos serigrafiados presentan un bajo costo y pueden ser producidos en cantidades considerable, lo cual permite que se puedan desechar después de hacer cada medición.

CAPÍTULO 3

3.1 Hipótesis

La proteína E del virus del dengue puede ser detectada por un inmunosensor electroquímico por voltamperometría cíclica.

3.2 Objetivo general

Detectar la proteína E del virus del dengue, mediante un inmunosensor voltamperométrico utilizando un electrodo serigrafiado de oro.

3.3 Objetivos específicos

- 1) Modificar la superficie del electrodo de trabajo para la inmovilización del anticuerpo contra *Flavivirus 4G2*
- 2) Evaluar la reacción antígeno-anticuerpo en el inmunosensor por voltamperometría cíclica
- 3) Detectar la proteína E en virus aislados de pacientes, mediante la reacción antígeno-anticuerpo en el biosensor por voltamperometría cíclica

3.4 Metas

- 1) Obtener el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada
- 2) Presentar el trabajo en un congreso nacional y/o internacional.

CAPÍTULO 4

Materiales y métodos

4.1 Equipo

Microelectrodo serigrafiado de oro con contra electrodo de oro y electrodo de referencia de plata.
Marca Metrohm DroSens

Potenciostato galvanostato. Marca Biologic SP-150. Disponible en: Laboratorio de tratamientos superficiales y fotocátalisis.

4.2 Reactivos

Cepas de dengue: H-159911(DENV 1), H-17247 (DENV 2) y H-87 (DENV 3). Todas fueron aisladas a partir de suero de pacientes virémicos, en cultivo de C6/36 y donados por la Dra. María Alba Loroño Pino (tabla 2).

Tabla 2. Características de los virus prototipos empleados

VIRUS	CEPA	AÑO	LUGAR	GeneBank ID
DENV 1	H-159911	1944	Hawaii	DQ672563.1
DENV 2	H-17247	1972	Nueva Guinea	M29095.1
DENV 3	H-87	1957	Filipinas	M93130.1

También se utilizaron cepas de Dengue 1 y 2 aisladas de pacientes virémicos del estado de Nuevo León, donadas por el Dr. Daniel Arellano Soto.

Cepa de Chikungunya, donada por el Dr. Daniel Arellano Soto.

Anti-flavivirus (D1-4G2-4-15 (4G2)) Marca: Novusbio, donado por departamento de Bioquímica y biología molecular de la Facultad de Ciencias Médicas de la UANL

Albúmina sérica bovina 1% (p / v)

Buffer de fosfatos 10mM pH 7.4

Nitrato de potasio 1 M

Ácido clorhídrico 1 M

Ácido 11-mercaptoundecanoico 1.0 mmol L⁻¹

1-etil-3-(3- diaminopropil) carbodiimida 0.4 mol L⁻¹

N-hidroxisuccinimida 0.4 mol L⁻¹

Agua desionizada

4.3 Metodología

Para evaluar la detección de Dengue mediante el uso del inmunosensor propuesto, desarrollamos una metodología conformada por varios pasos principales. Primero se modificó la superficie de oro del electrodo de trabajo, adicionando un inmovilizador. Luego se añadió el anticuerpo 4G2 anti-flavivirus para funcionalizar el electrodo mediante esta inmovilización. Con el objetivo de bloquear los sitios que no se ocuparon con el anticuerpo 4G2 se adicionó albúmina sérica bovina. Por último, se agregaron los antígenos de dengue y se evaluó la reacción antígeno-anticuerpo por voltamperometría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica. En la figura 8 se representa la estrategia general.

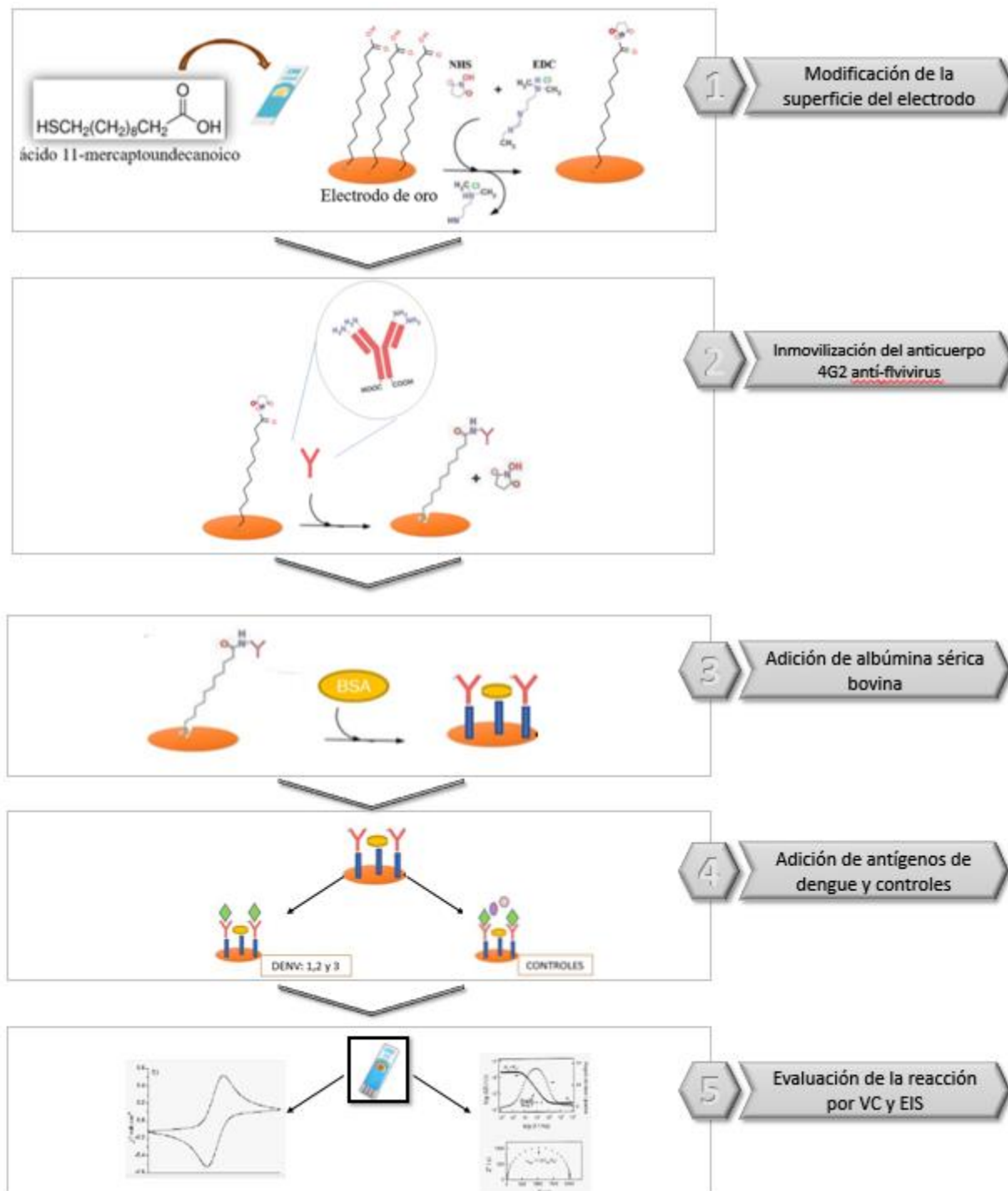


Figura 8. Metodología seguida para la modificación de superficie de oro.

4.4 Modificación de la superficie del electrodo

El sensor utilizado consiste en una laminilla con un diseño clásico de tres electrodos: un electrodo de trabajo de oro, un electrodo de referencia de plata y un contraelectrodo de oro. Los tres electrodos son serigrafiados sobre un sustrato de cerámica y una capa aislante es impresa sobre el sistema de electrodos, dejando los contactos eléctricos y el área de trabajo descubierta (figura 9). El electrodo de trabajo tiene un diámetro de 4 mm, ideal para utilizar volúmenes inferiores a 50µl.



Figura 9. Laminilla de electrodos marca Metrohm DroSens.

Primeramente, se lavó el electrodo de trabajo con agua desionizada y etanol absoluto y se dejó secar a temperatura ambiente. Con el propósito de modificar la superficie del electrodo se adecuó la metodología descrita por Cecchetto *et al.*, 2017, una vez secos los electrodos se les añadió 50µl de ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) a una concentración de 1.0 mmol L⁻¹ en una solución de etanol absoluto y se dejó reaccionar durante 16 horas a 4°C, en una cámara húmeda para evitar la desecación del electrodo de trabajo, luego se enjuagó con agua desionizada y etanol absoluto para eliminar los excesos de 11-MUA.

El 11-MUA es un alcanotiol, los grupos tioles que presenta adsorben sobre la superficie del oro por interacciones intermoleculares y forman estructuras altamente organizadas conocidas como monocapas autoensambladas (SAM por sus siglas del inglés). La figura 10 muestra la reacción formal de la adsorción.

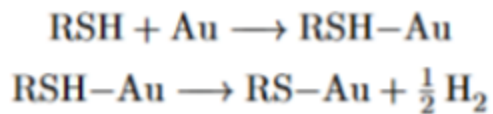


Figura 10. Esquema general de la reacción entre el oro y los tioles.

En la primera etapa, las moléculas de tioles (RSH) se adsorben sobre la superficie de Au y luego pierden el átomo de H del grupo tiol, generando el radical tiol (RS) para formar una unión (S–Au). Este es considerado un enlace covalente [Pensa 2011, Frederix 2003].

El próximo paso para conseguir la inmovilización del Ac es activar los grupos terminales de la SAM mediante la adición en el electrodo de trabajo de 25µl de una solución de 1-etil-3-(3-diaminopropil) carbodiimida (EDC) a 0.4 mol L⁻¹ y 25µl de N-hidroxisuccinimida (NHS) a 0.4 mol L⁻¹. La inmovilización se logra por la formación de un enlace covalente con la amina primaria del Ac y el éster formado por la activación de la superficie con NHS y EDC. Para que ocurra esta reacción de activación se incubaron las laminillas bajo las mismas condiciones del paso anterior, y luego de 30 min se lavaron con Buffer fosfato salino (PBS) de pH7.4 y se adicionó en cada electrodo 50 µl a 0.1 µg/ml de anti-flavivirus 4G2, el cual es un Ac monoclonal que reconoce la proteína E de los *Flavivirus*, que se encuentra expuesta en la superficie de DENV y así dirigir el mecanismo de detección de la laminilla a la partícula viral completa en sangre periférica. Posteriormente, se incubó nuevamente por 16 horas a 4°C en cámara húmeda.

Los anticuerpos no unidos se eliminan mediante un lavado con PBS y con la finalidad de bloquear los sitios donde no se haya unido el anticuerpo, se adiciona una solución de Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 1% (p / v) y se incuba a 4° en cámara húmeda durante 1 hora; así se evitan uniones inespecíficas al momento del análisis de las muestras. Luego de ese tiempo se hizo un lavado con PBS para eliminar excesos. En la figura 11 se observa la metodología seguida para la modificación de la superficie de oro.

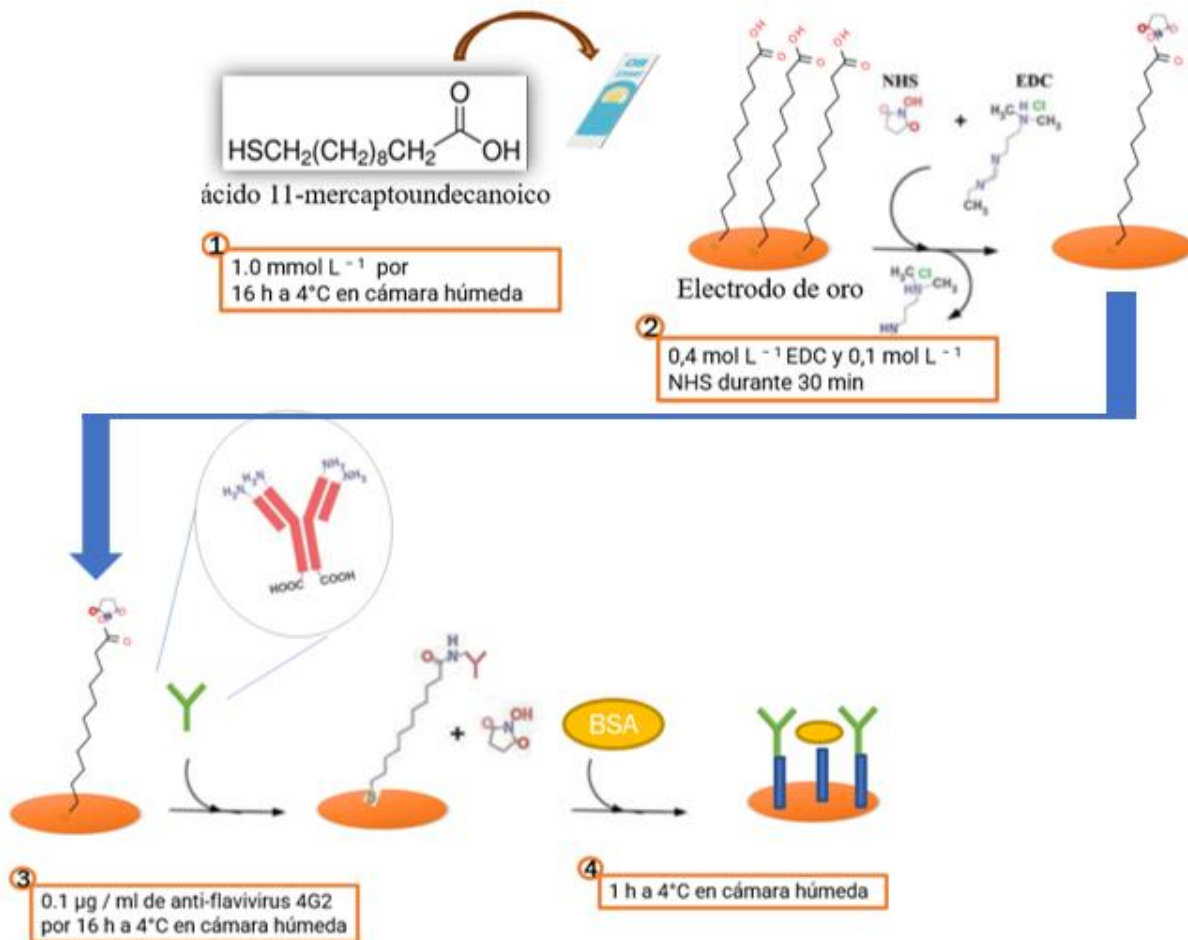


Figura 11: Esquema de la metodología para la modificación de la superficie de oro.

4.5 Adición de antígenos

Para comprobar el funcionamiento del sensor se llevó a cabo la reacción antígeno-anticuerpo añadiendo en el electrodo de trabajo $25 \text{ } \mu\text{l}$ de las cepas de DENV1, 2 y 3 y dos cepas de virus aislados de pacientes una muestra de DENV 1_p y la otra de DENV 2_p. Se utilizaron 3 diferentes diluciones de antígeno (1:5, 1:10 y 1:50) para DENV1, 2 y 3, para los aislados de pacientes se hicieron las mismas diluciones en el caso de DENV 1_p, pero para DENV 2_p solo se realizaron 2 (1:5 y 1:10). Después se dejó que transcurriera la reacción durante media hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego se realizó el último lavado con PBS y se guardaron a 4°C hasta que se realizaron las mediciones correspondientes.

4.6 Controles

Se adicionaron varios controles durante el desarrollo de la metodología con la finalidad de asegurar la validez de los resultados obtenidos

1. Laminilla desnuda (**ED**); se lavó la laminilla con etanol absoluto y agua desionizada y no se le adicionó ningún otro reactivo
2. Laminilla con 11-MUA, EDC y NHS (electrodo modificado **EM**); se realizó el procedimiento hasta la adición de EDC y NHS, luego se lavó con agua desionizada y se guardó a 4°C en cámara húmeda hasta realizar las mediciones
3. Laminilla con 11-MUA, EDC, NHS y anticuerpo 4G2 (**EM+Ac**); se realizó el procedimiento hasta la adición de anti-flavivirus 4G2, luego se lavó con PBS y se guardó a 4°C en cámara húmeda hasta realizar las mediciones
4. Laminilla con 11-MUA, EDC, NHS, anticuerpo 4G2 y BSA (**EM+Ac+BSA**); se realizó el procedimiento hasta la adición de anti-flavivirus 4G2, luego se lavó con PBS y se guardó a 4°C en cámara húmeda hasta realizar las mediciones
5. Laminilla con 11-MUA, EDC, NHS, anticuerpo 4G2, BSA y suero (**SUERO**); se realizó el procedimiento completo de la modificación de la superficie del electrodo, posteriormente se adicionaron 25µl de suero de persona sana para comprobar que el Ac no se une a ninguna otra molécula en una matriz compleja. Luego se guardó a 4°C en cámara húmeda hasta realizar las mediciones
6. Laminilla con 11-MUA, EDC, NHS, anticuerpo 4G2, BSA y cepa de Chikungunya (**CHIKV**); se realizó el procedimiento completo de la modificación de la superficie del electrodo, posteriormente se adicionaron 25µl de una cepa de Chikungunya donada por el departamento de Bioquímica y biología molecular de la Facultad de Medicina, UANL, esto se realizó con el objetivo de comprobar la especificidad del Ac ya que a pesar de que Chikungunya es un virus transmitido por artrópodos no pertenece a los *Flavivirus*, por tanto, no se esperaría una unión Ag-Ac. Luego se guardó a 4°C en cámara húmeda hasta realizar las mediciones

4.7 Medición de voltamperometría cíclica

Las mediciones electroquímicas de voltamperometría cíclica se llevaron a cabo agregando en el electrodo de trabajo una solución que contiene 5mM de $K_4 [Fe(CN)_6]$ y 5mM $K_3 [Fe(CN)_6]$ que actúa como sonda redox y 1M de KNO_3 como electrolito soporte, todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente en un potenciostato galvanostato marca Biologic SP-150, los parámetros fueron controlados mediante el software EC-LAB 11.31, al finalizar, los resultados del voltamperograma cíclico de potencial contra corriente, fueron arrojados por este mismo software.

Las condiciones de medición que se aplicaron a la voltamperometría fueron: voltaje 100mV/s, potencial $-0.5-0.6V$ y se realizaron 3 ciclos consecutivos. Durante esta prueba la corriente se mide en el electrodo de trabajo. Para establecer un 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 del metal y la solución, permitiendo que se aplique 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.

Los resultados de las mediciones reflejan lo que ocurre con la solución en el electrodo de trabajo durante el barrido. Se parte de un valor de potencial en donde no ocurre la electrólisis, hasta que llega a un valor donde comienza la electrólisis y a partir de ese valor la corriente ($i_{catódica}$) crece exponencialmente. Conforme se sigue realizando el barrido de potencial la concentración de la especie en disolución disminuye cerca de la superficie del electrodo, porque la reacción de transferencia de electrones es mucho más rápida que la velocidad de difusión y ésta última es el paso determinante, por tanto, la concentración de $K_3 [Fe(CN)_6]$ se agota y es cuando la corriente llega a un máximo. Posteriormente, se sigue realizando el barrido de potencial, ahora en condiciones limitadas, en respuesta a esto, la corriente disminuye debido a que no hay más compuesto que pueda llegar a la superficie del electrodo. Llegando a un punto donde comienza la oxidación de $K_4 [Fe(CN)_6]$, dando como resultado el compuesto inicial y se continua con el

barrido hasta que la corriente ($i_{\text{anódica}}$) también llega a un máximo [Monarrez 2020]. La reacción anteriormente descrita representa el caso puntual del electrodo sin modificar, las magnitudes físicas obtenidas permiten contar con un modelo cinético donde no influyen las moléculas de la modificación de la superficie del electrodo, ni la unión antígeno-anticuerpo, Luego de realizar las respectivas modificaciones en la superficie del electrodo y comprobar la reacción antígeno-anticuerpo los parámetros cinéticos varía con respecto al electrodo sin modificación por interferencias en la transferencia electrónica.

4.8 Disposición de residuos

Durante la metodología desarrollada no se generaron residuos que requirieran algún manejo especial, se siguió el Sistema Globalmente Armonizado en cumplimiento a al NOM018-STP-2015 y el Programa de Seguridad para el Manejo de Sustancias Químicas Peligrosas, establecido por el departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

CAPÍTULO 5

Resultados

6.1 Modificación de la superficie del electrodo de oro

La modificación de la superficie del electrodo de trabajo se realizó como se describe en el acápite 4.4.1, posteriormente se midieron las VC, estos resultados se reflejan en la tabla 3 los valores de la diferencia entre potenciales de pico (ΔE), el potencial redox y la relación pico corriente se calcularon según las ecuaciones correspondientes (ver subíndice 2.2.2)

Tabla 3. Parámetros de las voltamperometrías cíclicas de la modificación del electrodo.

Laminilla	Ipa (μA)	Epa (V)	Ipc (μA)	Epc (V)	ΔE	Potencial Redox	Relación pico corriente
ED	144.942	0.214	132.447	0.101	0.113	1.58E-01	1.09E+00
EM	109.956	0.185	110.789	0.0922	0.0928	1.39E-01	9.92E-01
Ac	70.805	0.205	66.64	0.104	0.101	1.55E-01	1.06E+00
BSA	65.807	0.207	60.809	0.0818	0.1252	1.44E-01	1.08E+00

Se realizaron 3 ciclos de voltamperometría cíclica por laminilla cada uno demoró 1min aproximadamente. La laminilla desnuda (figura 12) muestra una curva típica del comportamiento del par redox ferro/ferricianuro de potasio, este electrodo funciona como un blanco perfecto para comparar las alteraciones en los voltamperogramas, durante la modificación en la superficie del electrodo y posteriormente con las mediciones de las muestras y de los controles.

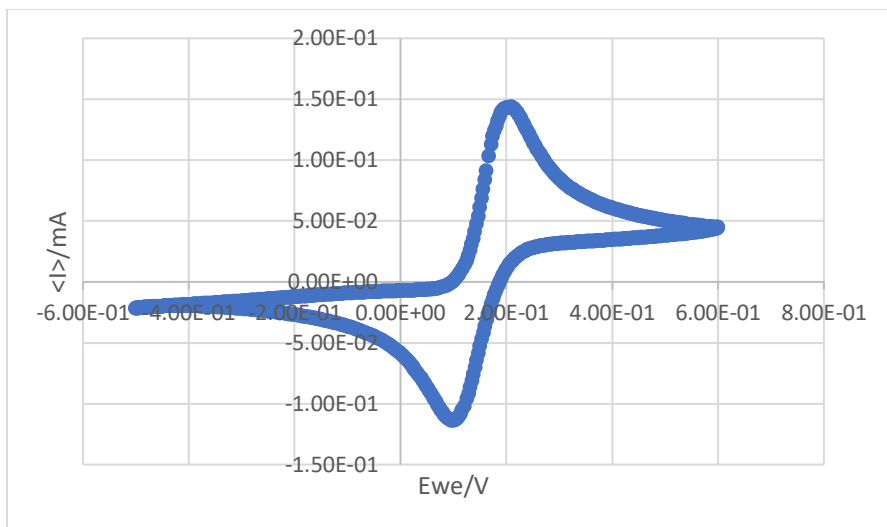


Figura 12. Voltamperograma cíclico de la laminilla desnuda, sin modificación de la superficie del electrodo.

La figura 13 refleja los voltamperogramas cíclicos de los pasos obtenidos de la modificación del electrodo. Se puede observar en los voltamperogramas una disminución en los picos de corriente anódica ($I_{pa}^{\text{Desnuda}} = 144.737 \mu\text{A}$; $I_{pa}^{\text{EM}} = 118.75 \mu\text{A}$; $I_{pa}^{\text{EM+Ac}} = 69.149 \mu\text{A}$; $I_{pa}^{\text{EM+Ac+BSA}} = 61.111 \mu\text{A}$) y de igual manera en los picos de corriente catódica ($I_{pc}^{\text{Desnuda}} = 138.158 \mu\text{A}$; $I_{pc}^{\text{EM}} = 112.5 \mu\text{A}$; $I_{pc}^{\text{EM+Ac}} = 74.468 \mu\text{A}$; $I_{pc}^{\text{EM+Ac+BSA}} = 55.556 \mu\text{A}$), debido a que la transferencia electrónica se ve comprometida a medida que se unen reactivos a la SAM, por tanto los resultados demuestran que se realizó una correcta modificación de la superficie del electrodo.

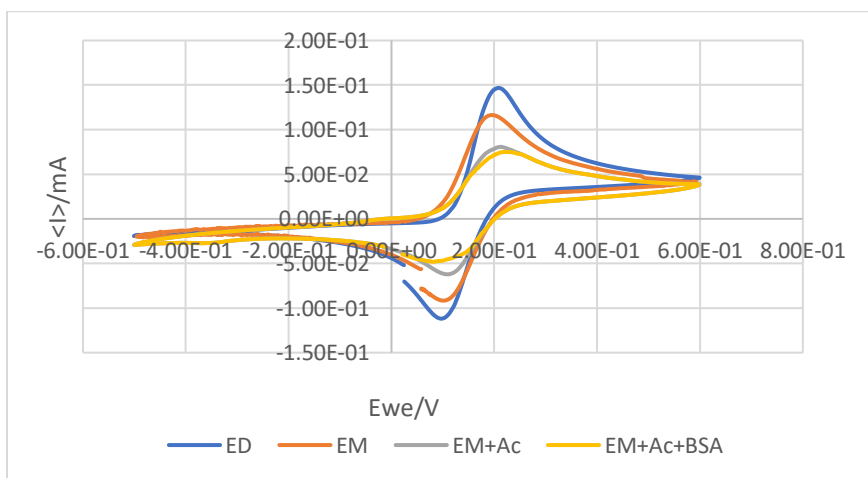


Figura 13. Voltamperogramas cíclicos de cada paso de la modificación de la superficie del electrodo.

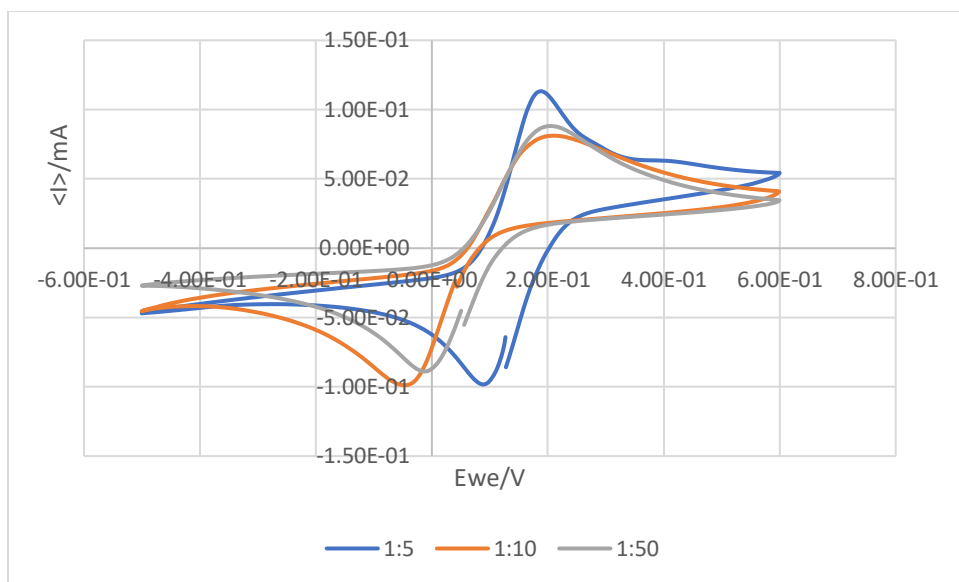
6.2 Comprobación de la reacción antígeno-anticuerpo DENV1

Los resultados obtenidos tras agregar las tres diluciones de DENV1 en los electrodos para efectuar la unión antígeno-anticuerpo, se muestra en la tabla 4.

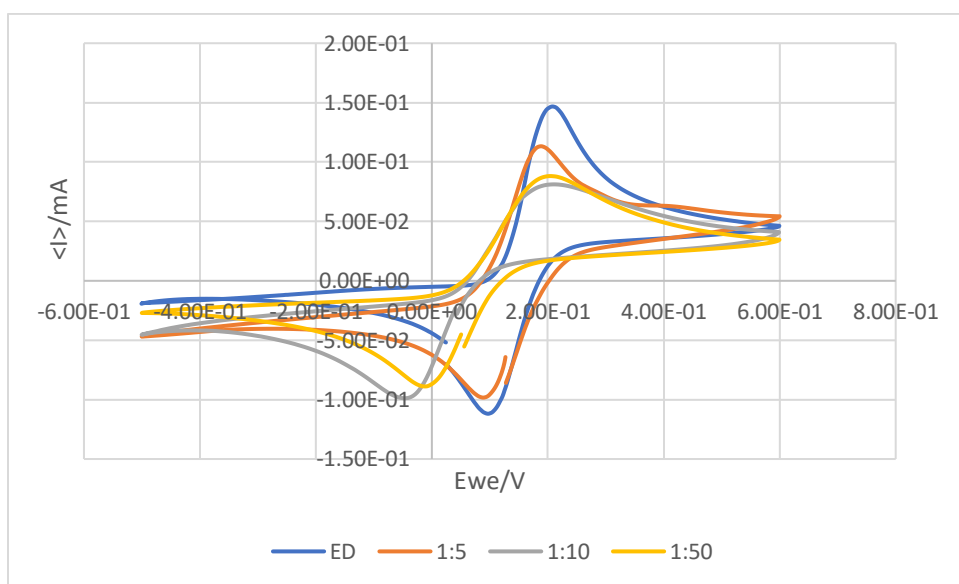
Tabla 4. Parámetros de las voltamperometrías cíclicas de la reacción antígeno-anticuerpo DENV1

Dilución	Laminilla	Ipa (μA)	Epa (V)	Ipc (μA)	Epc (V)	ΔE	Potencial Redox	Relación pico corriente
1:5	DENV1	124.95	0.192	109.123	0.0946	0.0974	1.43E-01	1.15E+00
1:10	DENV1	91.63	0.198	108.29	-0.0415	0.2395	7.83E-02	8.46E-01
1:50	DENV1	95.795	0.212	95.795	-0.0043	0.21634	1.04E-01	1.00E+00

Los picos de corriente catódica disminuyen a medida que se encuentra más diluido el antígeno ($I_{pc}^{1:5} = 109.123\mu\text{A}$; $I_{pc}^{1:10} = 108.29 \mu\text{A}$; $I_{pc}^{1:50} = 95.795\mu\text{A}$). La variación de las corrientes anódicas no sigue un patrón de disminución correspondiente al aumento o disminución de la dilución; ya que se obtuvo que en la dilución 1:10 la $I_{pa}^{1:10} = 91.63 \mu\text{A}$, siendo menor a la dilución 1:50 la $I_{pa}^{1:50} = 95.795 \mu\text{A}$. Aunque cabe destacar que la I_{pa} de la dilución 1:5 es mayor, al igual que sucedió con las corrientes catódicas. Las representaciones de los voltamperogramas demuestran estos resultados (figura 14 A). Además, se puede notar un desplazamiento en los potenciales catódicos, indicando la unión del antígeno al electrodo. En cuanto a la comparación del electrodo no modificado con la detección del antígeno de DENV 1, se pudo confirmar una disminución en las corrientes anódicas y catódicas, como se muestra en la figura 14B, este resultado es ideal ya que permite detectar el analito a distintas concentraciones, incluso las más bajas.



A.



B.

Figura 14. Voltamperograma cíclico de la reacción antígeno-anticuerpo A: comparación entre las diluciones 1:5, 1:10 y 1:50 de DENV1, B: comparación entre las diluciones 1:5, 1:10 y 1:50 de DENV1 y el electrodo desnudo.

Es importante mencionar que además se realizó un ensayo con una cepa de DENV1 aislada de pacientes de Nuevo León (DENV1paciente), con las diluciones 1:5 y 1:10, con el objetivo de comparar estas mediciones con las obtenidas para DENV1. Se observa en la tabla 5 una disminución en la corriente anódica al aumentar la dilución ($I_{pa}^{1:5} = 95.795 \mu\text{A}$ y $I_{pa}^{1:10} = 68.306 \mu\text{A}$) y en cuanto a las corrientes catódicas se ve un aumento al aumentar la dilución ($I_{pc}^{1:5} = 82.467 \mu\text{A}$ y $I_{pc}^{1:10} = 166.6 \mu\text{A}$).

Tabla 5. Parámetros de las voltamperometrías cíclicas de la reacción antígeno-anticuerpo DENV1

Dilución	Laminilla	Ipa (μA)	Epa (V)	Ipc (μA)	Epc (V)	ΔE	Potencial Redox	Relación pico corriente
1:5	D1paciente	95.795	0.0806	82.467	-0.0654	0.146	0.0076	1.161616
1:10	D1paciente	68.306	0.107	166.6	-0.0722	0.1792	0.0174	0.41

En la figura 15 se obtuvo el comportamiento de los voltamperogramas correspondientes a DENV1paciente, en este ensayo no se apreciaron los picos de corrientes anódicas y catódicas tan definidos como en los voltamperogramas anteriores, es posible que la causa de este fenómeno sea que en el electrodo quedaron moléculas que causaron interferencias.

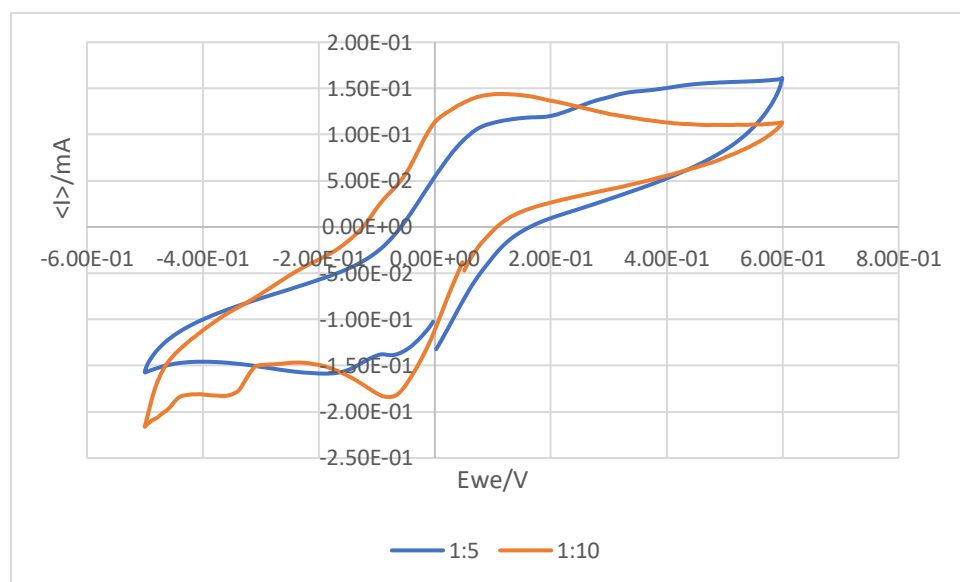


Figura 15. Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la reacción antígeno-anticuerpo de las diluciones 1:5, 1:10 de DENV1 paciente.

6.3 Comprobación de la reacción antígeno-anticuerpo DENV2

Para DENV 2 se realizaron tres diluciones para medir la VC, las diluciones 1:5 y 1:10, al igual que para el caso de DENV 1 paciente mostraron curvas con picos de corriente que muestran presencia de interferencias en el reconocimiento del antígeno o que las partículas de dengue unidas al anticuerpo presentan un volumen considerable, lo que puede impedir la transferencia de carga

sobre el electrodo de trabajo (figura 16). En el caso de la dilución 1:50 si se observan claramente los picos de las corrientes anódicas y catódicas y son menores a las del electrodo desnudo. Evidenciando que ocurre la reacción antígeno-anticuerpo esperada.

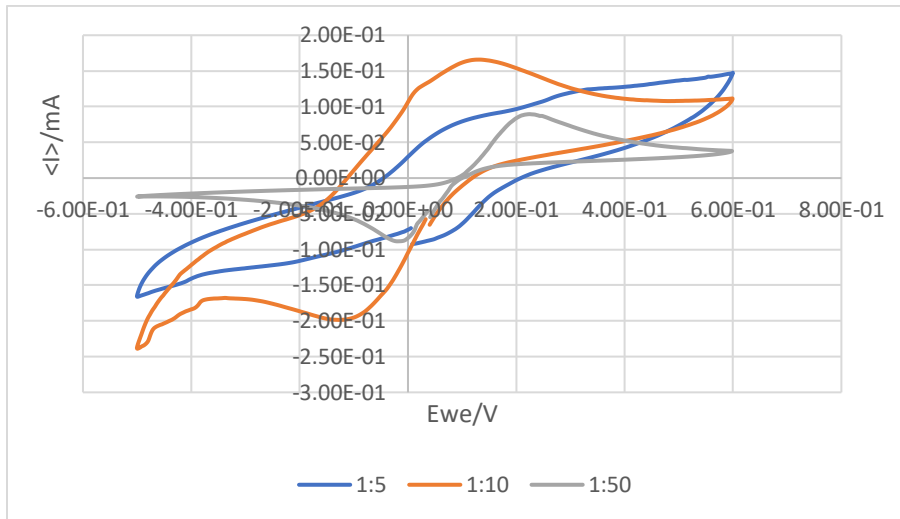


Figura 16. Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la reacción antígeno-anticuerpo de las diluciones 1:5, 1:10 y 1:50 de DENV2

También para DENV 2 se realizó un ensayo con muestras aisladas de pacientes de Nuevo León (DENV 2paciente), solamente para una dilución de 1:10. En este resultado, aparecen al igual que los obtenidos para DENV 2 una interferencia y las corrientes ($I_{pa}= 163.268\mu\text{A}$ e $I_{pc}=164.934 \mu\text{A}$) son mayores que las del electrodo sin modificar (figura 17).

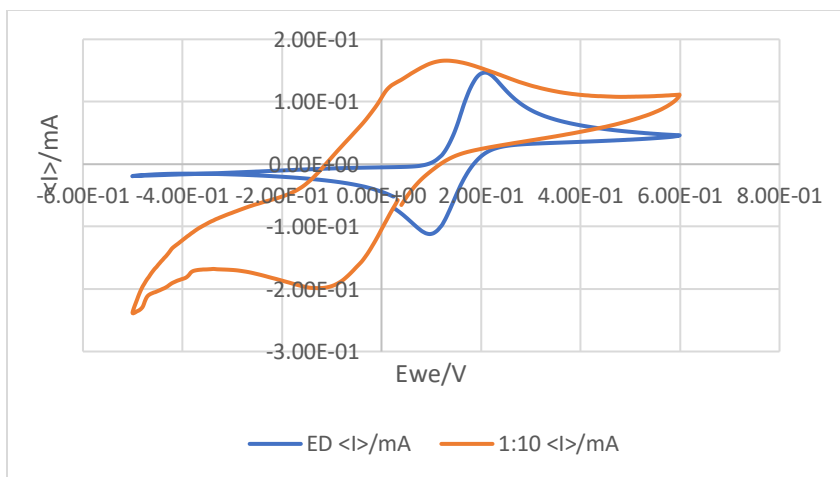


Figura 17. Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la reacción antígeno-anticuerpo de la dilución 1:10 de DENV 2 paciente con el electrodo no modificado.

6.4 Comprobación de la reacción antígeno-anticuerpo DENV3

Para el caso especial de DENV 3 no se contó con muestra de virus aislado de pacientes de Nuevo León, se realizó solamente una dilución de 1:5 del antígeno DENV 3 y el resultado obtenido fue un voltamperograma donde los picos de corriente anódica y catódica prácticamente desaparecen, esto se puede deberse a que las partículas de dengue unidas al anticuerpo presentan un volumen considerable, lo que puede impedir la transferencia de carga sobre el electrodo de trabajo. En cierta medida los electrodos se comportaron como se esperaba, una disminución considerable de los I_{pa} e I_{pc} , además, al comparar con el electrodo sin modificar se observa una disminución de las corrientes (figura 18).

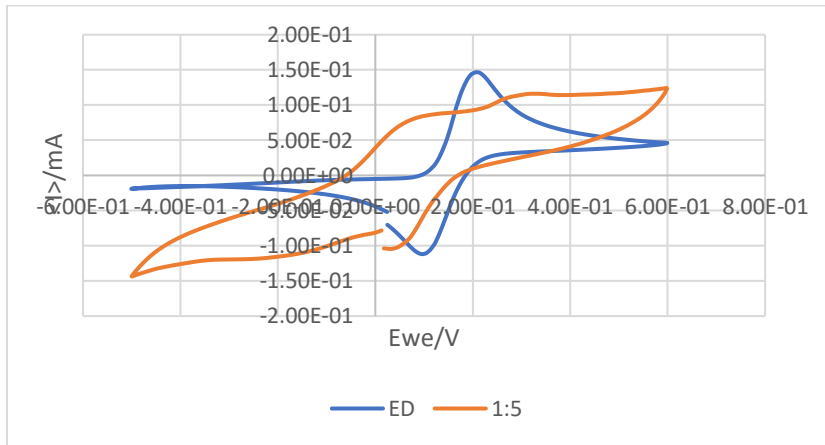


Figura 18. Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la reacción antígeno-anticuerpo de la dilución 1:5 de DENV 3 con el electrodo no modificado.

6.5 Comprobación de los controles del virus de Chikungunya y el suero de una persona sana

Para realizar los ensayos de los controles se realizó la misma metodología que con las muestras de DENV. En los voltamperogramas cíclicos de las diluciones de Chikungunya se obtuvieron los siguientes picos anódicos $I_{pa}^{1:5}=103.292 \mu A$, $I_{pa}^{1:10}= 103.292 \mu A$ y $I_{pa}^{1:50}=99.96 \mu A$ y los picos catódicos $I_{pc}^{1:5}=66.64 \mu A$, $I_{pc}^{1:10}= 99.96 \mu A$ y $I_{pc}^{1:50}=99.96 \mu A$. Si comparamos con el voltamperograma cíclico del electrodo sin modificar, no se observa la disminución en la corriente producida por la reacción antígeno-anticuerpo, pero si hay una variación en el potencial con

relación al control (figura 19). Estos resultados indican que el electrodo no reconoce partículas distintas a la proteína E de Flavivirus.

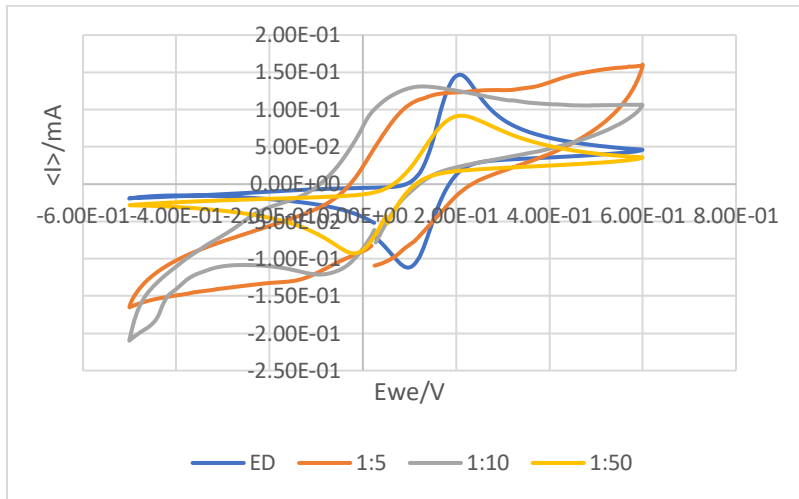


Figura 19. Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la dilución 1:5, 1:10 y 1:50 del virus de Chikungunya con el electrodo sin modificar.

En cuanto al control con suero de persona sana los voltamperogramas cíclicos se comportaron de manera similar a lo que se obtuvo con la cepa del virus de Chikungunya. Las diluciones 1:5 y 1:10 no muestran picos de corriente pronunciados y la dilución 1:50 presenta un $I_{pa}^{1:50} = 99.96 \mu\text{A}$ y de igual manera un $I_{pc}^{1:50} = 99.96 \mu\text{A}$ (figura 20).

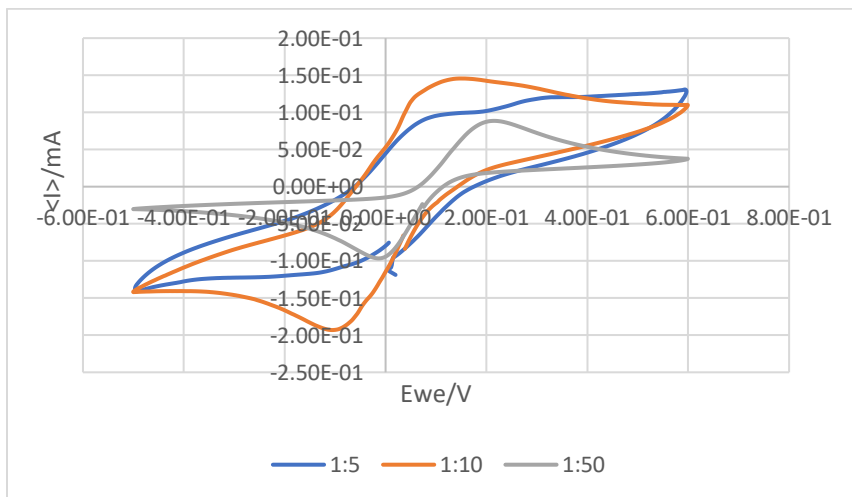


Figura 20. Comparación de los voltamperogramas cíclicos de la dilución 1:5, 1:10 y 1:50 del suero de persona sana.

CAPÍTULO 6

Discusión

Los voltamperogramas cíclicos de cada paso de la modificación de la superficie del electrodo de trabajo, demostraron una correcta formación de la SAM para la unión a DENV, por la disminución de los picos de corrientes anódicas y catódicas. Otros autores han descrito resultados similares a pesar de utilizar metodologías y materiales diferentes, como es el caso de Siew QY *et al.*, quienes en el 2021 desarrollaron un sensor para la detección de anticuerpos IgG contra DENV mediante la unión de una glicoproteína antigénica de origen vegetal (cEDIII) a un electrodo de carbono que fue modificado en varios pasos con: grafeno y dióxido de titanio (G / TiO₂) y éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 1-pirenobutírico (PSE). Al incorporar el éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 1-pirenobutírico los picos redox mostraron una densidad de corriente reducida en comparación con la de los electrodos modificados anteriormente con grafeno y dióxido de titanio. La disminución en los picos de corriente podría atribuirse a la hidrofobicidad del éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 1-pirenobutírico y a la formación de una barrera física que impide la transferencia de electrones a la superficie del electrodo, lo que se traduce en una modificación de la superficie del electrodo exitosa. Además, observaron una disminución adicional en los picos de corriente máxima en los electrodos modificados con G / TiO₂ / PSE / cEDIII, lo que indica la inmovilización satisfactoria de cEDIII.

En nuestro caso se obtuvieron picos de corriente menores al adicionar el anticuerpo 4G2 anti-flavivirus, este comportamiento sugiere que el anticuerpo fue inmovilizado exitosamente. Siew utilizó leche desnatada para prevenir la unión inespecífica en los sitios activos de cEDIII esta adición a la superficie del electrodo también contribuyó a una caída en la respuesta de corriente. El mismo resultado se obtiene al adicionar albúmina sérica bovina para ocupar los sitios donde no se unió el anti-flavivirus. Diouani M *et al.*, en el 2016 y Arshad, R *et al.*, en el 2020 son otros autores que a medida que modificaron la superficie del electrodo sus voltamperogramas reflejaron una disminución en los picos de corriente tanto anódicas como catódicas. Esto sugiere que la reversibilidad redox de [Fe (CN) 6] 3- / 4 empeora con la acumulación de barreras físicas aislantes de los pasos de modificación secuencial, lo que dificulta lograr el equilibrio de Nernst.

En cuanto a la comprobación de la reacción antígeno-anticuerpo, en los voltamperogramas cíclicos también se obtuvieron picos de corriente menores en comparación con el electrodo sin modificar, para prácticamente todos los serotipos que se utilizaron, incluyendo las muestras de pacientes de Nuevo León. Incluso el electrodo pudo reconocer el antígeno a las concentraciones más bajas que se utilizaron. Muchos autores describen una relación de la disminución de la corriente con las concentraciones del analito, como explican Nidzworski *et al.*, 2017, Talan *et al.*, 2018 y Bhradwaj 2019 en sus investigaciones; en donde exponen la diferencia existente entre los picos del voltamperograma del electrodo desnudo con aquellos correspondientes a los distintos ensayos con los respectivos antígenos. Se obtuvo que efectivamente esta diferencia es dependiente de la concentración de los antígenos; atribuyendo esto a la obstrucción de la transferencia de electrones entre la solución redox y el electrodo debido a que al aumentar la concentración de proteína en el medio disminuye la transferencia electrónica; sin embargo, nuestros resultados no muestran del todo esta tendencia, apoyándonos en lo expresado por numerosos investigadores podemos explicar que los resultados de los voltamperogramas dependen de muchos factores, como son: variaciones en la velocidad de escaneo, diferentes concentraciones o ausencia del par redox [Silva *et al.*, 2021], impedimento estérico o interacciones en de los compuestos de la SAM, pH [Humanes *et al.*, 2016], etc. También es importante destacar que la laminilla utilizada es desechable, una vez que se realiza la medición no es posible volver a usarla, por lo que cada voltamperogramas cíclicos mostrado en los resultados representa una laminilla, lo que aumenta la posibilidad de errores de manipulación entre una medición y la otra, lo que no quita que, a pesar de mostrar interferencias en las curvas, por los resultados de los picos de corrientes podemos decir que ocurre la reacción esperada.

Otro punto que demuestra que el biosensor desarrollado es confiable es que no reconoció las partículas de Chikungunya, ni reaccionó con el suero de personas sanas. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura como por ejemplo el estudio realizado por Diouani *et al.*, 2016 donde, utilizando otra proteína de *Mycobacterium tuberculosis* y no el antígeno específico pudo probar la especificidad del sensor, ya que sus resultados indican que no ocurrió reacción entre el anticuerpo y esta proteína control. También podemos tomar un ejemplo metodológicamente más parecido al nuestro, donde en 2021 Mendonza *et al.*, desarrollaron un inmunosensor electroquímico para la detección de la glicoproteína NS1 de los virus Dengue y Zika

en suero y orina, además de probar el electrodo con muestra reales diagnosticadas con DENV y Zika, lo expusieron a muestras de suero de pacientes sanos y resultó en que las muestras de suero con PBS diluidas hasta 1:50 mostraron diferencias significativas entre el control y ambos individuos infectados; sin embargo, se detectó NS1 en sueros de ZIKV y DENV, como se esperaba.

CONCLUSIÓN

La superficie del electrodo de trabajo fue modificada para formar la SAM exitosamente, ya que se pudo constatar la reacción antígeno-anticuerpo, demostrando que es capaz de detectar la proteína E de DENV 1,2 y 3, en diluciones de 1:5, 1:10 y 1:50, así como DENV 1 y 2 aislados de pacientes. Además, los resultados demostraron que el electrodo discrimina entre las muestras con DENV y las que presentan otros arbovirus como es el caso de Chikungunya, el cual presenta sintomatología similar DENV y puede confundirse su diagnóstico; por otro lado, también diferencia las muestras de personas sanas.

PERSPECTIVAS

1. Realizar una curva con concentraciones crecientes de la proteína E recombinante de los cuatro serotipos de DENV.
2. Realizar la misma metodología con el virus de Zika para saber si el electrodo lo detecta.
3. Realizar las voltamperometrías cíclicas variando el pH.
4. Realizar un estudio del comportamiento del electrodo con varias velocidades de escaneo.
5. Realizar mediciones con otras técnicas electroquímicas y comparar con las obtenidas en este proyecto.
6. Realizar mediciones en suero de pacientes positivos a Dengue en distintas etapas de la enfermedad

REFERENCIAS

1. Abbas A y Lichtman A. Inmunología celular y molecular 5ta ed. 2004
2. Aguiar A, Almelo LC, Aguiar M, García A. Dengue, una epidemia del siglo XXI. Univ Méd Pinareña [revista en Internet]. 2016; 12(1)
3. Arredondo JL, Aguilar CG, Aguilar JJ, Osnaya N, Pérez G, Medina H. Panorama epidemiológico de dengue en México 2000-2019. Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica. 2020;33(2):78–83.
4. Arredondo JL, Méndez A, Medina H, Méndez A, Medina H. Arbovirus en Latinoamérica. Acta pediátrica de México [Internet]. 2016;37(2):111–31.
5. Arshad R, Rhouati A, Hayat A, Nawaz M, Yameen M, Mujahid A, Latif U. MIP-based impedimetric sensor to detect dengue fever biomarkers. Appl Biochem Biotechnol 2020; 191, 1384-1394.
6. Baeza A, En M, Arturo C, García J. Principios de electroquímica analítica Colección de documentos de apoyo [Internet]. 2011.
7. Bai H, Wang R, Hargis B, Lu H, Li Y. A SPR Aptasensor for Detection of Avian Influenza Virus H5N1. Sensors [Internet]. 2012 Sep;12(9):12506–18. 1.
8. Barreiros dos Santos M, Aguil J, Prieto B, Sporer C, Teixeira V, Samitier J. Highly sensitive detection of pathogen Escherichia coli O157:H7 by electrochemical impedance spectroscopy. Biosensors and Bioelectronics. 2013, 45:174–180.
9. Beita J, Salazar N, Valverde M. Patogénesis de la enfermedad por virus del dengue. Revisión de la literatura. Revista Clínica Escuela de Medicina UCR-HSJD [Internet]. 2016 May 11;6(2).
10. Brady O and Hay S. The Global Expansion of Dengue: How Aedes aegypti Mosquitoes Enabled the First Pandemic Arbovirus [Internet]. Annual Reviews. 2019 [cited 2021 Apr 26].
11. Byk L A. Estudios sobre los mecanismos de desnudamiento y encapsidación del virus del dengue. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, 2016
12. Cecchetto J, Fernandes F, Lopes R., Bueno P. The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker. Biosens. Bioelectron. 2017; 87, 949–956.

13. Correa L, Cabrera C, Martínez M, Martínez M. Consideraciones clínicas y terapéuticas sobre el dengue. 2016; 20(1): 80-97.
14. Chen A and Shah B. Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry: *Anal.Methods*. 2013; 5,2158
15. Dafis S, Schriewer J. 2-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*, 2010: 468, 452–456.
16. De Souza D, Uliana M. Larvicidal activity of paraBenzoquinones. *Parasitol Res*, 2010:107, 741–745.
17. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N. Crossreacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*, 2010; 328, 745–748.
18. Diouani M, Ouerghi O, Refai A, Belgacem K, Tlili C, Laouini D, Essafi M. Detection of ESAT-6 by label free miniature immunoelectrochemical biosensor as a diagnostic tool for tuberculosis. *ELSEIVER* 2016: (74)465-470
19. Endo T, Ozawa S, Okuda N, Yanagida Y, Tanaka S, Hatsuzawa T. Reflectometric detection of influenza virus in human saliva using nanoimprint lithography-based flexible two-dimensional photonic crystal biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* [Internet]. 2010 Jun;148(1):269–76.
20. Esparza J. Epidemias y pandemias virales emergentes: ¿Cuál será la próxima? *Investigación Clínica* [Internet]. 2016;57(3):231–5.
21. Espinosa D. Detección de proteínas del virus de la influenza A H1N1 mediante el desarrollo de un inmunobiosensor electroquímico. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Químicas. 2019
22. Fernández I. Inmunosensores electroquímicos para la determinación de marcadores de la obesidad. Universidad Complutense de Madrid.2015
23. Frederix F, Bonroy K, Laureyn W, Reekmans G, Campitelli A, Dehaen W, Maes G. Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiols on Gold. *Langmuir* 2003; 19, 4351-4357
24. Galán K. Identificación y análisis de las variantes genómicas del virus del dengue y su asociación con la presentación clínica en una zona de baja y otra de alta endemicidad en México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina. 2013

25. Gonçalves C, Telöken F, Souza S. Estudio sobre proteínas estructurales y no estructurales del virus del dengue Study on Structural and non-structural proteins of Dengue Virus. 2018;58(6):32–4.
26. Hardeep K, Aakash B, Suraj S. Biosensors: Classification, Fundamental Characterization and New Trends: A Review [Internet]. ResearchGate. unknown; 2018
27. Hassanpour S, Baradaran B, Hejazi M, Hasanzadeh M, Mokhtarzadeh A, Guardia M. Recent trends in rapid detection of influenza infections by bio and nanobiosenso. Trends in Analytical Chemistry 98 (2018) 201-215
28. Humanes IP. Funcionalización Superficial de Sustratos Metálicos para la Obtención de Materiales Biocompatibles, Departamento de Química Física y T.A Universidad de Córdoba (tesis de maestría) 2016
29. Jazib A, Jawayria N, Muhammad A, Muhammad F, Raza A. Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. Journal of J Biosensors & Bioelectronics urnal of Biosensors & Bioel. 2017, 8:1
30. Junjhon, J., Edwards, T.J., Utaipat, U. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. J. Virol, 2010. 80, 8353– 8358.
31. Kergaravat SV. Diseño de inmunosensores electroquímicos para la detección de biomoléculas marcadoras en el diagnóstico clínico. Universidad nacional del litoral. 2013
32. Kümmerer B, Rice C. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. J Virol, 2002. 76, 4773–4784.
33. Kurane I, Takasaki T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. . Rev Med Virol, 2001; 11, 301-11.
34. Laredo SV, Guol X, García VB. Dengue virus: estructura, serotypes and molecular epidimilogy - ProQuest [Internet]. Proquest.com. 2012
35. Le J and Nathanson N. Emerging Viral Diseases Why We Need to Worry about Bats, Camels, and Airplanes Chapter 16. 2016
36. Lorch, M. S. Producción de antígenos recombinantes y su empleo en métodos serológicos para la detección de infecciones flavivirales de importancia regional. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes 2020

37. Martínez J, Hernández JC, Urcuqui S. Papel de las células dendríticas en la infección por el virus dengue: blancos de replicación y respuesta inmune. *Revista chilena de infectología* [Internet]. 2017 Jun ;34(3):249–56.
38. Messer WB, de Alwis R, Yount BL, Royal SR, Huynh JP, Smith SA. Dengue virus envelope protein domain I/II hinge determines long-lived serotype-specific dengue immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2014 Jan 2;111(5):1939–44.
39. Metrom Autolab B.V. *Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) Part 1 – Basic Principles*
40. Monarrez D. Detección de mercurio (ii) en medio acuoso por voltamperometría con electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono de capa multiple. Universidad autónoma de ciudad Juárez instituto de ciencias biomédicas departamento de ciencias químico-biológicas. 2020
41. Muller DA, Depelsenair AC, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis.* 2017 Mar 1;215(suppl_2):S89-S95
42. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal, Armed Forces India.* 2015 Jan;71(1):67-70.
43. Omar NAS, Fen YW, Abdullah J, Mustapha Y, Daniyal W, Sadrolhosseini AR. Sensitive Detection of Dengue Virus Type 2 E-Proteins Signals Using Self-Assembled Monolayers/Reduced Graphene Oxide-PAMAM Dendrimer Thin Film-SPR Optical Sensor. *Scientific Reports* [Internet]. 2020 Feb 11 [cited 2021 Apr 26];10(1).
44. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. *Actualización Epidemiológica: Dengue.* 10 de junio de 2020, Washington, D.C. OPS/OMS. 2020
45. Pensa E, Cortés E, Corthey G, Carro P, Vericat C, Fonticelli M, Benítez G, Rubert A, Salvarezza R. The Chemistry of the SulfurGold Interface: In Search of a Unified Model” *Accounts of chemical research*’ 2011: 1183–1192 Vol. 45, No. 8
46. Pérez M, Rojas R, Requena D, Ferreras AC, Triana JL, Triana F. Traducción independiente de la estructura 5´cap del ARN genómico del virus dengue. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* [Internet]. 2015 Apr 1;32(1):11.
47. Plevka, P, Battisti, AJ, Junjhon, J. Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. *EMBO Rep.* 2011 , 12, 602–606.

48. Mendonza P, Santos L, Foguel M, Rodrigues M, Cordeiro M, Gonçalves L, Marques E, Dutra R. NS1 glycoprotein detection in serum and urine as an electrochemical screening immunosensor for dengue and Zika virus Dutra *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021; 413:4873–4885
49. Raziq A, Kidakova A, Boroznjak R, Reut J, Öpik A, Syritski V. Development of a portable MIP-based electrochemical sensor for detection of SARS-CoV-2 antigen. *Biosensors and Bioelectronics* [Internet]. 2021;178:113029.
50. Ronkainen N, Halsall H, Heineman W. Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev*. 2010 May;39(5):1747-63.
51. Sánchez C, García C, Fajardo Y, Abril J, Forero D, Afanador L. Significados de las fiebres del dengue, Chikungunya y zika e itinerarios terapéuticos en un municipio endémico de Colombia. *Saúde e Sociedade* [Internet]. 2020 ;29(3).
52. Siew Q, Pang E, Loh H, Tan M. Highly sensitive and specific graphene/TiO₂ impedimetric immunosensor based on plant-derived tetravalent envelope glycoprotein domain III (EDIII) probe antigen for dengue diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics* [Internet]. 2021 Mar;176:112895.
53. Silva B, Cordeiro M, Rodrigues M, Marques E, Dutra R. Inmunosensor del virus de zika sin etiqueta ni sonda basado en nanotubos de carbono con azul de Prusia para la detección amperométrica de la proteína NS2B. *MDPI*, 2021:11(5)
54. Simmons C, Farrar J, van Vinh Chau N, Wills B, Current Concepts: Dengue. *N Engl J Med* 2012. 366, 1423-32.
55. Sridhar S, Luedtke A, Langevin E, Zhu M, Bonaparte M, Machabert T. Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2018 Jul 26 ;379(4):327–40.
56. Tittarelli E. Estudio genético de los virus dengue circulantes en Argentina [Internet]. UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES. Facultad de Farmacia y Bioquímica 2017.
57. Tsai J, Liu W, Lin P, Huang P, Tsai C, Chou P, Lee F, Ping C, Ping C, Lee P, Liu L, Chen C. An RT-PCR panel for rapid serotyping of dengue virus serotypes 1 to 4 in human and mosquito serum in a field-deployable PCR system. 2019; 14 (3)
58. Were F. The dengue situation in Africa. *Paediatrics and International Child Health* 2012: 32, 17-26.

59. World Health Organization: WHO. Dengue y dengue grave [Internet]. Who.int. World Health Organization: WHO; 2020
60. World Health Organization: WHO. Dengue y dengue grave [Internet]. Who.int. World Health Organization: WHO; 2019
61. Yung C, Lee K, Thein T, Tan L, Gan VC, Wong J. Dengue Serotype-Specific Differences in Clinical Manifestation, Laboratory Parameters and Risk of Severe Disease in Adults, Singapore. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. 2015 May 6;92(5):999–1005.