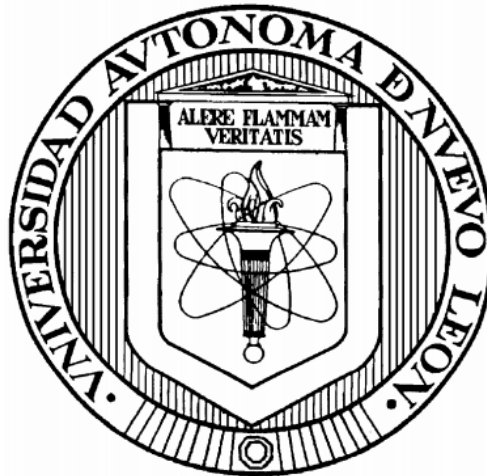


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**Diseño de sistemas de detección en el punto de atención
basados en aptámeros y en nanotecnología para la
identificación de virus de RNA**

Por


M.C. CYNTHIA GABRIELA MARTÍNEZ LIU

**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con orientación en Biología Molecular e Ingeniería
Genética**

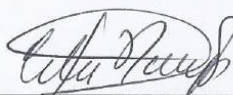
Agosto, 2023

**Diseño de sistemas de detección en el punto de atención
basados en aptámeros y en nanotecnología para la
identificación de virus de RNA**

Aprobación de tesis




Dra.C. Ana María G. Rivas Estilla
Director de tesis



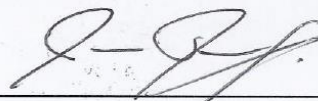
Dra.C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez
Co-director de tesis



Dr.C. Daniel Arellanos Soto
Miembro de la comisión de tesis



Dra.C. Sonia A. Lozano Sepúlveda
Miembro de la comisión de tesis



Dr. Med. Javier Ramos Jiménez
Miembro de la comisión de tesis

Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de estudios de posgrado

Diseño de sistemas de detección en el punto de atención basados en aptámeros y en nanotecnología para la identificación de virus de RNA

Presentado por:

M.C. Cynthia Gabriela Martinez Liu

Este trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación e Innovación en Virología Médica (CIViM) del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Ana María G. Rivas Estilla y la co-dirección de la Dra. Celia Nohemí Sánchez Domínguez.

Director de tesis

DRA. C. ANA MARÍA RIVAS ESTILLA

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico de la beca de doctorado para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular perteneciente a la Facultad de Medicina de esta universidad, por permitirme el uso de su equipo y por la invaluable ayuda de todos los profesores en el desarrollo de este estudio.

Al Centro de Investigación e Innovación en Virología Médica (CIIViM) por proporcionarme el lugar de trabajo, los reactivos y los equipos para realizar esta tesis. Quiero agradecer a todo el equipo de trabajo del laboratorio, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Ana María Rivas Estilla mi asesora de tesis, por siempre apoyar mis ideas y dejarme ser libre en la investigación, gracias a su ejemplo he crecido profesional y personalmente. Mi mentora y maestra de vida y de profesión, nunca olvidaré todo lo que aprendí de usted. Gracias por ser esa mujer a la que todas sus alumnas aspiramos ser.

A la Dra. Celia Sánchez, por formar parte del comité de tesis, por sus valiosas sugerencias y revisión del presente trabajo.

A la Dra. Sonia Lozano y la Dra. Natalia Martínez por ser un ejemplo y un apoyo en toda la realización de mi doctorado, gracias por sus consejos profesionales y personales, fueron no solo mis maestras si no, mis amigas y mi inspiración.

Al Dr. Kame Galán Huerta por enseñarme toda la parte de secuenciación, por su apoyo profesional y personal en la tesis realizada. Gracias por resolver todos mis problemas con café y pan.

A la Dra. Gabriela Leija Montoya por su participación en mi proyecto de tesis, por enseñarme todo lo referente a aptámeros y su disposición para recibirme en mi estancia de investigación en Mexicali. Gracias por su apoyo incondicional, es un gran ejemplo para mi vida.

Al Med. Ali Fernando Ruíz Higareda por apoyarme en los análisis bioinformáticos de esta tesis, fuiste fundamental para realizar todos los ensayos *in silico*. Gracias por toda tu disposición y esfuerzo para realizar este trabajo, llegaras muy lejos en la vida.

Al Dr. Daniel Arellanos por sus consejos y amistad y por revisar esta tesis a última hora.

A Dios que me permitió la fortaleza, la sabiduría, salud y la dedicación para realizar este proyecto y sueño de vida.

A mi esposo Jesús, mi compañero de vida, mi apoyo y mi gran amor. Gracias por caminar conmigo durante todos estos años, por tu paciencia y siempre impulsarme a ser mejor cada día. Gracias por ayudarme a extender mis alas aun sabiendo que no volarías conmigo. Eres mi inspiración y mi gran recompensa. Este logro también es tuyo, juntos disfrutaremos los frutos de este esfuerzo.

A mi familia y amigos por el apoyo que siempre me han brindado, en especial a mi hermana Eve, a Jessy y a Faby, porque aun en la distancia, su amor me mantuvo tranquila y cuerda en los momentos oscuros.

A mis maravillosos sobrinos Ricardo y Karol, son el amor de mi vida y mi motivación, ya pueden decir que su tía es doctora.

A mis amigos del laboratorio, en especial a Adriana, a Tania y a Martín que no solo hicieron más ameno mi trabajo con sus pláticas y risas, sino que con su amistad y apoyo hicimos una pequeña familia foránea. Una de las mejores cosas del doctorado fue haberlos conocido. Son personas increíbles.

A todas las personas que conocí durante la realización de esta tesis, gracias por contribuir de alguna forma en la realización de este trabajo. Quiero agradecer en particular a Ximena, quién fue una bonita conciencia de vida que terminó en una amistad. Gracias a tus consejos y apoyo continuo, sigo en el camino lo más cuerda posible.

A mí, por mi valentía, esfuerzo y dedicación todos los días, por no darme por vencida, aun estando lejos de todo lo que conocía con tal de cumplir este sueño, por persistir, por luchar, por crecer. Lo lograste. Gracias por todo, aún viene lo mejor.

“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas”.
Josué 1:9

Tabla de contenido

Introducción	15
CAPÍTULO 1	17
Virus emergentes de RNA	17
Coronavirus 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)	18
Virus causante de la Influenza A	21
Virus del Dengue.....	23
Métodos de detección y diagnóstico viral	26
Detección del Virus de Dengue	29
Detección del Virus de la influenza A	29
Detección del Virus SARS-CoV-2	30
Ensayos de oligonucleótidos ligados a enzimas (ELONAs).....	31
Pruebas de flujo lateral (LFAs)	33
Nanopartículas: clasificación y propiedades	40
Nanopartículas de oro: características y ventajas de su aplicación.	41
Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas	42
Espectroscopía UV-Vis.....	43
Ensayo de dispersión dinámica de luz	44
Aplicaciones de las nanopartículas de oro	45
Aptámeros.....	46
Caracterización de los aptámeros.....	49
Uso de aptámeros para mejorar el diagnóstico molecular.....	51
CAPÍTULO 2	53
Justificación.....	53
Objetivos.....	55
Objetivo general	55
Objetivos específicos.....	55
CAPÍTULO 3	56
Materiales y métodos	56
Materiales.....	56
Reactivos.....	56

Métodos	57
Propagación del virus del Dengue	57
Preparación de los biosensores	58
Optimización de la funcionalización de AuNPs por adsorción	58
Funcionalización de las AuNPs con los anticuerpos por adsorción	59
Funcionalización de las AuNPs con los anticuerpos por enlaces covalentes	60
Caracterización de los biosensores	60
Pruebas de caracterización fisicoquímica de los conjugados	60
Elaboración de la LFA para la detección de Dengue (formato competitivo)	61
Pruebas de funcionalidad in vitro de las LFAs para la detección de DENV	64
Pruebas de reconocimiento de los anticuerpos y las proteínas recombinantes por dot blot	65
Pruebas de funcionalidad del biosensor por dot blot	65
Diseño y caracterización de los aptámeros	66
Diseño de la biblioteca y primers	66
Optimización de la amplificación de la biblioteca	66
Optimización de la PCR asimétrica	67
Obtención de ssDNA por PCR asimétrica	69
Purificación del ssDNA a partir de una PCR asimétrica	70
Cuantificación de DNA (ssDNA y dsDNA)	71
Selección de los aptámeros (SELEX)	71
Amplificación de secuencias por PCR punto final	72
Clonación de las secuencias de aptámeros candidatos	73
Preparación de células calcio-competentes de E. coli	73
Transformación de células calcio-competentes	74
Recuperación de plásmidos por lisis alcalina	75
Preparación de los fragmentos para la secuenciación (Sanger)	75
Análisis in silico del aptámero 769	79
Determinación de la especificidad de los aptámeros por dot blot	80
Determinación de la afinidad del aptámero por ELONA	81
Ensayos de competencia en el sitio de unión por ELONA competitivo	82
Determinación del límite de detección de la prueba ELONA	82
Caracterización de la biblioteca aleatorizada por qPCR	86

Análisis de estadístico	87
CAPITULO 4	88
Resultados	88
Optimización de la funcionalización de las AuNPs (con anticuerpos) por adsorción para la formación de los biosensores contra DENV	88
Obtención y caracterización de los biosensores para la detección de DENV (AuNP-4G2)	90
Diseño y elaboración de la LFA para la detección de DENV	95
Pruebas de funcionalidad de la prueba de flujo lateral para la detección de DENV	97
Obtención y caracterización de los biosensores para la detección de SARS-CoV-2 (AuNP-RBD y AuNP-Spike)	99
Obtención de los aptámeros específicos para la detección de influenza H1N1 y SARS-CoV-2.	106
Diseño y caracterización de la biblioteca	106
Selección de aptámeros específicos contra las proteínas RBD del virus SARS-CoV-2 y H1 del virus Influenza H1N1	110
Determinación <i>in vitro</i> de la especificidad de los aptámeros	115
Análisis estructural del aptámero 769	117
Interacción <i>in silico</i> del aptámero 769 con su proteína blanco	118
Determinación de la afinidad de los aptámeros por ensayos ELONA	122
Ensayos de competencia en el sitio de unión por ELONA competitivo.....	125
Ensayo ELONA para la detección de hemaglutinina del virus de la influenza H1N1.	127
Efecto del aptámero 769 en la viabilidad de células Vero	128
Estabilidad del aptámero 769 en cultivo celular	129
Evaluación del comportamiento de los aptámeros en presencia de la proteína blanco en cultivo celular	131
CAPÍTULO 5	136
Discusión	136
CAPÍTULO 6	150
Conclusiones	150
Bibliografía	152
Apéndices.....	174
Apéndice A	174

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2 y su interacción con la célula huésped	19
Figura 2. Esquema del virus de la influenza y su interacción con la célula huésped. ...	22
Figura 3. Esquema del virus del Dengue y su genoma	24
Figura 4. Esquema de la interacción del virus del dengue con su célula blanco	25
Figura 5. Esquema de los diferentes tipos de ELONA	32
Figura 6. Configuración típica de una prueba de flujo lateral	33
Figura 7. Esquema del funcionamiento de la LFA	35
Figura 8. LFA con formato tipo sándwich.....	36
Figura 9. LFA con formato tipo competitivo.....	37
Figura 10. SELEX convencional para generar aptámero de DNA	47
Figura 11. Esquema de la LFA competitiva para la detección de Dengue	62
Figura 12. Optimización de las condiciones de pH para la conjugación de anticuerpos en la superficie de AuNPs.....	89
Figura 13. Caracterización de los biosensores AuNPs y AuNP-4G2.....	91
Figura 14. Determinación del valor de agregación de las AuNPs y conjugados.....	92
Figure 15. Análisis fisicoquímico de las AuNPs y los bionanosensores por DLS	94
Figura 16. Ensayo de cambio de movilidad electroforética para los biosensores AuNP-BSA y AuNP-4G2	95
Figura 17. Diseño del ensayo de flujo lateral para la detección de flavivirus.....	96
Figura 18. Prueba de funcionalidad de la prueba de flujo lateral para la detección de flavivirus.....	98
Figura 19. Prueba de reproducibilidad funcional de las pruebas de flujo lateral para la identificación de flavivirus	99
Figura 20. Caracterización de los biosensores AuNPs-RBD y AuNP-Spike.....	100
Figura 21. Determinación del valor de agregación de los biosensores para la detección de SARS-CoV-2 en buffer PBS	101
Figura 22. Determinación del valor de agregación de los biosensores para la detección de SARS-CoV-2 en agua.....	102
Figure 23. Análisis fisicoquímico de los biosensores para SARS-CoV-2 por DLS	104
Figura 24. Ensayo de cambio de movilidad electroforética para los biosensores AuNP-BSA y AuNP-RBD, AuNP-Spike	105

Figura 25. Resultados de los dot blots para determinar la especificidad de los biosensores	106
Figura 26. Secuencias de la biblioteca y los primers para la obtención de aptámeros de DNA.....	107
Figura 27. Pasos para la obtención de la biblioteca como DNA monocatenario para el SELEX.....	107
Figura 28. Optimización de la amplificación de la biblioteca de aptámeros	108
Figura 29. Optimización de la amplificación de ssDNA por PCR asimétrica	109
Figura 30. Biblioteca ssDNA purificada	109
Figura 31. Esquemas representativos de la selección para la obtención de aptámeros candidatos.....	111
Figura 32. Resultados representativos de la obtención de ssDNA en cada ciclo	111
Figura 33. Resultados representativos de la obtención de ssDNA en cada ciclo	112
Figura 34. Amplificación de fragmentos para la caracterización de plásmidos (primers M13)	115
Figura 35. Resultados de los dot blot para determinar la especificidad de las secuencias candidatas.....	117
Figura 36. Dot blot control de la proteína RBD SARS-CoV-2.....	117
Figura 37. Predicción de las estructuras secundarias de los aptámeros	118
Figura 38. Estructuras 3D del aptámero Apta 769	119
Figura 39. Esquema de la interacción entre el aptámero 769 y la proteína H1	120
Figura 40. Sitios de unión de los aptámeros mostrados en la estructura tridimensional	121
Figura 41. Esquema del ELONA indirecto basado en el aptámero 769 para la detección de hemaglutinina (Influenza H1N1).....	123
Figura 42. Resultados de la determinación de la afinidad del aptámero 769 a las proteínas H1 y BSA	124
Figura 43. Resultado de la determinación de los valores de Kd del aptámero 769 por ELONA	125
Figura 44. Esquema del ELONA competitivo basado en el aptámero 769.....	126
Figura 45. Ensayo de competencia en el sitio de unión en solución.	127
Figura 46. Curva para la determinación del Límite de Detección (LoD) del ELONA basado en el aptámero 769.....	128
Figura 47. Ensayo de citotoxicidad de células Vero tratadas con concentraciones crecientes del aptámero 24, 48 y 72 h.	129

Figura 48. Curva estándar para la cuantificación de aptámero en medio celular por qPCR.....	130
Figura 49. Estabilidad del aptámero 769 en cultivo celular.....	131
Figura 50. Micrografías de fluorescencia	132
Figura 51. Micrografías de fluorescencia	133
Figura 52. Curva estándar para la cuantificación de secuencias por qPCR.....	134
Figura 53. Cuantificación de ssDNA recuperado durante el SELEX	135

Índice de tablas

Tabla 1. Métodos y pruebas para la caracterización de las nanopartículas	43
Tabla 2. Condiciones de reacción para la amplificación de la biblioteca de aptámeros	66
Tabla 3. Programa utilizado para la amplificación de la biblioteca	67
Tabla 4. Protocolos para la amplificación de ssDNA por PCR asimétrica	68
Tabla 5. Condiciones de reacción para la PCR asimétrica a partir de la PCR punto final.....	68
Tabla 6. Programa utilizado para la PCR asimétrica a partir de la PCR punto final	68
Tabla 7. Condiciones de reacción para la PCR para el gradiente de temperatura	69
Tabla 8. Programa utilizado para la PCR para el gradiente de temperatura	69
Tabla 9. Condiciones utilizado para la PCR asimétrica	70
Tabla 10. Programa utilizado para la PCR asimétrica.....	70
Tabla 11. Condiciones utilizadas para la amplificación de las secuencias obtenidas en cada ciclo por PCR punto final	72
Tabla 12. Programa utilizado para la amplificación de las secuencias obtenidas en cada ciclo por PCR punto final	73
Tabla 13. Condiciones de la reacción de clonación	73
Tabla 14. Secuencias de los oligonucleótidos M13.	76
Tabla 15. Condiciones para la amplificación de los fragmentos para la secuenciación por PCR punto final.....	76
Tabla 16. Programa para la amplificación de los fragmentos para la secuenciación por PCR punto final.....	76
Tabla 17. Condiciones de la reacción de marcaje de las secuencias para la secuenciación.	78
Tabla 18. Condiciones de la reacción de marcaje de las secuencias para la secuenciación.	78
Tabla 19. Condiciones para la reacción de cuantificación de secuencias obtenidas en cada ronda de selección positiva por qPCR.....	84
Tabla 20. Condiciones para la reacción de cuantificación de secuencias obtenidas en cada ronda de selección positiva por PCR en tiempo real.	85
Tabla 21. Condiciones para la reacción de cuantificación de secuencias obtenidas en cada ronda de selección positiva por qPCR.....	87
Tabla 22. Condiciones para la reacción de cuantificación de secuencias obtenidas en cada ronda de selección positiva por qPCR.....	87

Tabla 23. Condiciones y resultados de la selección positiva de los aptámeros contra la proteína RBD	112
Tabla 24. Condiciones y resultados de la selección negativa con la proteína BSA de los aptámeros RBD.....	112
Tabla 25. Condiciones y resultados de la selección negativa con la proteína H1 de los aptámeros RBD.....	113
Tabla 26. Condiciones y resultados de la selección positiva de los aptámeros contra la proteína H1	113
Tabla 27. Condiciones y resultados de la selección negativa con la proteína RBD de los aptámeros H1.....	113
Tabla 28. Condiciones y resultados de la selección negativa con la proteína BSA de los aptámeros H1.....	114
Tabla 29. Secuencias candidatas como aptámeros específicos para las proteínas virales.	115
Tabla 30. Parámetros de las estructuras proteína-aptámero modeladas por el software HADDOCK.	120
Tabla 31. Aminoácidos que presentan interacciones moleculares con el aptámero Apta 769.....	122

NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
AuNPs	Nanopartículas de oro
4G2	Anticuerpo anti-flavivirus
OD	Densidad óptica
s	Segundos
min	Minutos
h	Horas
nm	Nanómetros
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
nts	Nucleótidos
NP	Nanopartícula
ELONA	Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay
DENV	Virus del dengue
nM	Nanomolar
Apta	Aptámero

Introducción

Desde el comienzo de este siglo, un cierto número de patógenos nuevos o reemergentes han surgido de los reservorios de vida silvestre y se han extendido a las poblaciones humanas, causando enfermedades graves. Actualmente, se está viviendo una nueva era de enfermedades infecciosas, donde, factores como la urbanización, la globalización, los viajes, el comercio internacional y los cambios climáticos han contribuido a favorecer la aparición, propagación y transmisión de patógenos. Las nuevas enfermedades trazan un camino que comienza con un estado de emergencia, seguido de la transmisión a escala local, el movimiento se propaga rápidamente y con la ayuda de la conectividad global se genera la propagación a escala mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Institutos Nacionales para Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) publicaron una lista de patógenos a los que se debe dar prioridad para la investigación y el desarrollo a nivel mundial, por su potencial epidémico, no existen contramedidas eficientes, o requieren nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico, donde los virus son los agentes etiológicos principales (NIAID, 2022; OMS, 2022). En México, según lo reportado por el INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) en el 2022, tres de las diez principales causas de muerte a nivel nacional están asociadas a enfermedades infecciosas de origen viral, donde la principal causa fue por COVID-19 (causado por el virus SARS-CoV-2), seguida por enfermedades del hígado causadas por virus de la Hepatitis C y enfermedades respiratorias crónicas causadas por el virus de la influenza A y B (INEGI, 2022). Por todo esto, es necesario crear nuevas estrategias de detección y monitoreo y alternativas terapéuticas tanto de tratamiento como de prevención con el

fin de prevenir, tratar y/o controlar más rápidamente enfermedades infecciosas con un alto potencial de impacto en la salud pública y en la economía global.

CAPÍTULO 1

Virus emergentes de RNA

Un virus emergente puede ser definido como un virus que ha aparecido recientemente, ha aumentado notablemente su incidencia o rango geográfico, o que tiene el potencial de aumentar en un futuro cercano (Holland, 1998). Los virus emergentes son una de las principales causas de enfermedades infecciosas emergentes. La mayoría de las enfermedades virales emergentes han sido causadas por zoonosis, es decir, transmitidas de animales a humanos en condiciones naturales. Si bien muchos virus se extienden para infectar huéspedes nuevos o alternativos, solo unos pocos logran esta transición, y las razones del éxito de esos patógenos aún no están claras, sin embargo, el éxito en esta cadena de transmisión dentro de esa nueva población huésped y la creciente interacción humana con entornos de vida silvestre son los principales componentes para la generación de pandemias y epidemias (Parrish et al., 2008). Entre todos los patógenos potenciales que pueden estar involucrados en las transmisiones entre especies, los virus de RNA son motivo de especial preocupación. Los virus de RNA a menudo se destacan como la clase más común de patógenos detrás de las nuevas enfermedades humanas que causan epidemias y pandemias (cada año se descubren de 2 a 3 virus nuevos) (Rosenberg, 2015), debido a sus altas tasas de mutación (son seis órdenes de magnitud mayores que las de sus huéspedes celulares) (Holmes, 2009), los tamaños de población potencialmente grandes y su rápida replicación (Wasik et al., 2019). En este trabajo nos centramos en tres virus emergentes de RNA, dos fueron patógenos causales de dos grandes pandemias en los últimos años, SARS-CoV-2 y el virus de la Influenza, y además

un virus de RNA que ha generado epidemias a lo largo del tiempo en diversos estados del país, con potencial para generar una pandemia, el virus del Dengue (DENV).

Coronavirus 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)

El patógeno causante de la enfermedad COVID-19 o SARS-CoV-2 ha causado desde su identificación en la ciudad de Wuhan China en el 2019 hasta la fecha más de 6 millones de muertes en todo el mundo (reportado por la base de datos del Center for System Science and Engineering de la universidad Johns Hopkins, 25 de mayo 2023).

El SARS-CoV-2 es un virus con un genoma de RNA (+) que codifica para 29 proteínas de las cuales 4 proteínas son estructurales: la proteína de espícula (S o Spike), la proteína de membrana (M) la proteína de nucleocápside (N) y la proteína de envoltura (E) (Bai et al., 2022).

De todas las proteínas virales descritas, la proteína Spike ha sido de gran interés debido a que la unión y la entrada del virus a la célula huésped esta mediada por esta proteína a través de su receptor de unión (RBD) que se une al receptor de la superficie celular de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). La proteína Spike sufre cambios conformacionales para la internalización del virus a la célula y comenzar el ciclo replicativo (Hangping Yao et al., 2020) (figura 1).

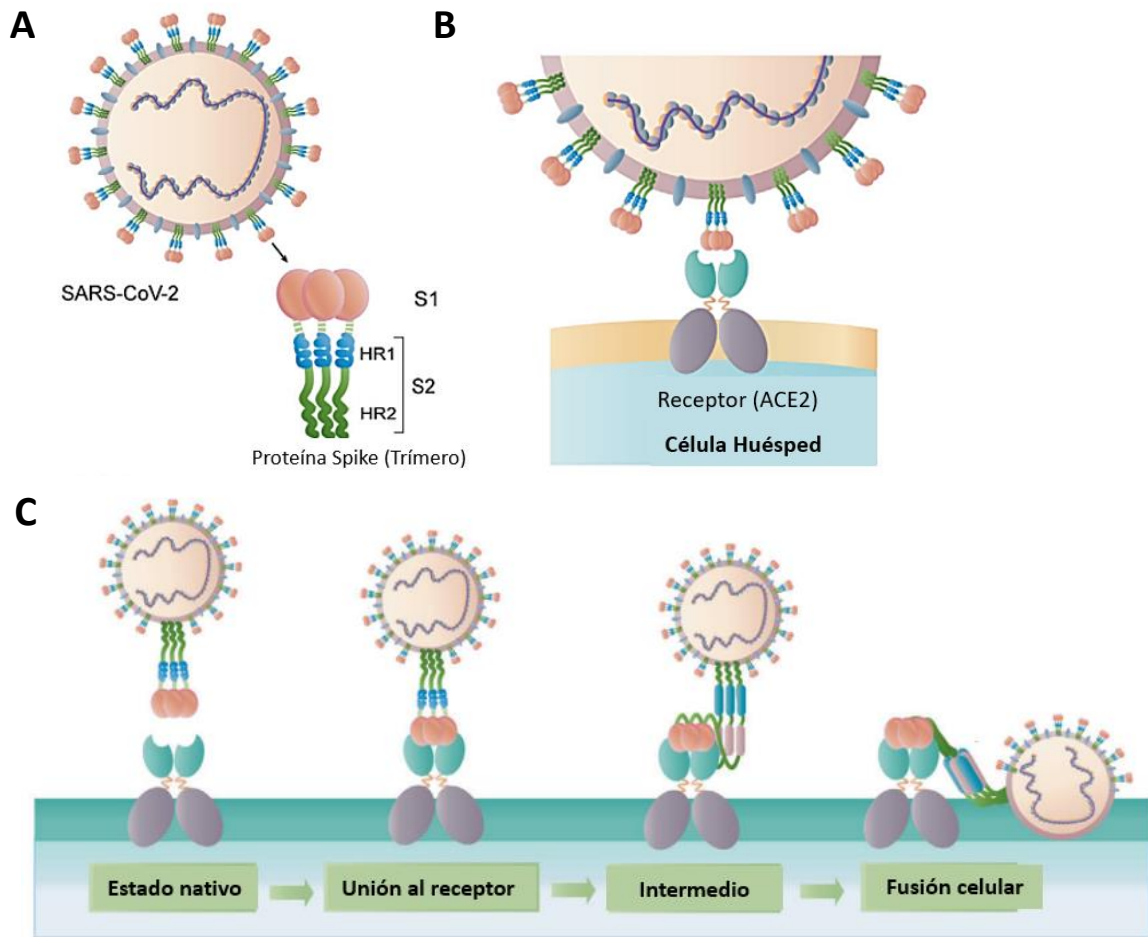


Figura 1. Esquema de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2 y su interacción con la célula huésped. (A) Esquema de la proteína Spike y sus subunidades, (B) unión de la proteína Spike con su receptor celular ACE2 y (C) proceso de unión y fusión virus-célula mediado por la proteína Spike (adaptada de Huang (2020) Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19 (Huang et al., 2020).

Durante su rápida propagación en humanos, el SARS-CoV-2 ha desarrollado nuevas formas independientes, llamadas "variantes", que presentan variaciones en su genoma principalmente en la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la proteína Spike. Estas modificaciones aumentaron la afinidad de la proteína Spike por su receptor celular ACE2, la transmisibilidad del virus en la población y la evasión de la respuesta inmune innata

(Lorente-González et al., 2022; Telenti et al., 2022). Si bien estos cambios han afectado la afinidad por el receptor, estas modificaciones no han representado un cambio conformacional importante a nivel estructural en la proteína Spike (Gobeil et al., 2021; Kumar et al., 2022).

La transmisibilidad de este virus está determinada por el número de replicación básico (R_0) descrito como el número promedio de infecciones secundarias causadas por un individuo infectado en una población inmunológicamente nativa, es decir, en una población que no ha tenido contacto con este virus. R_0 es un factor clave para predecir la propagación de un virus en una población. También se utiliza para estimar la proporción de individuos necesarios en una población para lograr la inmunidad colectiva. Además, la magnitud de R_0 también se puede utilizar para predecir si un virus respiratorio en climas templados desarrollará un patrón estacional de infección (como se observa con los coronavirus endémicos) en lugar de una transmisión continua durante todo el año (Prada et al., 2021). Basado en los casos confirmados, la OMS determinó que el virus SARS-CoV-2 presentó un R_0 promedio de 3.8 a comienzos de la pandemia y en 2022 se ubica en 1.95, mientras que la variante Delta presentó el mayor valor de R_0 , 5.08 (Ahmad et al., 2022), indicando que dependiendo de la variante (y de la población y sus medidas preventivas) es la capacidad infectiva del virus.

Entre los síntomas que se presentan durante la infección por el SARS-CoV-2 (puede variar según la variante) se encuentran los síntomas característicos de enfermedades respiratorias como estornudos, dolor muscular, fatiga, falta del sentido del olfato, esputo, etc. (Schulze & Bayer, 2022). Esto dificulta el correcto diagnóstico, y por lo tanto

ha generado la propagación rápida del virus entre la población. Actualmente, con el fin de disminuir la mortalidad por este virus y proteger a la población de sus efectos a largo plazo se han diseñado y distribuido vacunas que permiten la generación de anticuerpos neutralizantes contra el virus. Al menos el 78% de la población mexicana ha recibido la primera dosis mientras que el 62% presenta el esquema completo de vacunación (Edouard Mathieu, 2020).

Virus causante de la Influenza A

Los virus de la influenza son virus de RNA envueltos con un genoma monocatenario de polaridad negativa que contiene ocho genes que codifican para once proteínas, entre las destacan la hemaglutinina (HA) y la neuroaminidasa (NA), debido a su participación en la interacción virus-huésped, (figura 2A).

Estos virus pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, de la cual se derivan cinco géneros: Influenza virus A, Influenza virus B, Influenza virus C, *Thogovirus* e *Isavirus*. Los que infectan a humanos incluyen tipo A y B. Para los virus de la influenza A se han clasificado diversos subtipos los cuales están etiquetados según un número H (para el tipo de hemaglutinina) y un número N (para el tipo de neuraminidasa).

Los virus de influenza A expresan HA en la superficie del virión para facilitar la entrada a la célula huésped a través de la unión a su receptor y la fusión de la membrana del virión con la membrana endosomal de la célula. Los virus de la influenza típicamente infectan células del tracto respiratorio superior de los humanos, donde la HA reconoce estructuras de glicano que terminan en ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac),

generalmente conocido como ácido siálico, unido a galactosa (Gal) en un enlace β 1-4 a glucosamina (GlcNAc) (ver figura 2B) (Byrd-Leotis et al., 2017).

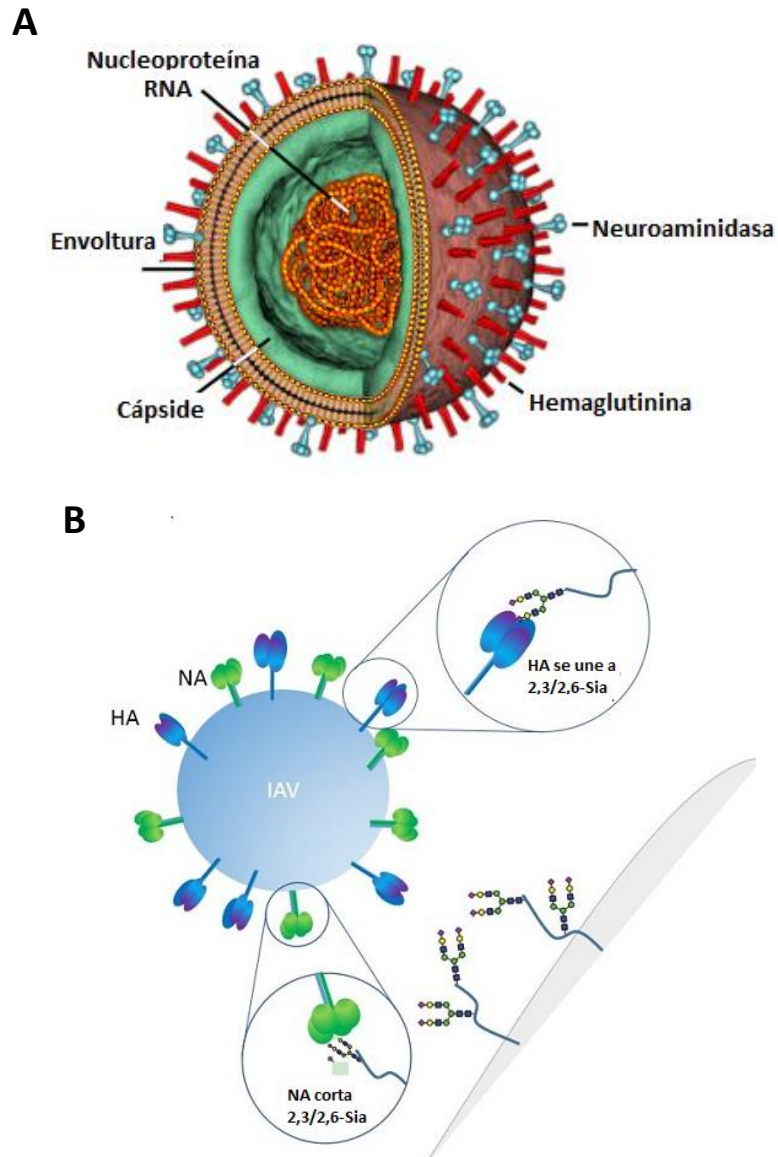


Figura 2. Esquema del virus de la influenza y su interacción con la célula huésped. (A) Esquema del virus de la influenza (adaptada (Michael W. Davidson and The Florida State University, 2015)), (B) unión del virus a la célula huésped mediante la interacción de la proteína viral HA con el receptor celular ácido siálico (adaptada (Byrd-Leotis et al., 2017)).

Según el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) han sido caracterizados dieciocho antígenos H diferentes (H1 a H18) y 11 antígenos N diferentes (N1 a N11), donde en este trabajo nos centramos en el subtipo H1N1 debido a que es el agente patógeno responsable de la pandemia reportada en el 2009 que infectó al 45% de la población mundial (Girard et al., 2010). En México, durante la temporada de Influenza estacional 2021-2022 se reportaron 1,062,724 casos sospechosos, sin embargo solo pudieron confirmarse 3,081 casos (DGE, 2022a). El valor R_0 calculado para los virus de influenza varia, la cepa responsable de la influenza estacional es en promedio de 1.3 (va de un rango de 0.9 a 2.1), mientras que, el valor R_0 calculado para el virus A/(H1N1) fue de entre 1.4 a 1.6 (Baldo et al., 2016). Dado que todos estos valores son cercanos, es razonable suponer una transmisibilidad similar entre todas las cepas de influenza A.

Los síntomas de la infección por influenza A son fiebre, fatiga, dolores de cabeza, tos, nariz congestionada, dolores musculares o corporales etc.

Debido a que la sintomatología es parecida a otras enfermedades respiratorias, se requiere una prueba de detección molecular del virus para confirmación del diagnóstico clínico.

Virus del Dengue

El DENV es un virus envuelto con un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva con un tamaño aproximado de 10.7 Kb, que se traduce como una sola poliproteína y luego se escinde por proteasas codificadas por virus y huésped en tres

proteínas estructurales cápside (C), premembrana/membrana (prM/M) y envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS) (figura 3).

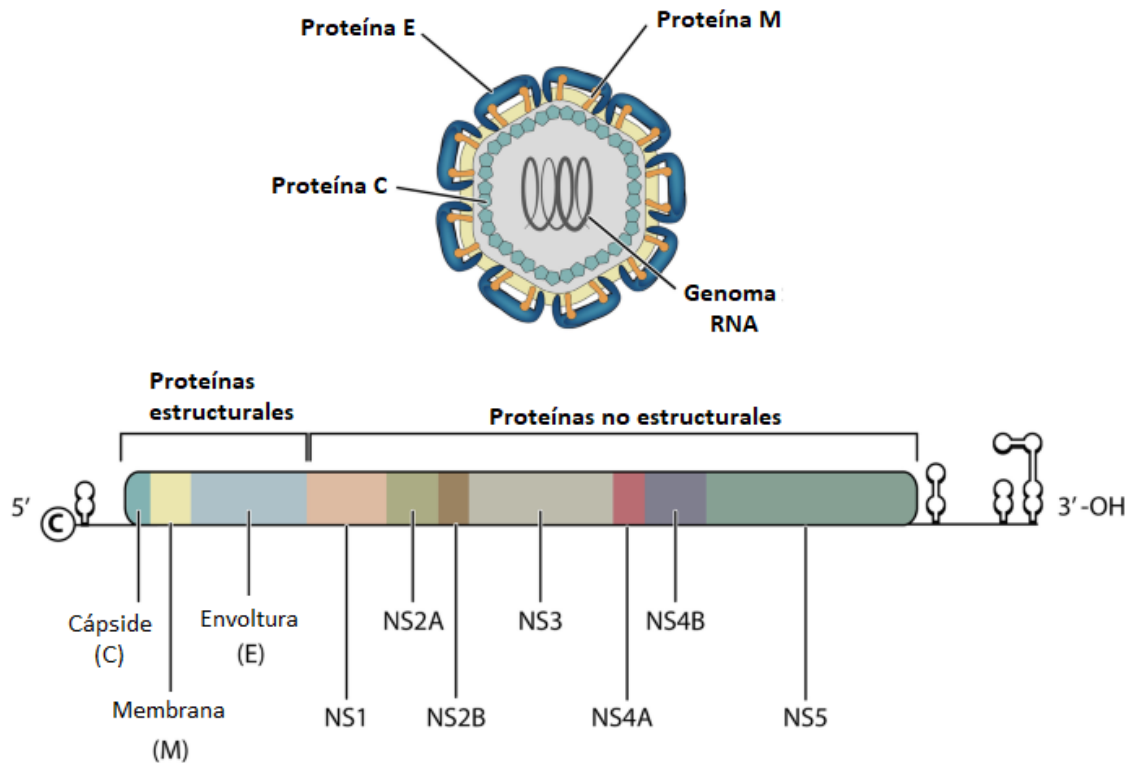


Figura 3. Esquema del virus del Dengue y su genoma (adaptada (Souza et al., 2022)).

El virus del dengue (DENV) es el patógeno causante de la fiebre del dengue (FD), la enfermedad viral transmitida por artrópodos (principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*) más prevalente en humanos en zonas tropicales. Se han encontrado cuatro serotipos del virus (DENV 1-4), todos los cuales pueden causar el espectro completo de la enfermedad en humanos.

El DENV es un miembro de la familia *Flaviviridae* del género *Flavivirus* que comparte características estructurales y en su genoma con otros virus de la misma familia como el virus de la fiebre amarilla, virus de hepatitis C, de la encefalitis japonesa y del Nilo.

El ciclo infeccioso del DENV comienza cuando el virus ingresa a las células blanco por endocitosis (células dendríticas, monocitos o macrófagos) después de que la proteína E viral se adhiere a los receptores de la superficie celular, principalmente DC-SIGN (por sus siglas en inglés, dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin) como se observa en la figura 4. Posteriormente, la acidificación endosómica induce un cambio conformacional en la proteína E, lo que resulta en la fusión de las membranas viral y endosómica y la liberación de la nucleocápside en el citoplasma (Cruz-Oliveira et al., 2015).

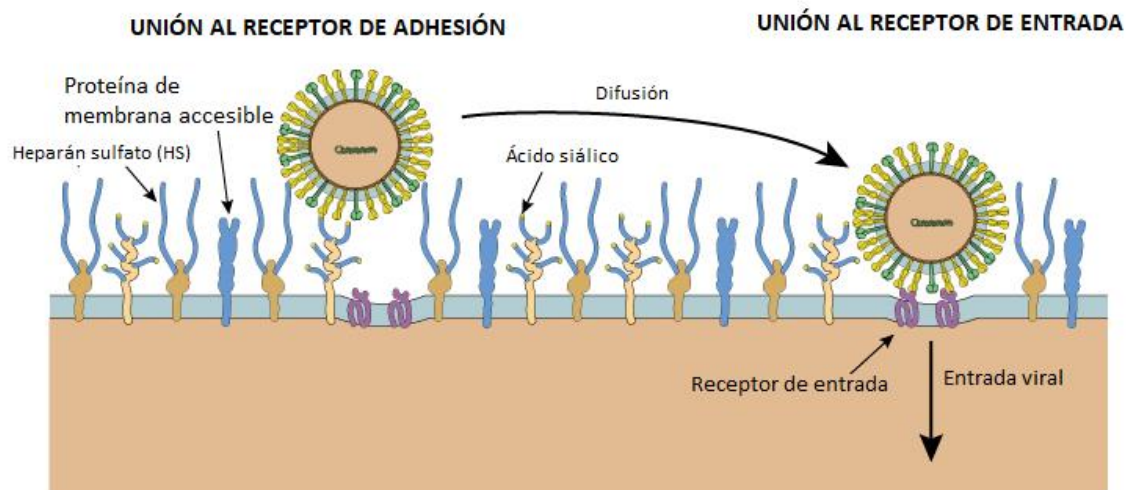


Figura 4. Esquema de la interacción del virus del dengue con su célula blanco (adaptada (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, n.d.)).

Este virus y otros transmitidos por artrópodos (Arbovirus), como la fiebre amarilla, Chikungunya y Zika, son amenazas actuales para la salud pública en áreas tropicales y

subtropicales. La frecuencia y magnitud de los brotes por estos arbovirus, están aumentando a nivel mundial, impulsados por la convergencia de factores ecológicos, económicos y sociales. La OMS ha advertido que los patógenos transmitidos por insectos, incluidos el Dengue y el Zika tienen el potencial de ser los responsables de la próxima pandemia. Por lo tanto, se requiere de un plan estratégico que se enfoque en el monitoreo, prevención, detección y respuesta ante el virus del Dengue y otros arbovirus. En México, durante el 2022 se reportaron 54,779 casos sospechosos de infecciones por DENV, sin embargo, solo se confirmaron 6,582 (DGE, 2022b). El R0 reportado para DENV, fue de entre 3.15 y 4.19, donde los cambios inducidos en el comportamiento de alimentación de sangre de los mosquitos agravan drásticamente la epidemiología del DENV llevando su R0 a un valor de 7.65 (Wei Xiang et al., 2022). Según la CDC, la infección por el DENV causa un espectro de síntomas clínicos que van desde una enfermedad aguda debilitante o enfermedad febril limitada a complicaciones hemorrágicas graves que pueden conducir a la muerte. Estos síntomas generalmente se confunden con otras enfermedades febriles como las causadas por infecciones con otros virus, por lo que se requieren métodos innovadores para diagnóstico diferencial.

Métodos de detección y diagnóstico viral

Las pruebas para la detección e identificación de virus se realizan con el fin de generar un diagnóstico certero de la enfermedad, que mejora la eficacia de los tratamientos y evitar complicaciones a largo plazo para el paciente infectado. Además, los pacientes no diagnosticados correctamente y a tiempo pueden transmitir la enfermedad a otras

personas sin saberlo, por lo que, el diagnóstico temprano puede ayudar a prevenir o detener un brote (o disminuir los casos durante una epidemia o pandemia).

Para la confirmación de un diagnóstico se utilizan múltiples métodos para la detección e identificación del patógeno viral, incluido el cultivo viral, la detección de antígenos, la detección del genoma y la serología para identificación de anticuerpos contra el patógeno.

Para el diseño de nuevas estrategias de detección y monitoreo de virus, la OMS ha instaurado lineamientos con las consideraciones mínimas necesarias tanto para el desarrollo de estas pruebas como para realizar estudios de funcionalidad y certeza de la prueba mediante un manual de recomendaciones (OMS, 2014).

Existen múltiples aspectos en la evaluación de una nueva prueba de detección, como la reproducibilidad, es decir, si se vuelve a hacer la misma prueba, se obtendrá el mismo resultado; la precisión, es decir, el grado de concordancia entre los resultados de la prueba diagnóstica en estudio y los de una prueba de referencia; y el valor adicional para una estrategia diagnóstica, es decir, la implementación de la prueba diagnóstica en el paquete rutinario de pruebas diagnósticas mejorará el diagnóstico, el tratamiento y el resultado del paciente (Van Stralen et al., 2009).

Entre los parámetros a considerar para determinar la precisión de la detección se realiza una comparación de los resultados con la prueba estándar de referencia (denominada gold estándar) que es un modelo experimental que se ha probado exhaustivamente y cuenta con la reputación de ser un método de detección confiable (Cardoso et al., 2014).

Con esos datos, se pueden determinar también otros parámetros de precisión y certeza

como, la sensibilidad de la prueba (determinando los verdaderos positivos y negativos), la especificidad, el límite de detección de la prueba, etc., los cuales les confieren veracidad a los resultados obtenidos con los métodos de detección probados (Bretnall & Clarke, 2011).

La precisión del método de detección (pruebas diagnósticas), está determinado por diversos factores como el tipo de prueba que se realiza, el ambiente en el que se lleva a cabo, el tiempo y calidad de la muestra que se desea analizar etc.

Existen dos tipos de pruebas de diagnóstico según el lugar donde se realicen, las pruebas de laboratorio y las pruebas en el punto de atención o *point of care* (POC). Las primeras son sensibles, de alto rendimiento y se realizan en un ambiente controlado con equipo y personal especializado; mientras que las pruebas POC son pruebas rápidas que utilizan los mismos principios biológicos que los utilizados en las pruebas de laboratorio, pero con una mínima manipulación de la muestra para obtener resultados en menor tiempo (aproximadamente 15 min) y sin necesidad de equipos especializados.

Los métodos de detección viral pueden dividirse entre métodos que directamente detectan elementos virales (como el genoma o las proteínas) o métodos indirectos que identifican elementos de respuesta a la infección viral del huésped, como anticuerpos específicos. A continuación, se presentan los métodos diagnósticos aprobados por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) para la identificación de los virus mencionados anteriormente, para la confirmación del diagnóstico clínico y el monitoreo epidemiológico.

Detección del Virus de Dengue

Según lo establecido por el CDC, para el diagnóstico de una infección por DENV se utilizan pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) que se realizan en muestras de suero recolectadas siete días o menos después del inicio de los síntomas, mediante la detección de secuencias genómicas virales por pruebas de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) o detectando el antígeno de la proteína no estructural 1 (NS1) del virus por inmunoensayo (Centros para el control y la prevención de enfermedades, 2019).

La proteína NS1 es detectable durante la fase aguda de las infecciones por el virus del dengue, donde un resultado positivo en la prueba de NS1 confirma la infección por el virus del dengue, pero no brinda la información sobre el serotipo y un resultado negativo en la prueba no descarta la infección por este virus.

Este tipo de abordaje diagnóstico dificulta el tamizaje real de la infección por este virus. Además, se han buscado alternativas para la detección de este virus en los vectores de transmisión con el fin de determinar las áreas de riesgo, monitorear la transmisión y evitar los brotes epidémicos, sin embargo, son pocos los métodos diagnósticos que se han desarrollado que se puedan realizar fuera de los laboratorios (S.-C. Lai et al., 2022; Yi et al., 2022).

Detección del Virus de la influenza A

Las pruebas de diagnóstico disponibles para la detección de virus de influenza A en muestras respiratorias incluyen ensayos moleculares, como las RT-qPCR y otras pruebas

de amplificación de ácidos nucleicos; y pruebas de detección de antígenos, incluidas las pruebas rápidas de diagnóstico o LFAs y los ensayos de inmunofluorescencia.

La sensibilidad y especificidad de cualquier prueba para la detección del virus de influenza en muestras respiratorias puede variar según el tipo de método de prueba, el tiempo en el que se tomó la muestra, la calidad, la fuente, el manejo y procesamiento.

La Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) recomienda el uso de pruebas de diagnóstico rápido de influenza para la detección de virus de influenza en muestras respiratorias de pacientes ambulatorios y el uso de RT-qPCR para la detección en muestras respiratorias de pacientes hospitalizados.

Sin embargo, actualmente, el diagnóstico de enfermedades respiratorias causadas por virus de la influenza se limita al diagnóstico clínico donde muy pocas veces se realiza una prueba de laboratorio confirmatoria, y debido a que los síntomas presentados se comparten con otras enfermedades respiratorias, el diagnóstico puede no ser certero.

Detección del Virus SARS-CoV-2

Entre los métodos de detección más usados actualmente para el diagnóstico de COVID 19 es la prueba de antígenos para la detección de proteínas virales nucleocápside (N) o Spike (S) y las pruebas de detección de los genes que codifican para las proteínas S y N del virus por RT-qPCR. Para obtener resultados certeros, estas pruebas están sujetas al tiempo de exposición al virus y a la sensibilidad de la prueba, por lo que la búsqueda de nuevas alternativas para la detección rápida y sensible del SARS-CoV-2 siguen siendo necesarias.

Con el fin de establecer mejores métodos de diagnóstico de estos virus de RNA, se han propuesto diversas herramientas basadas en nanomateriales y en sistemas de detección simples y rápidos que no requieran equipo especializado. En este trabajo nos centraremos en dos métodos de detección viral directos, las pruebas de flujo lateral LFAs y los ensayos ELONA (Ensayos de oligonucleótidos ligados a enzimas).

Ensayos de oligonucleótidos ligados a enzimas (ELONAs)

ELONA (Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay) es un método bioquímico basado en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Enzyme-linked immunosorbent assay o ELISA), en donde, se puede realizar la detección de un antígeno de interés (en este caso viral) usando aptámeros. Los ensayos ELONA generalmente se llevan a cabo en placas de 96 pocillos, lo que permite medir múltiples muestras en un solo experimento. Los oligonucleótidos utilizados en este método generalmente se conjugan con biotina o digoxigenina, que posteriormente pueden ser reconocidas por estreptavidina conjugada con HRP o anticuerpos anti-digoxigenina marcados con HRP (respectivamente) y al agregar el sustrato produce una señal proporcional a la cantidad de antígeno unido al pocillo que se mide colorimétricamente a 450 nm.

Existen tres tipos de ELONAs, directo, tipo sándwich y competitivo (figura 5). En el ELONA directo, el antígeno o muestra se inmoviliza directamente en la placa y el aptámero de detección conjugado se une al objetivo. Luego se agrega la molécula de reconocimiento conjugada a HRP y el sustrato, produciendo una señal indicando la presencia del analito. Este tipo de ELONA es el más sencillo y debido a que se requieren menos elementos para la detección, se considera el menos costoso.

En los ELONA tipo sándwich se utilizan dos aptámeros específicos para intercalar el antígeno. El aptámero de captura se inmoviliza en la microplaca, se agrega la muestra, el antígeno de interés se une y luego se agrega un aptámero de detección conjugado que se une a otro epítipo del antígeno objetivo. Finalmente, se agrega sustrato que produce una señal que es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. Los ELONA tipo sándwich son altamente específicos, ya que se requieren dos aptámeros para unirse a la proteína de interés (figura5).

El ELONA competitivo, puede realizarse de dos formas, en la primera, el analito marcado y sin marcar compiten por una cantidad limitada de aptámero de unión. En el ELONA competitivo indirecto, después de permitir la unión del analito marcado a la placa de microtitulación y bloquear con un agente de bloqueo adecuado, se añade el aptámero marcado junto con otro aptámero sin marcar. Posteriormente, se realiza la lectura para recopilar la señal generada a partir del aptámero marcado unido (figura 5) (Moreno et al., 2023).

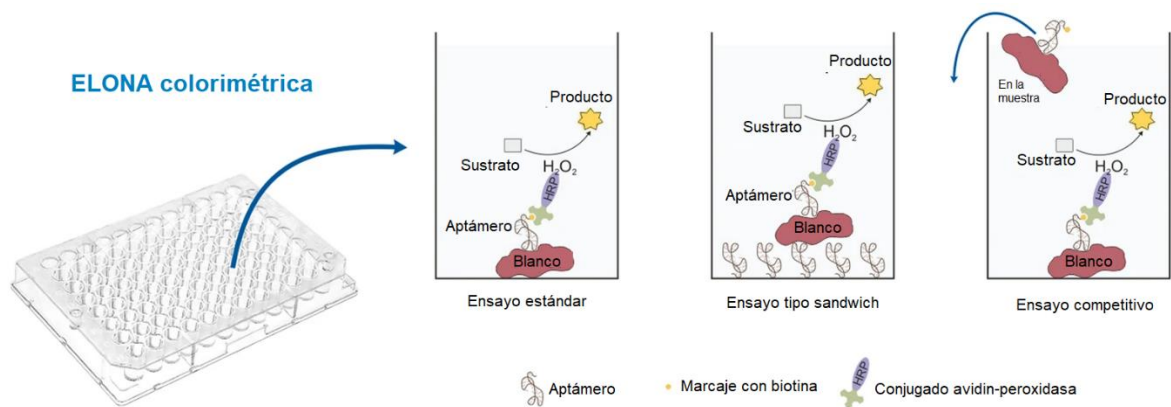


Figura 5. Esquema de los diferentes tipos de ELONA. Tipos de ELONA más comunes para la detección de antígenos utilizando aptámeros (adaptado de Stoltenburg et al., 2016).

Pruebas de flujo lateral (LFAs)

Las pruebas de flujo lateral o LFAs (*Lateral Flow Assays*, por sus siglas en inglés) son pruebas cromatográficas en papel en las que los reactivos de detección se cargan previamente y se activan cuando se agrega la muestra, obteniendo resultados en aproximadamente 15 minutos.

Estas pruebas se componen de diferentes partes o componentes que se ensamblan sobrelapadas en un respaldo. Sus componentes son la almohadilla de muestra, la almohadilla de conjugación, la membrana de detección y almohadilla de adsorción (figura 6). La membrana de detección a su vez, se divide típicamente al menos en dos zonas, una usada como control de la prueba (zona de control) y otra que indica la presencia del analito a detectar (zona de prueba). Cada uno de los componentes de la LFA son tratados por separado y los reactivos pre-inmovilizados en ellas se activan al fluir la muestra líquida por capilaridad a través de la tira (figura 6).

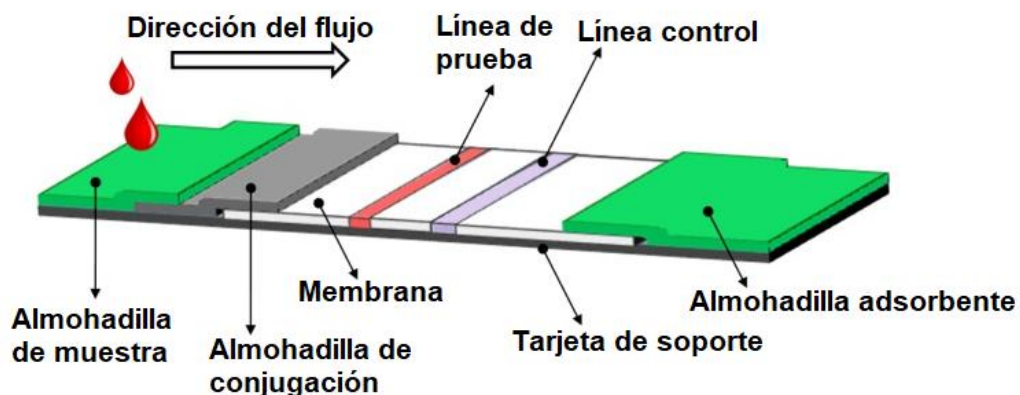


Figura 6. Configuración típica de una prueba de flujo lateral (adaptado de Koczula & Gallotta, 2016).

En las LFAs, el espécimen que tiene los analitos a detectar se coloca en la almohadilla de muestra. Se pueden analizar una gran variedad de muestras biológicas, incluyendo orina (de Lourdes Moreno et al., 2017), saliva (Carrio et al., 2015), sudor (Hudson et al., 2019), suero (Schmidt et al., 2018), plasma (Gao et al., 2017), sangre completa (Si et al., 2019) y otros fluidos, los cuales se pueden depositar directamente en esta almohadilla sin realizarles previamente ningún tratamiento.

Posteriormente, la muestra fluye por capilaridad al segundo componente, la almohadilla de conjugación, que contiene los elementos de reconocimiento que son específicos del analito objetivo (anticuerpos, ácidos nucleicos, proteínas, etc.) y que están conjugados con moléculas que generan una señal actuando como marcadores (fluoróforos, nanopartículas de oro coloidal, látex, selenio o colorantes, etc.).

Una vez que el analito se une a las moléculas de reconocimiento, estos complejos migran hacia la membrana de detección (generalmente de nitrocelulosa) que contiene componentes biológicos específicos inmovilizados en zonas de detección que reaccionan con el analito unido al conjugado. El reconocimiento del analito en este sitio da como resultado una respuesta en la zona de prueba, mientras que una respuesta en la zona de control únicamente indica el adecuado flujo del líquido a través del sistema (figura 7).

Después de la detección, la muestra no adherida sigue fluyendo a través de la prueba, hacia la almohadilla absorbente en el lado distal de la tira.

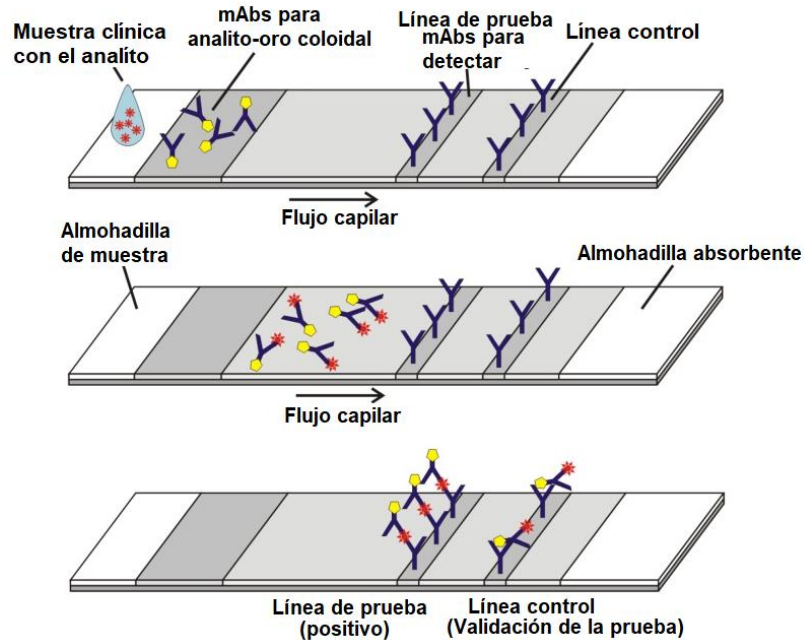


Figura 7. Esquema del funcionamiento de la LFA (adaptado de Lee et al., 2013).

Las LFAs se pueden clasificar según el formato de detección que presenten, los de tipo sándwich (más comunes), tipo competitivo y los de detección múltiple. Entre estos formatos los componentes (almohadillas) tienen la misma función, sin embargo, la forma en la que se realiza la interacción de la detección y la interpretación para obtener los resultados es diferente. La mayoría de las pruebas LFA están diseñadas en formato sándwich, utilizando dos elementos que se unen a diferentes sitios en el antígeno que se va a detectar (un elemento de captura que es parte de un sensor y un elemento inmovilizado en la fase sólida de la LFA). En este formato el analito de interés queda atrapado en el centro, creando una especie de “Sándwich” (figura 8).

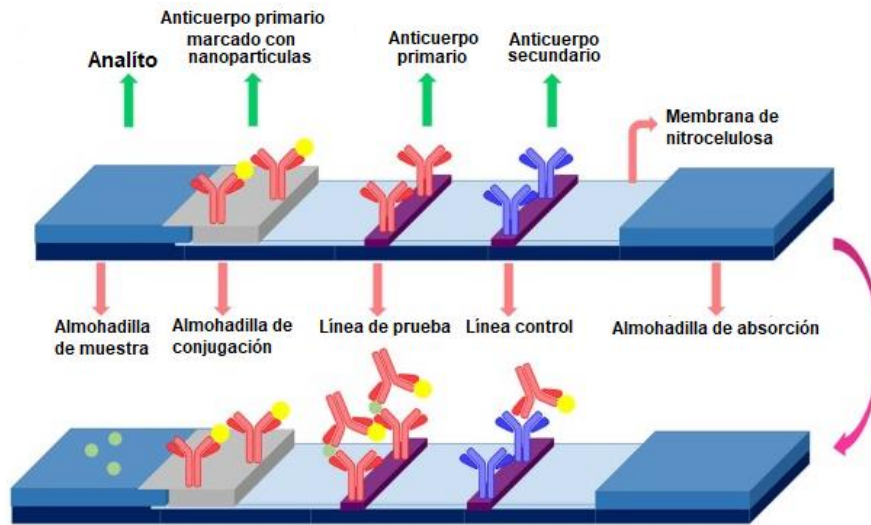


Figura 8. LFA con formato tipo sándwich (adaptado Bahadır & Sezgentürk, 2016).

En el formato tipo competitivo (figura 9A), la solución que contiene el analito se aplica sobre la almohadilla de muestra y el elemento de detección marcado que se encuentra en la almohadilla se hidrata y comienza a fluir con el líquido por capilaridad. En la zona de prueba se inmoviliza el mismo analito a detectar, el cual se une específicamente al complejo mientras que en la zona de control se inmoviliza una molécula de reconocimiento del complejo (comúnmente un anticuerpo secundario complementario). Cuando la muestra líquida llega a la zona de prueba, el analito pre-inmovilizado se unirá al conjugado marcado, en caso de que, el analito en la muestra esté ausente, observándose dos líneas en la prueba (Sajid et al., 2015). Si el analito está presente, cuando el conjugado llegue a la zona de detección ya habrá interactuado con el analito por lo cual no se unirá al que este inmovilizado, observándose únicamente la zona de control.

Se llama competitivo, debido a que el antígeno en la solución de muestra y el que está inmovilizado en la línea de prueba de la tira compiten para unirse con el conjugado marcado, por lo tanto, la ausencia de color en la línea de prueba es un indicativo de la presencia de analito (figura 9C), mientras que la aparición de color tanto en la línea de prueba como en la de control indica un resultado negativo (figura 9B). Este tipo de formato esta sugerido para detectar compuestos de bajo peso molecular que no pueden unirse a dos ligandos simultáneamente (Koczula & Gallotta, 2016).

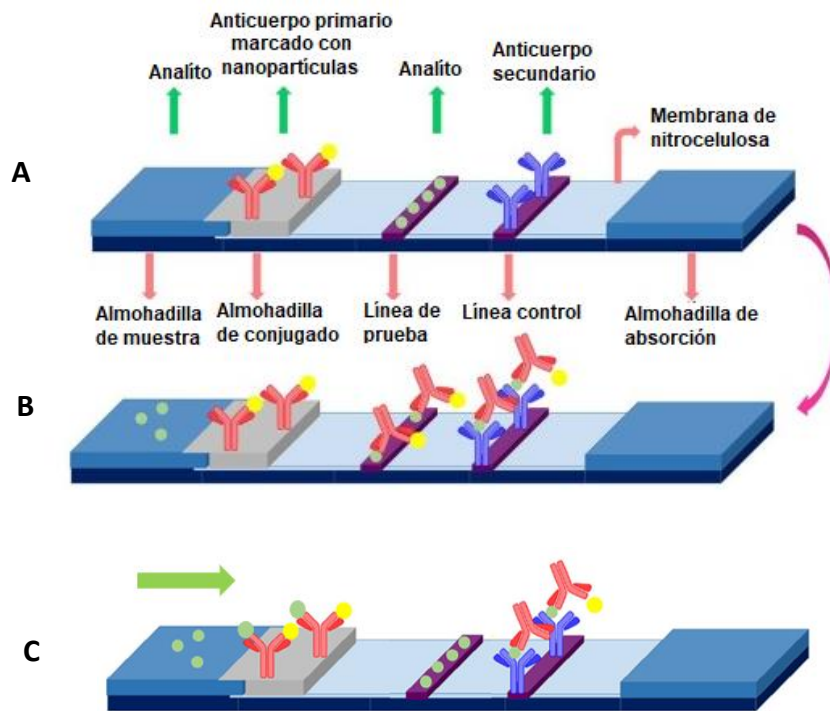


Figura 9. LFA con formato tipo competitivo. A) Diseño de la LFA, B) Diseño de la LFA con muestra sin el analito el cual genera un resultado negativo en la prueba y C) Diseño de la LFA con muestra que tiene el analito a detectar el cual genera un resultado positivo en la prueba (adaptado de Bahadır & Sezginürk, 2016).

La popularidad e importancia tecnológica y comercial de las LFAs radica en sus ventajas contra otros métodos de detección como:

- I. Facilidad de fabricación relativa, donde los equipos, materiales y procesos ya están desarrollados y disponibles
- II. Son fácilmente escalables a producción de alto volumen
- III. Tienen una larga vida útil de 12 a 24 meses, a menudo sin refrigeración
- IV. Facilidad de uso para el operador, con mínimos pasos e interpretación sencilla de los resultados
- V. Requiere pequeños volúmenes y se pueden usar múltiples tipos de muestra
- VI. Los resultados pueden observarse a simple vista o integrarse con dispositivos electrónicos o sistemas de lectura para generar bases de datos
- VII. Tienen alta sensibilidad, especificidad y buena estabilidad
- VIII. Versatilidad de formatos, moléculas de bioreconocimiento, etiquetas (marcadores) y sistemas de detección
- IX. Se obtienen resultados en menos de 30 minutos
- X. Tienen costos de producción relativamente bajos, a comparación de otros sistemas
- XI. Cuentan con presencia y aceptación en el mercado ya que no se requiere una previa formación del usuario para su uso

A pesar de que se le ha dado mucho énfasis a la aplicación de este sistema en el diagnóstico clínico, su uso se ha extendido a áreas tan diversas como veterinaria,

agricultura, alimentos, seguridad ambiental, pruebas industriales, así como en investigación para el diagnóstico molecular.

Las múltiples propiedades del sistema y su fácil y rápido uso las han convertido en excelentes herramientas para la detección de diversas moléculas.

Las LFAs han permitido detectar de manera rápida y precisa, patógenos infecciosos reconocidos como causantes de problemas de salud públicos, como el virus de la influenza A (Robson et al., 2018), el virus de la hepatitis B (Shen & Shen, 2019), la bacteria *Clostridium tetani* causante del tétanos (Juanzu Liu et al., 2018), *Chlamydia trachomatis*, causante de la infección por clamidia urogenital (Gwyn et al., 2016), entre otros.

La necesidad de tener métodos de detección rápidos y eficientes en áreas rurales donde ha aumentado la incidencia de enfermedades diseminadas por vectores, ha generado el desarrollo de LFAs para la detección de estos patógenos en el vector transmisor (Barfield et al., 2010; Y. Zhang et al., 2015).

Las LFAs generalmente utilizan nanopartículas de oro (AuNPs) como moléculas de marcaje que se funcionalizan con elementos de reconocimiento biológico para formar biosensores específicos que capturan los antígenos de interés para realizar la detección.

El desarrollo de las LFAs que utilizan biosensores basados en AuNPs se utilizan en el diagnóstico clínico para la detección de virus, bacterias, hongos, hormonas, etc. sin la necesidad de disponer de un laboratorio especializado.

Nanopartículas: clasificación y propiedades

En 2011, la Comisión de la Unión Europea definió a la nanopartícula (NP) de la siguiente manera:

“La nanopartícula es un material natural, incidental o manufacturado que contiene partículas, en un estado ya sea no unido o agregado o aglomerado y para la cual el 50% o más de las partículas en la distribución de su tamaño numérico, una o más dimensiones externas de ella están en el rango de tamaño de 1 nm – 100 nm”.

Debido a que la definición de NP se volvió muy amplia, existen muchas maneras de clasificarlas, la más usada es por su composición química clasificándose en 3 grupos (Ealia & Saravanakumar, 2017): orgánicas, inorgánicas y basadas en carbono.

Para esta tesis, son de nuestro interés las NP inorgánicas, en particular las basadas en metales, debido a sus posibles aplicaciones en diversas áreas que van desde la electrónica, la cosmética, los recubrimientos, el embalaje y la biotecnología incluyendo la biomedicina, donde en esta última área, se han distinguido por sus aplicaciones en terapias, tratamientos, métodos de diagnóstico, entre otros.

Los metales comúnmente utilizados para la síntesis de estas NPs son aluminio (Al), cadmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), oro (Au), hierro (Fe), plomo (Pb), plata (Ag) y zinc (Zn). Este tipo de NPs tienen propiedades distintivas, tales como sus características superficiales (alta relación entre superficie y volumen), su tamaño de poro, su carga superficial y densidad de carga superficial, sus diferentes estructuras ya sean cristalinas, amorfas o con formas (como esféricas y cilíndricas), su color, su alta reactividad y sensibilidad, etc.

Nanopartículas de oro: características y ventajas de su aplicación.

Entre los diferentes tipos de NP, las nanopartículas metálicas, especialmente las nanopartículas de oro (AuNPs), han generado gran interés de diferentes campos de la ciencia, ya que además de las propiedades que presentan como NP, presentan características particulares como, alto coeficiente de absorción de rayos X, facilidad de manipulación sintética, lo que permite un control preciso sobre las propiedades fisicoquímicas de la partícula, fuerte afinidad de unión a tioles, disulfuros y aminas, ópticas sintonizables únicas y propiedades electrónicas distintas (Alaqad & Saleh, 2016). Existen muchas formas en que se pueden encontrar las AuNPs, determinando su aplicación en función a sus características específicas. Las características más sobresalientes que dependen de la morfología de las NPs son la resonancia plasmónica superficial (SPR) y las propiedades ópticas, haciéndolas excelentes nanomateriales para el desarrollo de biosensores y sistemas de detección en el área médica.

Las moléculas biológicas más utilizadas para conjugar con las AuNPs y conferirles funcionalidad son los ácidos nucleicos (fragmentos de DNA, RNA, aptámeros, oligómeros, etc.), enzimas, anticuerpos, proteínas, péptidos y algunos biopolímeros.

La elección de la estrategia de conjugación está inicialmente dictada por una combinación de factores que incluyen el tamaño, la forma, la química de la superficie y la morfología de las AuNPs, la naturaleza de los ligandos que se acoplaran a la superficie y sus grupos funcionales disponibles, el tipo de molécula biológica, su tamaño, su composición química y la utilidad deseada en la aplicación final de la AuNPs funcionalizadas. Teniendo en cuenta las características anteriores, la conjugación de

AuNPs-ligando puede ser de tipo covalente o no covalente (por unión electrostática, formas de adsorción y encapsulación) (Sapsford et al., 2013).

Además de la funcionalización, cubrir la superficie de la AuNP con diferentes ligandos (como anticuerpos o proteínas) le proporciona solubilidad en disolventes acuosos u orgánicos, le otorga estabilidad y evita la agregación. Aunque las AuNPs tienen un núcleo de metal noble bastante inerte y no reactivo, para las aplicaciones biológicas a menudo se requiere la funcionalización de la superficie para garantizar la alta biocompatibilidad y la baja citotoxicidad (Mieszawska et al., 2013).

Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas

La caracterización de las AuNPs se basa en la determinación del tamaño, la morfología y la carga superficial (entre otras características relacionadas como la estabilidad física, la dispersión etc.), utilizando diferentes técnicas avanzadas. En la Tabla 1 se mencionan las diferentes herramientas y métodos de caracterización de las nanopartículas.

Tabla 1. Métodos y pruebas para la caracterización de las nanopartículas (adaptado de Bhatia, 2016).

Parámetro	Método de caracterización
Determinación de la carga	Anemometría láser Doppler Determinación del potencial zeta (DLS)
Análisis químico de la superficie	Espectrofotometría de masas de iones secundarios estáticos Sortometría
Estabilidad del ligando	Bioensayo de extracción del ligando de las nanopartículas Análisis químicos del ligando
Estabilidad de dispersión de las nanopartículas	Temperatura crítica de floculación Microscopía de fuerza atómica
Tamaño y distribución de las partículas	Defractometría láser Espectroscopía de correlación de fotones Microscopía electrónica de barrido Microscopía electrónica de transmisión Determinación del diámetro hidrodinámico
Hidrofobicidad de la superficie	Medición del ángulo de contacto con el agua Espectroscopía de fotoelectrones por rayos X

A continuación, hablaremos brevemente de las técnicas más usadas (Espectroscopía UV-Vis y DLS) para caracterizar nanopartículas.

Espectroscopía UV-Vis

La espectrofotometría de absorción ultravioleta y visible es una técnica basada en la atenuación de la medición de la radiación electromagnética por una sustancia

absorbente. Esta radiación, tiene un rango espectral de aproximadamente alrededor de 400-800 nm, donde puede observarse una atenuación resultante de la reflexión, dispersión, absorción o interferencia y medirse por absorbancia (Passos & Saraiva, 2019). Los nanobjetos como las AuNPs cuentan con propiedades ópticas bien definidas que dependen del tamaño, la forma y la funcionalización de la superficie de la AuNP (Humbert et al., 2013).

Esta técnica se usa para caracterizar la resonancia de plasmón superficial de las AuNP, donde se pueden observar cambios en el pico máximo de absorbancia cuando se dan cambios de tamaño o funcionalización de las AuNPs. Debido a que la absorbancia es proporcional a la concentración del analito a determinar, estos cambios también han sido utilizados para la detección de moléculas en sistemas de detección coloidal.

Ensayo de dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de la luz o DLS (*Dynamic Light Scattering*, por sus siglas en inglés) es una técnica hidrodinámica que mide, generalmente, los coeficientes de difusión traslacionales y / o rotacionales, que luego se relacionan con tamaños y formas a través de relaciones teóricas (Pecora, 2000).

DLS se utiliza como una técnica óptica-analítica común para caracterizar la distribución del tamaño de las partículas (o macromoléculas) en suspensión. Las AuNPs tienen una alta capacidad de dispersión de la luz, lo que les permite ser detectados por DLS y su intensidad de dispersión de la luz es proporcional al tamaño de partícula. Por lo tanto, esta técnica se ha utilizado recientemente para observar el cambio de tamaño de las AuNPs causados por los analitos unidos (J. Wang et al., 2019).

Actualmente, esta técnica no solo se usa para caracterizar a las AuNPs funcionalizadas, sino que también, se utiliza para la generación de biosensores, empleado a las AuNPs como sondas para la detección de diversas moléculas (Y. H. Lai et al., 2015; Chao Li et al., 2016; Shardlow et al., 2019).

Aplicaciones de las nanopartículas de oro

Como se describió previamente, las AuNPs tienen características particulares que les confieren ventajas de uso sobre otros nanomateriales en sistemas biológicos. Sus aplicaciones han desarrollado tecnologías trascendentes en el área biotecnológica y médica, entre las más importantes se encuentran las terapias fototérmicas, donde las AuNPs son las más utilizadas como agentes fotosensibilizadores para la eliminación de células tumorales, como portadores de fármacos para mejorar la distribución y administración y como biosensores para la detección de moléculas o patógenos de importancia clínica.

Típicamente, los biosensores de AuNPs consisten en un ligando inmovilizado en la superficie de la AuNP que reconoce al analito o sustrato biológico. Este reconocimiento genera cambios en el entorno de las AuNPs, resultando en cambios en el estado de agregación de las mismas que conducen a su vez a cambios de color detectables (Y. Chen et al., 2017). Los cambios de color surgen del acoplamiento de los plasmones entre partículas cambiando el color de rojo a púrpura o azul durante la agregación o de púrpura a rojo durante la redispersión de la agregación (Ghosh & Pal, 2007).

Además, la detección del analito puede provocar cambios en las propiedades ópticas y electrónicas de la AuNP (Hao et al., 2011; Y. Wang & Alocilja, 2015). Como ligandos para

inmovilizar en las AuNPs, se han utilizado diferentes moléculas como DNA (Q. Wang et al., 2016), aptámeros (Juewen Liu et al., 2006), oligonucleótidos (Matsishin et al., 2017), anticuerpos (Chen-zhong Li et al., 2011) y otras moléculas (Miranda et al., 2011).

Por todo lo antes mencionado, la importancia del desarrollo de los biosensores ha aumentado en los últimos años, buscando siempre los formatos más simples, estables y con mejor sensibilidad, que puedan usarse incluso fuera de un laboratorio para una rápida detección.

Aptámeros

Con la intención de mejorar la sensibilidad y especificidad de los métodos rápidos de diagnóstico molecular, se han desarrollado diversas moléculas de reconocimiento como los aptámeros.

Los aptámeros son ácidos nucleicos cortos (generalmente de 12 a 80 nucleótidos de largo) capaces de unirse de forma específica y estrecha a sus moléculas diana. El término aptámero se deriva de la palabra latina *aptus* (ajuste) y la palabra griega *meros* (parte) (Nimjee et al., 2017).

Estos se generan y seleccionan mediante un proceso llamado SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial, un proceso de selección que permite el aislamiento de ligandos oligonucleotídicos entre grandes poblaciones de oligonucleótidos (bibliotecas de hasta 10^{15} oligonucleótidos aleatorios) que pueden ser de DNA, RNA o RNA modificado monocatenario, que se unen a objetivos moleculares,

con alta afinidad y especificidad (Ellington & Szostak, 1990; Robertson & Joyce, 1990; Tuerk & Gold, 1990).

Para la selección de aptámeros se utilizan bibliotecas de oligonucleótidos que contienen una región central con una secuencia aleatoria, rodeada por dos regiones con secuencias constantes, que sirven para la amplificación de la biblioteca durante la selección. Esta biblioteca se pone en contacto con la molécula blanco donde solamente algunos miembros de esta enorme biblioteca se unirán al objetivo deseado. Los ácidos nucleicos seleccionados se amplifican y se usan para las siguientes rondas de selección y el proceso se repite hasta que se obtengan secuencias que cumplan con la especificidad deseada. La clave de un procedimiento SELEX exitoso, es separar eficientemente a esos oligonucleótidos no afines de aquellos con afinidad. La división puede llevarse a cabo, utilizando filtración de nitrocelulosa, inmunoprecipitación, separación con geles de acrilamida o la inmovilización del objetivo en una matriz sólida (figura 9).

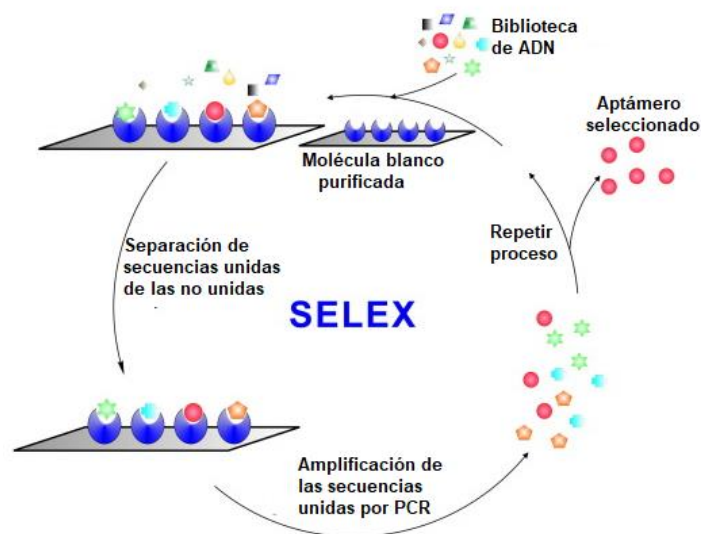


Figura 10. SELEX convencional para generar aptámero de DNA (adaptado de Hamula et al., 2011).

Después de cada ronda de selección, las secuencias unidas a la molécula blanco se amplifican usando cebadores correspondientes a regiones fijas de la biblioteca. En promedio, de 5 a 15 rondas de selección son suficientes para obtener aptámeros candidatos. Posteriormente, la biblioteca enriquecida se clona, y se determinan las secuencias individuales correspondientes a los aptámeros mediante secuenciación (Kulbachinskiy, 2007).

Los aptámeros pueden unirse a diversas moléculas como siRNAs (Berezhnoy et al., 2012), fármacos (Bagalkot et al., 2006), proteínas (Yamamoto & Kumar, 2000; Zhai et al., 2001), colorantes (Babendure et al., 2003), virus (Nitsche et al., 2007), células enteras (Raddatz et al., 2008) incluso a nanomateriales como las AuNPs (J. Zhang et al., 2013) para la elaboración de biosensores.

En los últimos 10 años, los aptámeros se han utilizado en la detección analítica, el diagnóstico y las aplicaciones de administración de fármacos, debido a las siguientes características (Sun & Zu, 2015):

- I. Tienen un tamaño pequeño, que le permite mejor transporte e internalización en las barreras celulares.
- II. Capacidad para someterse a cambios conformacionales tridimensionales sustanciales al unirse a su objetivo
- III. Son prácticamente no inmunogénicos y no tóxicos in vivo.
- IV. No provocan efectos secundarios imprevistos en sistemas biológicos debido a que no cuentan con regiones redundantes (como las regiones Fc redundantes de los anticuerpos)

- V. Se pueden desarrollar contra un rango aparentemente ilimitado de objetivos
- VI. Son térmicamente estables, por lo que pueden almacenarse y transportarse fácilmente
- VII. Muestran resistencia ante cambios de pH sin cambiar su conformación tridimensional. Si los aptámeros se llegaran a desnaturalizar en condiciones extremas ambientales, pueden replegarse nuevamente, después de eliminar las condiciones de desnaturalización. Sin embargo, inclusive en condiciones desnaturalizantes pueden unirse a sus objetivos.
- VIII. Pueden producirse o modificarse a gran escala, industrialmente hablando, con una variación mínima de lote a lote y en un corto tiempo (horas)
- IX. Bajos costos de producción por sus sencillas técnicas de síntesis.

Caracterización de los aptámeros

La caracterización de aptámeros no cuenta aún con pautas universalmente aceptadas, sin embargo, se han utilizado diversos métodos para determinar su conformación estructural en 2D y 3D, su afinidad y las posibles interacciones que lleva a cabo con su molécula blanco. Para la determinación de sus estructuras secundarias y terciarias se han utilizado diversos softwares que a partir de la secuencia nucleotídica generan modelos estructurales utilizando la mínima energía libre. Entre los ensayos que se han utilizado para medir eficazmente las interacciones aptámero-objetivo (y su afinidad) se incluyen la resonancia de plasmón superficial (SPR), la polarización/anisotropía de fluorescencia (FA/FP), y electroforesis capilar (CE) y los ensayos ELONA, sin embargo, cada ensayo tiene

su propio conjunto de limitaciones y no todos son adecuados dependiendo de la aplicación del aptámero.

En este trabajo, la especificidad y afinidad de los aptámeros se determinaron por ensayos de dot blot y ensayos de ELONA, respectivamente.

El ensayo de dot blot es un método alternativo simplificado del tradicional Western Blot para la detección de la presencia o ausencia de una proteína o biomolécula particular en diversas muestras. Se caracteriza por ser un ensayo rápido, simple y económico que analiza la interacción entre dos moléculas, una de las cuales está inmovilizada en la superficie de una membrana (generalmente de nitrocelulosa), donde convencionalmente se mide la interacción entre antígeno-anticuerpo mediante una señal. Estos ensayos han sido adaptados para sustituir a los anticuerpos por aptámeros y así determinar la especificidad de un aptámero contra su antígeno, ya sea para evaluar el enriquecimiento de un pool de secuencias durante el SELEX o incluso como método diagnóstico rápido. Si bien es un método de detección preliminar su uso se complementa con otros métodos de detección más sensibles como los ensayos ELONA, sin embargo, podría usarse en lugares donde el equipo para realizar ELONAs no está fácilmente disponible (Citartan, 2021).

Los ensayos ELONA, se utilizan generalmente para determinar la afinidad de los aptámeros con su molécula blanco. Para ello, la densidad óptica (DO) resultante de las diferentes concentraciones de aptámero con una concentración constante de antígeno, se gráfica y mediante una ecuación de regresión no lineal se calcula la constante de disociación (Kd). A menor Kd mayor afinidad presenta el aptámero por su antígeno.

Uso de aptámeros para mejorar el diagnóstico molecular

La desventaja de los métodos de diagnóstico convencionales, como los métodos inmunológicos (como ELISA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el aislamiento de patógenos, el cultivo para el crecimiento y la identificación microscópica, es que requieren alrededor de más de 24 horas para obtener los resultados. En los últimos años, las tecnologías de diagnóstico en el punto de atención, ha creado un cambio en el campo del diagnóstico y la biodetección al mejorar la velocidad y la precisión de los métodos diagnósticos, mediante la reducción en el tiempo de respuesta, de la dependencia a equipos sofisticados y personal calificado. Como parte de la mejora en las pruebas POC, los aptámeros se han utilizado para reemplazar diversas moléculas de reconocimiento (como los anticuerpos) con el fin de disminuir los costos y mejorar la sensibilidad y especificidad de los métodos.

Actualmente, varios aptámeros se utilizan de forma rutinaria para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, entre los que se incluyen métodos fluorescentes (C. Zhang & Johnson, 2009), colorimétricos (Bosak et al., 2019; Medley et al., 2008) y electroquímicos (Jo et al., 2015).

En particular, en los últimos años se ha reportado el desarrollo de aptámeros para la detección y diagnóstico de enfermedades virales de importancia mundial como las enfermedades causadas por los virus Zika y Chikungunya (Saraf et al., 2019), la fiebre del Valle del Rift (Ellenbecker et al., 2012), encefalitis transmitida por garrapatas (Kondratov et al., 2013), SARS-CoV-2 (Stanborough et al., 2021; L. Zhang et al., 2020) entre otros.

Además, se han propuesto a los aptámeros como marcadores diagnósticos *in vivo* de cáncer de ovario en modelos murinos (J. Wang et al., 2021), gastrointestinal (Pan et al., 2018) hepatocarcinoma (Shangguan et al., 2008), etc.

Por todo lo descrito, se ha propuesto el uso de los aptámeros para la mejora de métodos diagnósticos ya establecidos o en el desarrollo de nuevos métodos alternativos.

CAPÍTULO 2

Justificación

Las enfermedades infecciosas emergentes son provocadas por un agente infeccioso recientemente identificado o por microorganismos que reaparecen después de un control previo, y/o erradicación y representan una amenaza grave para la salud pública a nivel global. Casi el 60% de las enfermedades infecciosas emergentes son por zoonosis y aproximadamente el 40% son causadas por virus emergentes o reemergentes. El estudio y la detección de estos virus son acciones fundamentales para el control epidemiológico, el desarrollo de tratamientos y a su vez la prevención de epidemias y pandemias. El desarrollo de pruebas sensibles, rápidas y accesibles para el oportuno diagnóstico y contención de los casos es una prioridad en México. El uso de pruebas rápidas que no requieran un ambiente de laboratorio agilizará el monitoreo de la presencia de virus emergentes en diversas zonas aisladas y de bajos recursos. El diseño de sistemas de detección de virus que sean sencillos y económicos permitirá la disminución de los tiempos de espera en las unidades de salud pública.

Es por ello, que este trabajo propone diseñar y desarrollar tres sistemas de detección de virus de RNA como herramientas alternativas de diagnóstico. El primer sistema consiste en una prueba flujo lateral compuesta de biosensores basados en nanopartículas de oro recubiertas con anticuerpos específicos contra la proteína E para la detección de virus del dengue (y otros flavivirus). El segundo sistema consiste en una prueba rápida tipo

dot blot basada en un biosensor que detecta la proteína RBD del virus SARS-CoV-2 por colorimetría.

El tercer sistema, consiste en un ensayo ELONA que utiliza aptámeros específicos como moléculas de detección para la detección del virus de influenza. Además, en este trabajo se reporta el diseño, generación y caracterización de aptámeros específicos contra proteínas virales con el fin de estandarizar la síntesis de aptámeros específicos y aplicar esos aptámeros en sistemas teranósticos.

Objetivos

Objetivo general

Diseñar, desarrollar y optimizar sistemas de detección basados en bionanosensores y aptámeros para la detección de virus de RNA (dengue, influenza A y SARS-CoV-2).

Objetivos específicos

1. Diseñar, caracterizar fisicoquímicamente y evaluar la funcionalidad, de los biosensores (nanopartícula de oro-anticuerpo) para detectar DENV y SARS-CoV-2
2. Elaborar sistemas de flujo lateral utilizando los biosensores (AuNP-Anticuerpos) para la detección de virus de RNA (Dengue)
3. Generar y caracterizar aptámeros específicos contra la proteína H1 del virus de la influenza A (H1N1)
4. Elaborar sistemas ELONA utilizando los aptámeros diseñados para la detección del virus de la Influenza A (H1N1).

CAPÍTULO 3

Materiales y métodos

Materiales

Reactivos

Diseño de los biosensores:

- Nanopartículas de oro esféricas recubiertas de citrato (cat. A11-60-CIT-DIH, Nanopartz)
- Kit de conjugación de oro (40nm, 20 OD) ab154873
- Sacarosa (cat. PQ07642, Fermont)
- Tris (cat. 161-0719, Biorad)
- Albúmina de suero bovino (BSA) (cat. A9647-100G, Merck)
- Azida de sodio (cat. 26628-22-8, Sigma-Aldrich)
- Anticuerpo anti-flavivirus, antígeno 4G2 (cat. NBP2-52709-0,2 mg, Novus)
- Anticuerpo anti-RBD SARS-CoV-2 (cat. MAB10540, R&D systems)
- Anticuerpo anti-Spike SARS-CoV-2 (2019-nCoV) (cat. 40591-MM42, Sino Biological)

Diseño de la tira de flujo lateral:

- Fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (cat. 7782-85-6, Sigma-Aldrich)
- Fosfato dihidrógeno de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (cat.10049-21-5, Sigma-Aldrich)

- Tetraborato de sodio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (cat. 1303-96-4, Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (cat. 9002-93-1, Sigma-Aldrich)
- Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) (cat. 10890, Sigma-Aldrich)
- Alcohol polivinílico (PVA) (cat. 341584-500g, Sigma-Aldrich)
- Polivinilpirrolidona (PVP) (cat. 25249-54-1, Sigma-Aldrich)
- Caseína (cat. C6554, Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (cat. 9005-64-5, Sigma-Aldrich)
- Anticuerpos IgG anti-ratón (cat. Ab6708, Abcam)
- Almohadilla absorbente (cat. 07.623.30, Claremont Bio)
- Tarjeta Adhesiva (cat. 07.615.40, Claremont Bio)
- Membrana de nitrocelulosa (NC) (cat. 07.626.10, Claremont Bio)
- Almohadilla de muestra (cat. 07.622.30, Claremont Bio)
- Almohadilla de conjugación (cat. 07.614.30, Claremont Bio)

Métodos

Propagación del virus del Dengue

El DENV que se utilizó en este trabajo se aisló del suero de un paciente virémico con diagnóstico confirmado de fiebre aguda por dengue atendido y diagnosticado en Nuevo León en agosto de 2012. El virus obtenido de la muestra de suero fue aislado y propagado en células de mosquito C6/36. Se aisló el genoma viral y éste fue secuenciado mediante la plataforma Sanger e identificado con el siguiente número de acceso en Genbank:

KM279427.1. Los virus se propagaron en células C6/36 en medio Leibovitz L-15, suplementado con suero fetal bovino (5-10 %), se incubaron a 28°C sin atmósfera de CO₂ y se purificaron mediante un protocolo tradicional de ultracentrifugación sin gradiente en una solución de sacarosa seguido de precipitación selectiva de viriones (Jensen et al., 2016). Los aislados virales se titularon utilizando el protocolo para la formación de focos líticos en células Huh-7, tinción con el colorante Naphtol Blue-Black y la Dosis Infecciosa Mediana de Cultivo de Tejidos (TCID₅₀) y la Unidad Formadora de Placa por mL (PFU/mL) se calculó por titulación viral (Horstmann, 1970), las ecuaciones y cálculos se pueden consultar en el anexo A. Se almacenaron las alícuotas de stock viral a -80 °C hasta su uso.

Preparación de los biosensores

Optimización de la funcionalización de AuNPs por adsorción

Para optimizar la funcionalización de la superficie de las AuNPs con anticuerpos, se cambió el pH de la solución resuspendida antes de agregar el anticuerpo. Para ajustar el pH de la solución de nanopartículas, se utilizó una solución de borato 0.1 M a un pH diferente (5.0-10.0). La estabilidad de los conjugados a diferentes valores de pH se midió mediante la prueba de agregación de oro (GAT), modificando las absorbancias utilizadas en la ecuación (Chamorro-García et al., 2016) y ajustando los valores de absorbancia presentados para las AuNP de 60 nm. Se colocaron 100 µL de nanopartículas en una placa de 96 pozos, luego se agregaron 20 µL de tampón borato 0.1 M de cada pH. Se añadieron 10 µL del anticuerpo (hasta una concentración final de 10 µg/mL) a las nanopartículas y se incubaron durante 30 minutos con agitación a 4 °C. Cada muestra se preparó por triplicado y se midió el valor de absorbancia a 534 y 600 nm en un espectrofotómetro.

Posteriormente, se añadió a cada pocillo una solución de NaCl al 20%, se incubó durante 10 minutos a 23°C y se midió la absorbancia a 534 y 600 nm. Los valores se usaron para calcular el valor de GAT mediante la siguiente ecuación, identificando como el conjugado menos estable al de mayor valor de GAT:

$$\mathbf{UAbs_{cambio}} = [\mathbf{UAbs534} - \mathbf{UAbs600}]_{\text{antes del NaCl}} - [\mathbf{UAbs534} - \mathbf{UAbs600}]_{\text{después del NaCl}}$$

Funcionalización de las AuNPs con los anticuerpos por adsorción

Para la formación del biosensor (por adsorción), las AuNPs de 60 nm fueron conjugadas con el anticuerpo 4G2 (cat. NBP2-52709 - 0.2 mg), un anticuerpo comercial que reconoce específicamente el dominio II de la proteína E del grupo de los flavivirus (incluyendo virus del Dengue, virus del Nilo Occidental, encefalitis japonesa, virus de la fiebre amarilla, virus Zika, etc.). Para la funcionalización, el pH de las AuNP se ajustó a 6 mediante la adición de una solución de borato 0.1 M (pH 6), luego, se agregaron diferentes concentraciones finales de anticuerpo 4G2 (0, 3 y 6 µg/mL) a la solución coloidal de AuNP (1 mL) con una OD 1 (concentración de 0.05 mg/mL de AuNPs, según el fabricante). La mezcla se incubó a 4°C durante 40 minutos en agitación rotatoria. Después de la incubación, se añadió una solución de funcionalización (sacarosa 2.1 M, BSA al 0.1 %, azida de sodio al 1 %) y se incubó a 4 °C durante 10 minutos en el rotador. Luego, se agregaron 20 µL de BSA al 10 % y la mezcla se incubó durante 10 minutos a 4 °C con agitación. La mezcla de AuNP funcionalizadas con anticuerpo se centrifugó a 2500 g durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 250 µL de solución de almacenamiento (sacarosa 0.1 M, BSA 0.1 % y azida de sodio 0.01 %),

concentrando la cantidad de AuNP 4 veces. La solución de AuNP se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Funcionalización de las AuNPs con los anticuerpos por enlaces covalentes

Para la formación de los biosensores (por enlaces covalentes) de SARS-CoV-2, las AuNPs de 40 nm fueron funcionalizadas con el anticuerpo RBD (cat. MAB10540) (biosensor RBD) y con el anticuerpo Spike (cat. 40591-MM42) (biosensor Spike). Cada anticuerpo se diluyó con la solución de dilución del kit a una concentración de 0.1 mg/mL. Posteriormente, 45 µl de la solución de anticuerpos se usaron para resuspender un vial de AuNPs, reconstituyéndolo suavemente con la pipeta y se incubó a 23°C por 15 minutos. A la mezcla se le agregaron 5 µl del buffer quencher y se dejó incubando 5 minutos a 23°C. La mezcla se centrifugó a 9000 g por 10 minutos a 4°C, se lavó con una dilución 1:10 del buffer quencher y los agregados se resuspendieron con 50 µl de solución de almacenamiento (buffer quencher 1% BSA).

Caracterización de los biosensores

Pruebas de caracterización fisicoquímica de los conjugados

Espectrofotometría

Los espectros ultravioleta-visible de las AuNPs y los biosensores se midieron con un espectrofotómetro Microplate reader Cytation 3 (Biotek Instruments). En una placa de 96 pocillos, se colocaron 100 µL de las AuNP o conjugados (y leyeron en el equipo 24 horas después de la conjugación). Las muestras se leyeron por triplicado en un rango de longitud de onda de 450 a 700 nm cada 2 nm y se calcularon los promedios.

Determinación de los parámetros fisicoquímicos por dispersión dinámica de la luz

(DLS)

El tamaño, el potencial z y el índice de polidispersidad de las AuNPs y los biosensores se determinaron utilizando un DLS Zetasizer Nanoseries (instrumentos Marvern) con un láser de 4 mW (633 nm) a 25 °C. Para preparar las muestras se colocaron 100 µL de las AuNPs y los biosensores (24 horas después de haber sido preparados en solución de almacenamiento) en una celda (de cuarzo para medir el tamaño, o en una celda capilar para medir el potencial Z), se agregaron 900 µL de agua desionizada y se leyeron las muestras en el equipo. Cada medición constaba de 20 corridas y las muestras se analizaron por triplicado.

Ensayos de movilidad electroforética

Para la prueba de movilidad electroforética se centrifugaron 100 µL de las nanopartículas o de los biosensores a 2500 g durante 15 minutos a 4 °C. El sedimento se recuperó y se resuspendió en 20 µL de buffer de borato 0.1 M pH 8 y se mezcló con el buffer de carga (Tris HCl pH 8, 40 % de glicerol y azul de bromofenol) y se cargó en un gel de agarosa al 1 % (0,5X TBE). El gel se corrió en buffer TBE al 0.5% durante 1 hora a 150 V y 200 mA.

Elaboración de la LFA para la detección de Dengue (formato competitivo)

La LFA desarrollada para la detección de DENV fue diseñada en un formato competitivo en donde la presencia del analito (el antígeno del virus) de la muestra compite para unirse al biosensor con el analito presente en la zona de prueba de la ventana de detección. La señal en la zona prueba (T) indica la ausencia del analito objetivo en la

muestra, mientras que la señal en la zona de control indica que el biosensor fluyó correctamente a través del LFA. El diseño permite observar dos señales cuando la prueba es "negativa" para la presencia de antígeno viral, mientras que se observa una señal (solo en la zona de control) cuando la prueba es "positiva", indicando la presencia del antígeno viral en la muestra (figura 11).

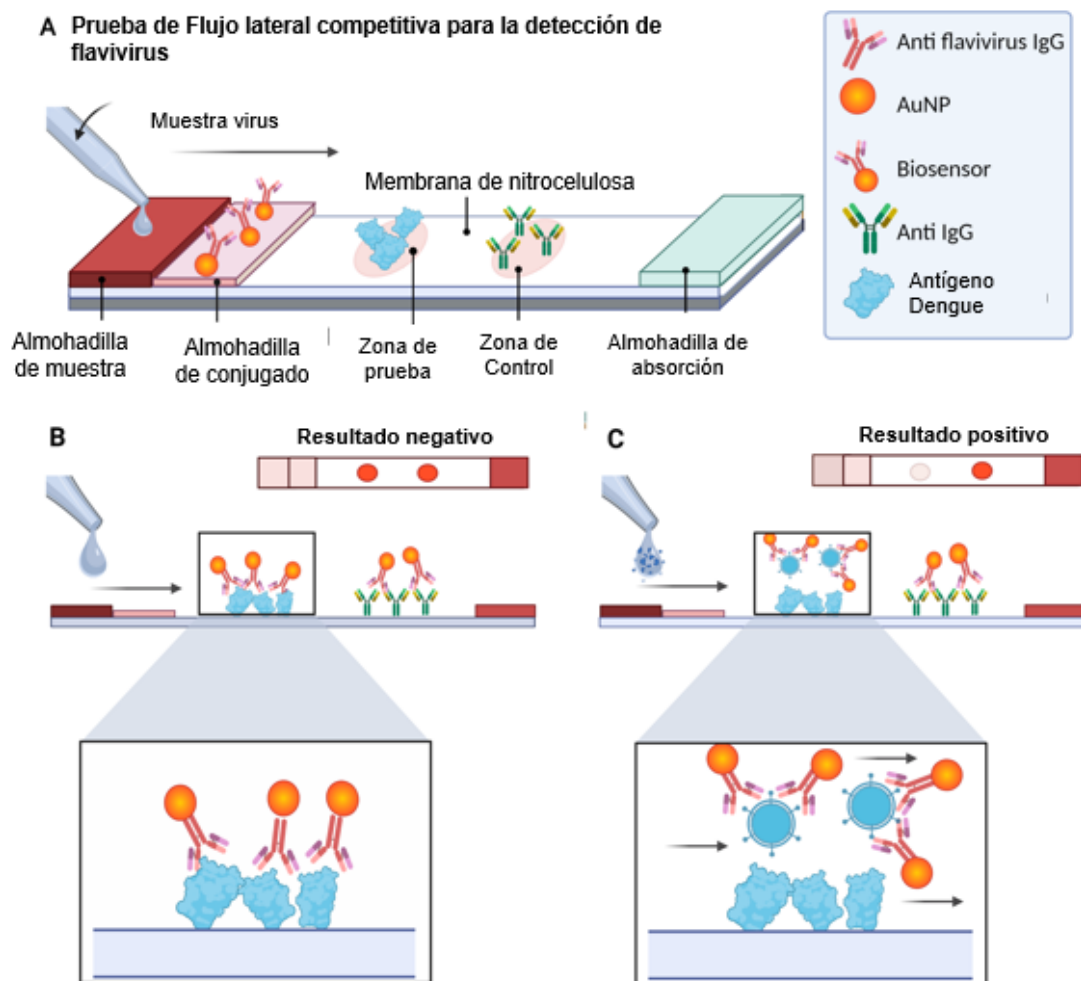


Figura 11. Esquema de la LFA competitiva para la detección de Dengue. A) En la tira, la muestra fluye por capilaridad a los diferentes componentes, reaccionando con el biosensor en la almohadilla de conjugado produciendo una señal en la membrana de detección. (B) Si la muestra no contiene flavivirus, el biosensor fluye hacia la membrana de detección, uniéndose al analito presente en la zona de prueba (DENV) y al

anticuerpo secundario contra IgG presente en la zona de control, generando dos señales (prueba negativa). (C) Si la muestra contiene flavivirus, se forma un complejo biosensor-analito, que fluye hacia la membrana de detección y genera una sola señal en la zona de control (prueba positiva). En ambos casos, la señal de la zona de control debe ser observada para confirmar el correcto funcionamiento del LFA.

La LFA constó de cuatro componentes pretratados montados uno encima de otro en una tarjeta adhesiva: una almohadilla de muestra, una almohadilla de conjugación, una membrana de nitrocelulosa (membrana de detección) y una almohadilla absorbente. Cada componente se preparó por separado y luego se montó en una tarjeta adhesiva antes de su uso.

La almohadilla de muestra fue previamente tratada con una solución de tetraborato de sodio 0.1 M decahidratado, 0.05% tritón y 0.5% BSA pH 8 por 5 minutos en agitación rotatoria a 23°C, se dejó secar por 2 h a 37 °C y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

La almohadilla de conjugación de fibra de vidrio se trató con una solución de fosfato de sodio dibásico 0.05 M tritón 0.05 % BSA 0.5 % y alcohol polivinílico al 0.5 % pH 7.4 durante 5 minutos con agitación y se dejó secar a 37 °C durante 2 h. Posteriormente, los conjugados de AuNP-4G2 (3 µg/mL) se aplicaron a la almohadilla de conjugación hasta la saturación y se dejaron secar durante 30 minutos a 37 °C.

Para la membrana de detección se utilizó una membrana de nitrocelulosa (Nitrocelulosa FF 170). Las soluciones que se colocaron en la membrana se prepararon de la siguiente manera: el antígeno DENV sin diluir y el anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra se diluyeron por separado 1:1 en una solución al 1% de metanol-PBS. La solución de antígeno de DENV se inmovilizó en la membrana en la zona de prueba, mientras que la

solución de anticuerpo secundario se colocó en la zona de control. Ambos se dejaron secar a 23°C durante 10 minutos y posteriormente, la membrana se bloqueó con una solución de TBS con caseína al 0.015% polivinilpirrolidona 0.3%, tween 20 al 0.001% pH 8 durante 10 minutos en agitación a 23°C y se dejó secar a 23°C. Se almaceno a 4°C hasta su uso.

La almohadilla de absorción de celulosa no tuvo tratamiento. Cada uno de los componentes secos se cortó en rectángulos de 10 cm, se ensamblaron sobre la tarjeta adhesiva y se colocaron en la cortadora de membranas Matrix 1201 de Kinematic Automation para formar las tiras. Los LFA se almacenaron a 20–22°C en paquetes sellados que contenían perlas de sílice.

Pruebas de funcionalidad *in vitro* de las LFAs para la detección de DENV

Para determinar la funcionalidad *in vitro* del LFA para la detección de DENV, se utilizó buffer PBS 1X como control negativo y la solución de DENV (disuelto en PBS) a una TCID₅₀/mL= 4.58×10^3 (3.2×10^3 PFU/mL) como muestra positiva. Antes de agregar la muestra, las LFAs se dejaron secar durante 10 minutos a 23°C y luego se colocaron 160 µL (5.12×10^2 PFU) de la muestra positiva para DENV en la almohadilla de muestra y se permitió que migraran a través de la tira por capilaridad. Después de 10 minutos, los resultados se observaron en la ventana de detección. De acuerdo con el diseño del LFA, dos puntos rojos (uno en la zona de prueba y otro en la zona de control) se interpretaron como negativos y los LFA con un solo punto rojizo (en la zona de control) se interpretaron como positivos (ver figura 11).

Pruebas de reconocimiento de los anticuerpos y las proteínas recombinantes por dot blot

Para determinar la afinidad de los anticuerpos a las proteínas recombinantes se realizaron pruebas de reconocimiento por dot blot. Las proteínas recombinantes RBD y BSA (100 ng) se colocaron en las membranas de nitrocelulosa y se dejaron secar. Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (PBS-T 10% Leche descremada) por una hora a 23°C en agitación. Las membranas se lavaron con PBS-T tres veces 10 minutos a 23°C en agitación y se incubaron con anticuerpo Spike o RBD (dilución 1:1000 con PBS-T 1% leche descremada) 1 hora a 23°C en agitación. Las membranas se lavaron con PBS-T tres veces 10 minutos a 23°C en agitación y se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón HRP (dilución 1:10,000 con PBS-T 1% leche descremada) una hora a 23°C en agitación. Se retiró el sobrenadante y las membranas se lavaron con PBS-T tres veces 10 minutos a 23°C en agitación. La detección de la señal presente en la membrana se midió mediante quimioluminiscencia utilizando el kit Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate de Thermo Scientific (cat. 34580) y Chemidoc Imaging Systems (Biorad).

Pruebas de funcionalidad del biosensor por dot blot

Para determinar la afinidad de los biosensores se realizaron pruebas de reconocimiento por dot blot. Las proteínas recombinantes RBD y BSA (100 o 200 ng) se colocaron en las membranas de nitrocelulosa y se dejaron secar. Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (PBS-T 10% Leche descremada) por una hora a 23°C en agitación. Las membranas se lavaron con PBS-T tres veces 10 minutos a 23°C en agitación y se

incubaron con 500 μ l del biosensor (OD 10) 30 minutos a 23°C en agitación. Se retiró el sobrenadante y las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente.

Diseño y caracterización de los aptámeros

Diseño de la biblioteca y primers

La biblioteca de oligonucleótidos de DNA se diseñó con una secuencia aleatoria central de 30 nucleótidos flanqueada por dos secuencias constantes de 20 nucleótidos en los extremos para su amplificación (Sigma Aldrich). La secuencia de la biblioteca fue la siguiente: 5'- TAATACGACTCACTATAGGG-N30-CCCCGGAGTGAGTCGTATTA -3'. Se diseñaron primers para la amplificación de la biblioteca (y los aptámeros candidatos), el primer Forward con la secuencia: 5'-GGGGTAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3' y el primer Reverse con la secuencia: 5- TAA TAC GAC TCA CTC CGGGG -3'.

Optimización de la amplificación de la biblioteca

La biblioteca (400 nM) se amplificó por PCR punto final realizando varias reacciones de 50 μ l usando las siguientes condiciones:

Tabla 2. Condiciones de reacción para la amplificación de la biblioteca de aptámeros

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10x	1x (5 μ l)
MgCl ₂	50 mM	1.5mM (1.5 μ l)
Primers (Biblioteca Forward y reverse)	10 μ M	300 nM (1.5 μ l)
Taq polimerasa	5 U	2.5 U (0.5 μ l)
dNTPs mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	10 mM	0.2 mM (1 μ l)
H ₂ O		35 μ l
Volumen final de		50 μ l

La amplificación se realizó utilizando el siguiente programa, probando diferentes ciclos de amplificación para determinar el programa óptimo.

Tabla 3. Programa utilizado para la amplificación de la biblioteca

Tipo de ciclo	Temperatura	Tiempo	ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
Desnaturalización	95°C	1 min	
Alineamiento	55°C	45 seg	8, 10, 12 y 14
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	1 min	

Optimización de la PCR asimétrica

Con el fin de que las secuencias aleatorias sean monocatenarias, se realizó la PCR asimétrica. Esta PCR consistió en favorecer una sola cadena limitando la cantidad de uno de los primers en la reacción (forward para favorecer el sentido y reverse para favorecer la antisentido). Para favorecer la obtención de ssDNA por PCR asimétrica se probaron diferentes protocolos los cuales se diferenciaron en la cantidad de DNA molde y la concentración de primers usados en la reacción (tabla 4). Las condiciones de la reacción y el programa utilizado para la amplificación se observan en la tabla 5 y 6, respectivamente.

Tabla 4. Protocolos para la amplificación de ssDNA por PCR asimétrica

Volumen del DNA en la PCR asimétrica	10%				20%			
	100:1 Fwd:Rev		50:1 Fwd:Rev		100:1 Fwd:Rev		50:1 Fwd:Rev	
Proporción	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Primer Fwd	300 nM	600 nM	300nM	600nM	300 nM	600 nM	300nM	600nM
Primer Rev	3nM	6nM	6nM	12nM	3nM	6nM	6nM	12nM

Tabla 5. Condiciones de reacción para la PCR asimétrica a partir de la PCR punto final

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10x	1x (5 µl)
MgCl ₂	50 mM	1.5mM (1.5 µl)
Taq polimerasa	5 U	2.5 U (0.5 µl)
dNTPs mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	10 mM	0.2 mM (1 µl)
H ₂ O		35 µl
Volumen final de reacción		50 µl

Tabla 6. Programa utilizado para la PCR asimétrica a partir de la PCR punto final

Tipo de ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	35
Desnaturalización	95°C	1 min	
Alineamiento	55°C	45 seg	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	2 min	

También se realizó un gradiente de temperaturas de alineamiento para determinar la temperatura óptima a los 35 ciclos para obtener ssDNA. En la siguiente tabla se muestran las condiciones de la PCR y en la tabla 8 el programa seguido para las amplificaciones:

Tabla 7. Condiciones de reacción para la PCR para el gradiente de temperatura

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10x	1x (5 µl)
MgCl ₂	50 mM	1.5mM (1.5 µl)
Primer biblioteca Forward	10 µM	600 nM
Primer biblioteca Reverse	100 nM	6 nM
Taq polimerasa	5 U	2.5 U (0.5 µl)
dNTPs mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	10 mM	0.2 mM (1 µl)
H ₂ O		35 µl
Volumen final de		50 µl

Tabla 8. Programa utilizado para la PCR para el gradiente de temperatura

Tipo de ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
Desnaturalización	95°C	1 min	
Alineamiento	50, 51.9, 53.1, 54, 55, 56.7, 57.7 y 60°C	45 seg	35
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	2 min	

Obtención de ssDNA por PCR asimétrica

Para la obtención de ssDNA a partir de PCR asimétrica se hicieron reacciones de 50 µl con las siguientes condiciones de reacción, en la tabla 10 se muestra el programa seguido para la amplificación:

Tabla 9. Condiciones utilizado para la PCR asimétrica

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10x	1x (5 µl)
MgCl ₂	50 mM	1.5mM (1.5 µl)
Primer biblioteca Forward	10 µM	600 nM (3 µL)
Primer biblioteca Reverse	100 nM	6 nM (3 µL)
Taq polimerasa	5 U	2.5 U (0.5 µl)
dNTPs mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	10 mM	0.2 mM (1 µl)
DNA (PCR simétrica)		10 µL
H ₂ O		26 µl
Volumen final de reacción		50 µl

Tabla 10. Programa utilizado para la PCR asimétrica

Tipo de ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
Desnaturalización	95°C	1 min	
Alineamiento	55°C	45 seg	35
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	2 min	

Las reacciones se guardaron a -20°C hasta su disposición.

Purificación del ssDNA a partir de una PCR asimétrica

Se preparó un gel de acrilamida-bisacrilamida 19:1 al 10%, se cargaron las muestras más buffer de carga con gel red (6X) y se corrieron a 100 V por 1 hora. Las bandas que se observaban más abajo en el gel se cortaron en el transiluminador, se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se trituraron con ayuda de una puntilla de 20-200 µL (2 bandas por cada tubo). A cada tubo se le adicionó 400 µL de buffer de elución y se incubó a 37°C

durante 3 horas a 850 rpm. Los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm por 2 minutos para separar el gel, se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo de 1.5 mL. Al sobrenadante se le adicionaron 3 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 13,000 por 30 minutos y se decantó el sobrenadante. La pastilla se lavó con etanol 70% frío (preparado con agua DEPC) y se centrifugó a 13,000 por 20 minutos.

Cuantificación de DNA (ssDNA y dsDNA)

La cuantificación del DNA se realizó mediante la técnica de espectrofotometría en el equipo nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Para cada medición, el equipo se calibró y se puso en la función de DNA o ssDNA dependiendo de lo que se midió. Cada muestra se leyó por triplicado.

Selección de los aptámeros (SELEX)

Para la selección *in vitro* de los aptámeros se prepararon previamente membranas de PVDF con la proteína. Las membranas se cortaron en cuadrados de 0.5 x 0.5 cm, se pusieron en contacto con metanol 1 minuto y luego con agua DEPC 1 minuto. Mientras la membrana seguía húmeda se colocó la proteína en el centro y se dejó secando a temperatura ambiente.

La biblioteca de oligonucleótidos (ssDNA), se ajustó a una concentración final de DNA (a 380 o 700 ng según el blanco) con PBS 2x y agua llegando a un volumen final de 100 µl, se calentó a 90°C por 10 minutos y se dejó enfriando a temperatura ambiente para favorecer la formación de estructuras para el reconocimiento del blanco. Posteriormente, la biblioteca se incubó con la proteína inmovilizada en la membrana de

PVDF cinco minutos en agitación rotatoria a 23°C. La membrana se lavó tres veces con PBS 1X y se colocó en un tubo eppendorf con 100 µL de agua DEPC, la solución se calentó a 94°C por 8 minutos y pasado el tiempo, se recuperó el sobrenadante del tubo y se colocó en un tubo limpio.

Amplificación de secuencias por PCR punto final

Después de cada selección las secuencias obtenidas en cada sobrenadante se amplificaron por PCR punto final. Para la amplificación se realizaron varias reacciones de PCR de 50 µl utilizando las siguientes condiciones en la reacción:

Tabla 11. Condiciones utilizadas para la amplificación de las secuencias obtenidas en cada ciclo por PCR punto final

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10x	1x (5 µl)
MgCl ₂	50 mM	1.5mM (1.5 µl)
Primers de la biblioteca Forward/reverso	10 µM	600 nM (3 µL c/u)
Taq polimerasa	5 U	2.5 U (0.5 µl)
dNTPs mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	10 mM	0.2 mM (1 µl)
DNA		10 µL
H ₂ O		26 µl
Volumen final de reacción		50 µl

El programa utilizado para las reacciones de PCR fue el siguiente:

Tabla 12. Programa utilizado para la amplificación de las secuencias obtenidas en cada ciclo por PCR

punto final

Tipo de ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	35
Desnaturalización	95°C	1 min	
Alineamiento	55°C	45 seg	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	2 min	

Clonación de las secuencias de aptámeros candidatos

Al final de la selección las secuencias candidatas se amplificaron por PCR punto final para adicionar adenina a los extremos 3' en los productos de PCR (fragmentos amplificados con Taq polimerasa) e inmediatamente se clonaron en el vector TOPO TA (cat. 450030, Invitrogen). La reacción de clonación se realizó según la siguiente tabla y se puso a incubar 30 minutos a 23°C.

Tabla 13. Condiciones de la reacción de clonación

Reactivo	Volumen
Producto PCR 50 ng	0.5 µL
Solución salina	1 µL
Agua	3.5 µL
Vector TOPO TA	1 µL
Volumen final	6 µL

Preparación de células calcio-competentes de *E. coli*

Para preparar células calcio-competentes se dejó creciendo un subcultivo una noche antes con 50 µL de las bacterias DH5α en 5 mL de caldo LB Miller y se incubo en agitación

a 37°C. Al día siguiente, se inocularon 100 mL de caldo LB utilizando 2 mL del subcultivo bacteriano y se incubaron en agitación a 37°C hasta obtener una OD de 0.5 (600nm). El cultivo se transfirió a tubos de centrifuga de 50 mL y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 5 mL de una solución de CaCl₂ 0.03 M fría. Las células se repartieron en tubos cónicos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron 30 s a 14,000 rpm a 4°C. Se decantó el sobrenadante y cada paquete celular se resuspendió suavemente en frío en 500 µL de una solución de CaCl₂ 0.03 M glicerol 10%. Las alícuotas se guardaron a -80°C.

Transformación de células calcio-competentes

Para la transformación de células competentes, se dejaron descongelando en hielo 10 min las células calcio-competentes preparadas y se dividieron en alícuotas de 50 µL en tubos de 1.5 mL. A cada tubo se la adicionó 2 µL del plásmido (o reacción de clonación) agitando levemente, las células se mezclaron 5 veces con la pipeta y se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó un choque térmico a las células incubándolas a 42°C durante 30 s y luego colocándolas en hielo por 5 minutos. A cada tubo se adicionó 950 µL de medio SOC atemperado y se incubaron en agitación (300 rpm) por 1 h a 37°C. Pasado el tiempo se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 s para descartar el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en el líquido restante agitando con movimientos suaves (aproximadamente 100 µL). Las células se sembraron por estriado en placas Petri con medio LB con ampicilina 100 µg/mL y se incubaron a 37°C durante 16 h.

Recuperación de plásmidos por lisis alcalina

Las clonas obtenidas después de la transformación fueron recuperadas picando con un asa y se inocularon en 5 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL y se incubaron a 37°C por 16 h. Los subcultivos se dividieron en tubos de 1.5mL y se centrifugaron a 2000 g por 10 min 4°C para separar el medio. Se descartó el sobrenadante y los paquetes celulares se resuspendieron con 300 µL de la solución I de lisis alcalina fría (ver apéndice) y se agitó vigorosamente con vortex. Se agregaron 300 µL de la solución II de lisis alcalina, se mezcló suavemente 15 veces por inversión y se incubó por 5 min a 23°C. Se añadieron 300 µL de la solución III de lisis alcalina y se mezcló suavemente 15 veces por inversión y se incubó 5 minutos en hielo. Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregó un volumen de isopropanol (o 2 volúmenes de etanol absoluto frío), se mezcló suavemente por inversión 15 veces y se incubó en hielo por 15 minutos. Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por 30 minutos a 4°C y la pastilla se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70% frío. La pastilla se dejó secar a 23°C y el DNA plasmídico recuperado se resuspendió con 30 µL de agua DEPC (todos los tubos en uno solo).

Preparación de los fragmentos para la secuenciación (Sanger)

Amplificación de los fragmentos

Los fragmentos a secuenciar primero se amplificaron por PCR punto final utilizando los primers M13, estos oligonucleótidos se unen a secuencias en el vector TOPO que flanquean la región de clonación.

Tabla 14. Secuencias de los oligonucleótidos M13.

Primers	Secuencia
M13 Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 Reverso	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Cada reacción se realizó en volumen final de 30 μL con las siguientes condiciones:

Tabla 15. Condiciones para la amplificación de los fragmentos para la secuenciación por PCR punto final.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10x	1x (3 μL)
MgCl ₂	50 mM	1.5mM (0.9 μL)
Primers M13 Forward/reverso	10 μM	600 nM (1.8 μL c/u)
Taq polimerasa	5 U	2.5 U (0.3 μL)
dNTPs mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	10 mM	0.2 mM (0.6 μL)
DNA (Plásmidos)		100 ng (1 μL)
H ₂ O		21 μL
Volumen final de reacción		30 μL

Y las reacciones se amplificaron usando el siguiente programa:

Tabla 16. Programa para la amplificación de los fragmentos para la secuenciación por PCR punto final.

Tipo de ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	
Desnaturalización	94°C	30 seg	
Alineamiento	56°C	30 seg	35
Extensión	72°C	90 seg	
Extensión final	72°C	5 min	

Purificación de los fragmentos

Cada reacción de PCR se mezcló con buffer de carga 6X (jugo naranja con gel red), se cargaron en un gel de agarosa al 2% y se corrieron con TBE 1X por 1 h a 100 V.

Las bandas mayoritarias, de 140 pb en adelante observadas en el analizador (chemidoc) se cortaron en el transiluminador, se colocaron en tubos de 1.5 mL y se pesaron. Para purificar las bandas se utilizó el kit de extracción de Qiagen (cat. 28706) siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. Por cada 100 mg de agarosa se adicionaron 6 volúmenes de buffer QG Qiagen (600 µL) y se incubaron a 50°C por 10 minutos o hasta que se disolvió el gel. Se adicionó 1 volumen de isopropanol por cada 100 mg de agarosa. La mezcla se colocó en una columna (hasta 800 µL), se centrifugó 1 min a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron a la columna 500 µL del buffer QG Qiagen y se centrifugó 1 min a 13,000 rpm. La columna se lavó adicionando 750 µL de buffer PE Qiagen, se centrifugó 1 min a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se volvió a centrifugar. Se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL limpio y para eluir el DNA se adicionaron 50 µL del buffer EB Qiagen y se centrifugó 1 min a 13,000 rpm. Las muestras se guardaron a 4°C hasta su uso.

Preparación de las reacciones de secuenciación

La obtención de secuencias de los aptámeros candidatos se realizó por secuenciación Sanger, un método de secuenciación de DNA que implica electroforesis y se basa en la incorporación aleatoria de didesoxinucleótidos que terminan la cadena marcándola con un fluoróforo. Para preparar las reacciones de secuenciación se usó el Kit de secuenciación BigDye™ Terminator v3.1 (cat. 4337458, ThermoFisher) utilizando las

siguientes condiciones, donde por cada muestra se prepararon dos reacciones una con el primer forward y uno con el reverso:

Tabla 17. Condiciones de la reacción de marcaje de las secuencias para la secuenciación.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Big Dye		4 μ L
Primer M13 forward o reverso	40 pmol	3.2 pmol (1 μ L)
Templado		2 ng (1 μ L)
H ₂ O		3 μ L
Volumen final de reacción		10 μ L

Para la amplificación de fragmentos marcados se utilizó el siguiente programa:

Tabla 18. Condiciones de la reacción de marcaje de las secuencias para la secuenciación.

Tipo de ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96°C	1 min	
Desnaturalización	96°C	10 seg	
Alineamiento	50°C	5 seg	25
Extensión	60°C	4 min	

Purificación de las reacciones de secuenciación

La purificación de las reacciones de secuenciación se realizó por el método etanol/EDTA. Cada reacción de 10 μ L se colocó en un pozo de una placa MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Cat. N801-0560, Applied Biosystems). A cada pozo se le adicionó 2.5 μ L de una solución de EDTA 125 mM pH 8 y se mezcló con la pipeta 20 veces. Posteriormente, se le adicionó 36 μ L de etanol 95%, se selló la placa con una película adhesiva plástica y se mezcló el contenido vigorosamente con vortex durante 60 s. La placa se incubó a 23°C por 15 minutos y de nuevo se mezcló vigorosamente con vortex

durante 60 s. El contenido de la placa se centrifugó 2000 g por 45 min a 23°C. Se le retiro la película plástica a la placa, se invirtió en una toalla absorbente de papel en la parte de la centrifuga y se centrifugó 180 g por 1 min. Se retiro la placa de la centrifuga, se le adicionó a cada pozo 30 µL de etanol al 70% y se mezcló 20 veces con la pipeta. La placa se selló nuevamente y se centrifugó 1600 g por 15 min. Se le retiro la película plástica a la placa, se invirtió en una toalla absorbente de papel en la parte de la centrifuga y se centrifugó 180 g por 1 min. La placa se guardó a -20 °C protegida de la luz.

Secuenciación de aptámeros candidatos

Para obtener las secuencias de los aptámeros candidatos se corrió el programa *Fast* en el secuenciador Thermo Fisher Scientific CE 3500 y se utilizó el polímero Pop-7 (Cat. 4393708) como matriz en un capilar de 50 cm.

Análisis in silico del aptámero 769

Para el análisis *in silico* se utilizó la secuencia del aptámero candidato, Apta 769.

Se predijeron las estructuras bidimensionales del aptámero candidato usando Mfold (University at Albany, n.d.) según lo establecido en el método de Zuker (Zuker, 2003) utilizando como parámetros de ejecución una temperatura de plegamiento de 25°C, una concentración iónica de 157 mM de Na⁺ y 0 mM de Mg²⁺, se generaron varias predicciones de todas las estructuras posibles con valores mínimos de energía libre. Posteriormente, se eligió la estructura termodinámicamente más estable con la energía libre de Gibbs más baja (en formato Viena) y se cargaron en la plataforma RNAComposer (Institute of Computing Science, n.d.) para obtener las estructuras tridimensionales. Sin embargo, debido a que no existe un servidor que modele DNA, el modelamiento

tridimensional en el software (para RNA) realizo cambio las timinas de la secuencia por uracilos, por lo que posteriormente las estructuras terciarias se modificaron mediante la eliminación de O en el átomo de carbono 2' de la ribosa y agregando metilo en el átomo de carbono 5' de todas las bases de uracilo utilizando la herramienta mutagénesis del programa PyMol. Para los análisis de interacción con las proteínas blanco (docking) se utilizó el programa "High Ambiguity Driven Docking" (HADDOCK), el cual basado en la información ingresada realiza tanto el acoplamiento de las estructuras rígidas como el refinamiento semiflexible de las estructuras tridimensionales. Para realizar el "docking" se ingresó la estructura tridimensional del ssDNA del aptámero candidato con la menor energía de Gibbs y el modelamiento tridimensional de la proteína en formato PDB, descargado de la plataforma RCSB PDB (*RCSB PDB Protein Data Bank*, n.d.), y se generó el reporte de las estructuras y de los parámetros de interacción.

Determinación de la especificidad de los aptámeros por dot blot

Para determinar la afinidad de los aptámeros se realizaron pruebas de reconocimiento por dot blot. Las proteínas recombinantes RBD, H1 y BSA (100 o 200 ng) se colocaron en las membranas de nitrocelulosa y se dejaron secar. Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (PBS-T 10% Leche descremada) por una hora a 23°C en agitación. Las membranas se lavaron con PBS-T tres veces 10 minutos a 23°C en agitación y se incubaron con 500 nM de los aptámeros biotinilados por 1 hora a 23°C en agitación. Se retiró el sobrenadante y las membranas se lavaron con PBS-T tres veces 10 minutos a 23°C en agitación. Las membranas se incubaron con una dilución 1:5000 de

estreptavidina-HRP/ PBS-T 1% leche por 1 hora a 23°C en agitación y se lavaron con PBS-T tres veces 10 minutos a 23°C en agitación. La detección de la señal presente en la membrana se midió mediante quimioluminiscencia utilizando el kit Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate de Thermo Scientific (cat. 34580) y el analizador Chemidoc Imaging Systems (Biorad).

Determinación de la afinidad del aptámero por ELONA

Para determinar la afinidad de unión del aptámero 769 a su blanco, se prepararon soluciones de 5 ng/ μ L (500 ng/pocillo) de la proteína H1 con buffer de carbonatos 0.1 M pH 9.6 y se inmovilizaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Corning® 96-well Clear Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate Cat. 33370) incubando durante la noche a 4°C. Al día siguiente, los pocillos se lavaron cinco veces con PBS-T y luego se bloquearon 1 h a 23°C con una solución de PBS 10% de BSA. Posteriormente, se realizaron tres lavados y se incubó 1 h a 23°C con diferentes concentraciones de cada aptámero biotinilado en el extremo 5' (0-500 nM) diluidos en el buffer PBS 1X (previamente se calentaron a 90°C por 10 minutos y se dejó enfriando a 23°C para favorecer la formación de estructuras para el reconocimiento del blanco). A continuación, se lavaron los pocillos tres veces con PBST, se añadieron a cada pozo 100 μ L de una solución de estreptavidina-HRP PBST 1% BSA (dilución 1:5000) y se incubó 1 h a 23°C en agitación. Se lavó tres veces con PBST y se reveló utilizando 50 μ L de una solución de TMB (TMB Substrate Solution Pierce Cat. N301). La reacción de revelado se paró con 50 μ L de una solución de ácido sulfúrico al 5%. Las absorbancias se leyeron a 450 nm en el lector de placas GloMax® Discover Microplate Reader (Promega Cat.

GM3000) y los datos se analizaron utilizando el software Graphpad Prism 9 mediante regresión no lineal (un sitio- unión específica y no específica) con la ecuación $y = (x \times B_{max}) / (x + K_d)$, donde B_{max} es la unión máxima y K_d es la concentración de ligando necesaria para alcanzar la mitad de la unión máxima. Todos los tratamientos se hicieron por triplicado.

Ensayos de competencia en el sitio de unión por ELONA competitivo.

En el ELONA competitivo, el aptámero 769 sin marcar con biotina (previamente plegado) se añadió a diferentes concentraciones (0-500 nM) (100 μ L/pocillo, por triplicado) a placas de 96 pocillos donde se inmovilizaron 500 ng de proteína H1, como se describió anteriormente. Después de tres lavados con 100 μ L de PBS-T, los pocillos se incubaron con aptámero 769 marcado en el extremo 5' con biotina (500 nM) por 1 h a 23°C en agitación. Después de tres lavados con 100 μ L de PBS-T, los pocillos se incubaron con 100 μ L de una solución de estreptavidina-HRP PBST 1% BSA (dilución 1:5000), 1 h a 23°C en agitación. Se lavó tres veces con PBST y se reveló utilizando 50 μ L de una solución de TMB (TMB Substrate Solution Pierce Cat. N301). La reacción de revelado se paró con 50 μ L de una solución de ácido sulfúrico al 5%. Las absorbancias se leyeron a 450 nm en el lector de placas GloMax® Discover Microplate Reader (Promega Cat. GM3000) y los datos se analizaron utilizando el software Graphpad Prism 9.

Determinación del límite de detección de la prueba ELONA

Para determinar el límite de detección (LoD) del ELONA diseñado en esta tesis, se inmovilizó de 0-500 ng/pocillo de la proteína H1 con buffer de carbonatos 0.1 M pH 9.6 en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Corning® 96-well Clear Flat Bottom

Polystyrene Not Treated Microplate Cat. 33370), incubando durante la noche a 4°C. Al día siguiente, los pocillos se lavaron cinco veces con PBS-T y luego se bloquearon 1 h a 23°C con una solución de PBS 1% de BSA. Posteriormente, se realizaron tres lavados y se incubó 1 h a 23°C con 500 nM aptámero 769 biotinilado en el extremo 5' diluido en el buffer PBS 1X (previamente plegado). Se lavaron los pozos tres veces con PBST, se añadieron a cada pozo 100 µl de una solución de estreptavidina-HRP PBST 1% BSA (dilución 1:5000) y se incubó 1 h a 23°C en agitación. Se lavó tres veces con PBST y se reveló utilizando 50 µL de una solución de TMB (TMB Substrate Solution Pierce Cat. N301). La reacción de revelado se paró con 50 µL de una solución de ácido sulfúrico al 5%. Las absorbancias se leyeron a 450 nm en el lector de placas GloMax® Discover Microplate Reader (Promega Cat. GM3000) y los datos se analizaron utilizando el software Graphpad Prism 9. El límite de detección (LoD) del ensayo se calculó (para n = 3) de la siguiente manera según lo establecido por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC): $LoD = 3S_b/m$, donde S_b es la desviación estándar del blanco y m es la pendiente de la ecuación de regresión lineal (Long & Winefordner, 1983).

Ensayos de viabilidad celular

Las células Vero fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 1×10^4 células/pozo; después de 24 h fueron tratadas con PBS 1X, 0-1000 nM de aptámero 769 diluido en PBS 1X y 0.1% de DMSO (Cat. D2650-100ML, Sigma) por 24, 48 y 72 h. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT (Cat. 11465007001, Cell Proliferation kit I, Roche) de acuerdo con las especificaciones del fabricante y se leyó a 600 nm en el lector de placas GloMax® Discover Microplate Reader (Promega Cat.

GM3000). El cálculo de porcentaje de viabilidad se realizó mediante la comparación de las diferentes condiciones con las células tratadas con PBS 1X (no tratadas) las cuales corresponden al 100% de viabilidad celular.

Detección del aptámero en cultivo celular por qPCR

Las células Vero fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 1×10^4 células/pozo; después de 24 h fueron tratadas con, 0-1000 nM de aptámero 769 diluido en PBS 1X por 24, 48 y 72 h. Los sobrenadantes se guardaron a -80°C para evitar la degradación de las secuencias.

Para la cuantificación por qPCR, primero se realizó una curva estándar utilizando Sybr Green Master Mix (A25742 Thermo Fisher) y diluciones 1:10,000 del aptámero 769 (0-1000 nM) diluido en medio DMEM suplementado. Para determinar la cantidad de aptámero recuperado de cada sobrenadante, las muestras se diluyeron 10,000 veces y se utilizó 1 μL para una reacción con un volumen final de 10 μL . Se utilizaron las siguientes condiciones para la reacción:

Tabla 19. Condiciones para la reacción de cuantificación de secuencias obtenidas en cada ronda de selección positiva por qPCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Sybr green	2x	1x (5 μL)
Iniciador forward	10 μM	400 nM (0.4 μL)
Iniciador reverso	10 μM	400 nM (0.4 μL)
Templado		1 μL
H ₂ O		3.2 μL
Volumen final de reacción		10 μL

Para la amplificación de las muestras se utilizó el siguiente programa:

Tabla 20. Condiciones para la reacción de cuantificación de secuencias obtenidas en cada ronda de selección positiva por PCR en tiempo real.

Tipo de ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la polimerasa	95°C	10 min	40
Desnaturalización	95°C	15 seg	
Alineamiento/Extensión	60°C	60 seg	

Los datos fueron graficados usando el software Graphpad Prism 9 con Log de las diluciones en el eje de las X vs. los valores de Ct obtenidos en el eje de las Y. Para determinar la estabilidad del aptámero, se calculó el porcentaje de aptámero recuperado en el sobrenadante mediante la comparación de los tratamientos con las diferentes concentraciones del aptámero con las diluciones del aptámero (0-1000 nM) en DMEM sin las células las cuales corresponden al 100% de aptámero intacto.

Microscopia de fluorescencia

Las células Vero se sembraron a una densidad celular de 1×10^5 con 1350 μ L de medio DMEM suplementado (5% SFB 1% antibiótico 1% glutamina y 1% aminoácidos no esenciales) en cubreobjetos de vidrio cuadrados colocados en cada pozo de una placa de 6 pozos (cat. 3516 Coning Incorporated Costar), y se incubaron durante 16 horas. Las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con 150 μ L del tratamiento durante 24 y 72 h. Los tratamientos fueron los siguientes: Apta 769-FAM, 100 μ l del aptámero 769 marcado con FAM en el extremo 5' diluido en PBS 1X adicionado con 50 μ L de agua libre de nucleasas estéril (la concentración final del pozo fue de 1000 nM); Apta 769-FAM y Proteína H1, 100 μ l del aptámero 769 marcado con FAM en el extremo 5' diluido en PBS

1X adicionado con 50 μ L de proteína H1 (la concentración final del pozo fue de 1000 nM del aptámero y 500 ng de proteína H1).

A continuación, las células se lavaron con PBS 1X, se le añadió 1 mL de acetona-metanol ratio 1:1 en cada pozo, se cubrió con aluminio la placa y se dejó incubando a 4°C por 20 min. Se retiró el sobrenadante, las células se lavaron tres veces con PBS 1X y a cada cubreobjetos se le añadieron 5 μ L de medio de montaje con DAPI para visualizar el núcleo (Cat. 00-4959-52, Invitrogen) y se colocó sobre el portaobjetos. Las laminillas se examinaron en el microscopio de fluorescencia ZEISS Axio Imager 2 acoplado a la cámara AxioCam MRc.

Caracterización de la biblioteca aleatorizada por qPCR

Se realizó la caracterización de la biblioteca diseñada cuantificando el ssDNA recuperado (enriquecimiento de secuencias) en cada ronda de selección positiva por qPCR. Para la cuantificación primero se realizó una curva estándar utilizando Sybr Green Master Mix (A25742 Thermo Fisher) y diluciones seriales base 10 de la biblioteca en ssDNA de 2 a 0.0002 pg. Para determinar la cantidad de ssDNA recuperado de las rondas de selección, las muestras recuperadas se diluyeron 10,000 veces y se utilizó 1 μ L para una reacción de 10 μ L. Se utilizaron las siguientes condiciones para la reacción:

Tabla 21. Condiciones para la reacción de cuantificación de secuencias obtenidas en cada ronda de selección positiva por qPCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Sybr green	2x	1x (5 µL)
Iniciador forward	10 µM	400 nM (0.4 µL)
Iniciador reverso	10 µM	400 nM (0.4 µL)
Templado		1 µL
H ₂ O		3.2 µL
Volumen final de reacción		10 µL

Para la amplificación de las muestras se utilizó el siguiente programa:

Tabla 22. Condiciones para la reacción de cuantificación de secuencias obtenidas en cada ronda de selección positiva por qPCR.

Tipo de ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la polimerasa	95°C	10 min	
Desnaturalización	95°C	15 seg	40
Alineamiento/Extensión	60°C	60 seg	

Los datos fueron graficados Log de las diluciones (eje de las X) vs. los valores de Ct obtenidos (eje de las Y) usando el software Graphpad Prism 9.

Análisis de estadístico

Los análisis estadísticos que se utilizaron para comparar las características de los biosensores fueron el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias entre los grupos fueron significativas con un valor de $p < 0.05$. Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

CAPITULO 4

Resultados

Optimización de la funcionalización de las AuNPs (con anticuerpos) por adsorción para la formación de los biosensores contra DENV

Para preparar los biosensores para la detección de DENV, las AuNP recubiertas de citrato de 60 nm se conjugaron por adsorción con el anticuerpo 4G2 (antiflavivirus). Primero, se determinaron las condiciones óptimas para el proceso de conjugación. Para esto, el pH de la solución de nanopartículas se ajustó de 5 a 10. Posteriormente, las AuNP se conjugaron con una concentración final de anticuerpo de 10 µg/mL (concentración máxima de anticuerpo). El pH óptimo para la conjugación se determinó midiendo la capacidad de agregación de las AuNP conjugadas. Cada biosensor (AuNP-anticuerpo) fue incubado con una solución de NaCl al 20%, donde el ambiente salino genera cargas negativas en el medio y aumenta las interacciones entre AuNPs con cargas negativas disponibles en su superficie (AuNPs no completamente cubiertas por el anticuerpo), resultando en la agregación de las AuNPs y la formación de aglomerados que se pueden medir por espectrofotometría. Si las condiciones de conjugación no permitieron que los anticuerpos se unieran a la superficie de las AuNP y la cubrieran por completo, se formarán agregados en presencia de cloruro de sodio. La formación de estos agregados se midió en cada condición usada durante el proceso de conjugación mediante la prueba de agregación de oro (GAT). En esta prueba, midieron los valores de absorbancia a 534 y 600 nm antes y después de la adición de NaCl, de la solución de AuNPs (a diferentes

valores de pH) después de la conjugación con el anticuerpo. Los valores se utilizaron para calcular el número de GAT (Chamorro-García et al., 2016), cuanto menor sea el valor del número GAT, mejor será el recubrimiento de las superficies de las nanopartículas con los anticuerpos, lo que indica cuál es la mejor condición para la conjugación. Para las AuNP de 60 nm (recubiertas con citrato) utilizadas, se determinó que el pH 6 era el mejor para la conjugación con el anticuerpo 4G2, mostrando un valor mínimo de agregación de 0.0715 en comparación con los otros valores obtenidos a pH 5-10, que estaban entre 0.077 y 0.213 respectivamente (figura 12).

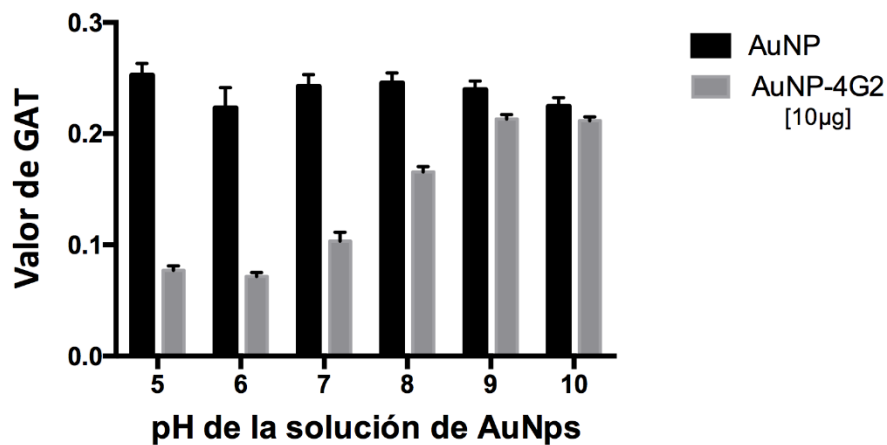


Figura 12. Optimización de las condiciones de pH para la conjugación de anticuerpos en la superficie de AuNPs. Para las AuNP recubiertas con citrato de 60 nm utilizadas, el pH óptimo de la conjugación se determinó mediante la prueba de agregación de oro (GAT) para establecer en qué condición de pH se obtuvo el valor mínimo (menor agregación, mayor estabilidad), utilizando una concentración máxima de Anticuerpo 4G2 (10 µg/mL). Los resultados indicaron un valor mínimo de agregación de 0.0715 a pH 6 en comparación con los otros valores reportados usando condiciones de pH de 5 a 10 para AuNP-4G2, mientras que las AuNP desnudas presentaron agregación en presencia de sales a cualquier pH probado.

Obtención y caracterización de los biosensores para la detección de DENV (AuNP-4G2)

Una vez que se determinaron las mejores condiciones para la conjugación, se optimizó la concentración de anticuerpo utilizada para la conjugación usando 1, 3 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para recubrir 1 mL de nanopartículas de oro recubiertas con citrato (OD 1). Como control de conjugación, se usó BSA para recubrir las AuNP (AuNP-BSA). Los tres biosensores obtenidos (AuNP-4G2), el control (AuNP-BSA) y las AuNP no conjugadas (AuNP CIT) se caracterizaron para identificar la concentración mínima de anticuerpo para recubrir la superficie de la nanopartícula que genera estabilidad de las AuNP en estado coloidal. Se utilizaron diversas técnicas para caracterizar los conjugados y evaluar sus propiedades. Primero, se determinó el espectro de absorbanza del plasmón superficial de las AuNP y los biosensores mediante un escaneo espectral realizado en el rango UV-visible de 450 a 700 nm mediante espectrofotometría. El espectro UV-Vis de los AuNP CIT (AuNPs sin recubrir) mostró un pico de absorbanza máximo a 534 nm, mientras que los biosensores AuNP-4G2 (los tres) y el biosensor control AuNP-BSA presentaron un pico de absorbanza máximo a 536 nm. Este cambio en el valor del pico máximo indicó la configuración de la superficie de la AuNP, pasando de un estado “desnudo” a un estado recubierto (figura 13).

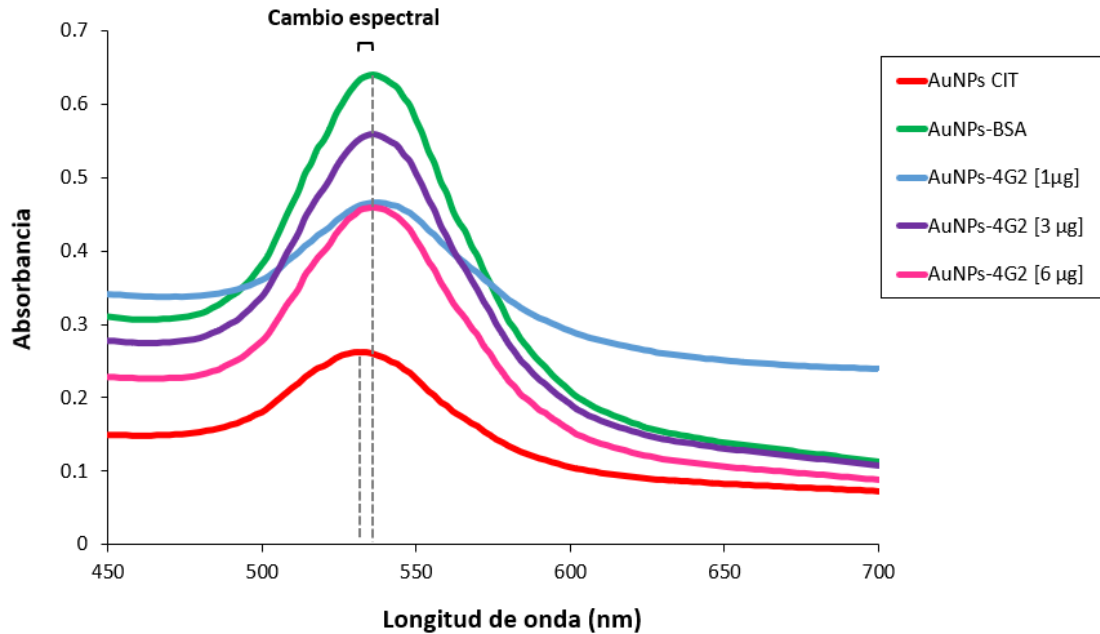


Figura 13. Caracterización de los biosensores AuNPs y AuNP-4G2. Espectros UV-Vis de las AuNPs con citrato sin tratamientos (AuNP CIT), biosensor AuNP-BSA (control), AuNPs conjugados con diferentes concentraciones de anticuerpo anti-flavivirus, 1, 3 y 6 µg/mL (biosensores AuNPs-4G2). Se observó un cambio en el pico máximo de absorbancia del espectro en los biosensores AuNP-4G2 a diferentes concentraciones de anticuerpos y en el biosensor control AuNP-BSA en comparación con las AuNPs sin recubrimiento (los picos máximos de absorbancia se indican con las líneas de punteadas).

Para corroborar el estado de agregación de los biosensores AuNP-4G2 se realizó el ensayo GAT. Los resultados mostraron que las AuNPs sin recubrir (AuNP CIT) en presencia de PBS reportaron un alto número de agregación (< 0.159) mientras que los biosensores AuNP-4G2 presentaron valores inferiores a 0.02, indicando su estabilidad incluso en presencia de una alta concentración de sales (ver figura 14). Entre los biosensores AuNP-4G2, se observó que AuNP-4G2 conjugado con 3 µg/mL de anticuerpo presentó el menor valor de agregación en comparación con el biosensor AuNP-BSA y AuNP-4G2 1 µg/mL. Adicionalmente, no se observó diferencia entre el valor de agregación de los biosensores AuNP-4G2 con 3 y 6 µg/mL de anticuerpo, por lo que se

decidió trabajar con la concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para conjugar las AuNPs y obtener el biosensor que se utilizó en el LFA para la detección de DENV.

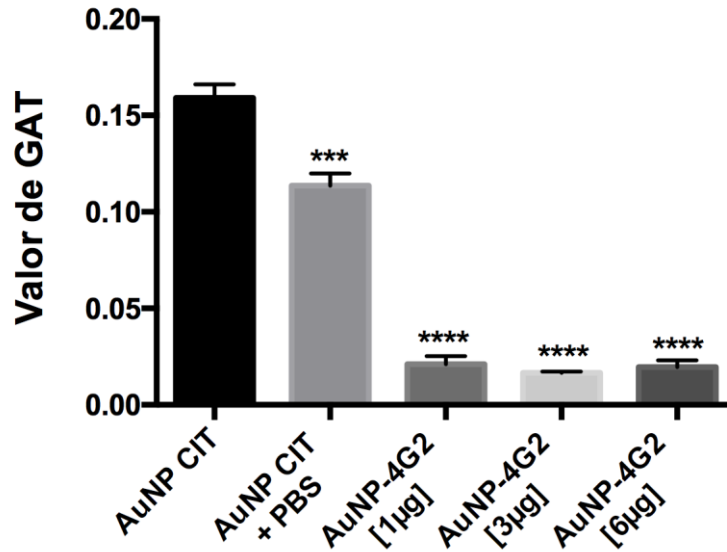


Figura 14. Determinación del valor de agregación de las AuNPs y conjugados. El valor de agregación se calculó mediante la prueba de agregación de oro (GAT). Todos los conjugados presentaron valores inferiores a los reportados en las AuNP desnudas, indicando la presencia de la cobertura superficial de las AuNP por parte de los anticuerpos, protegiendo a las AuNP de la formación de conglomerados y preservando la estabilidad en estado coloidal. (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$, $n = 3$).

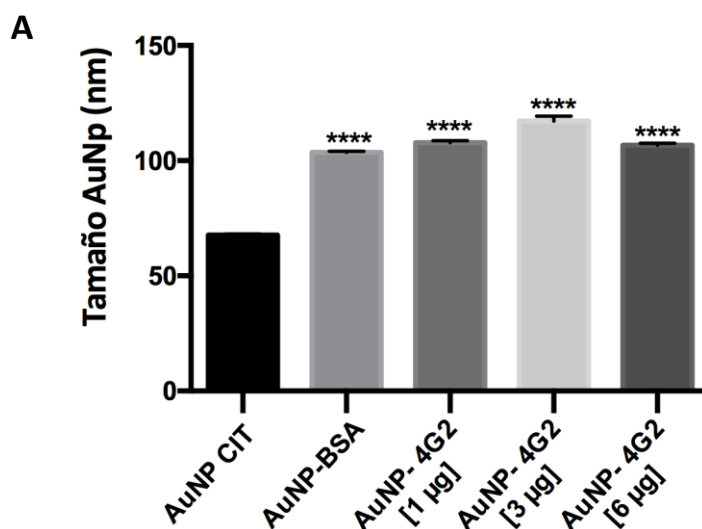
Para la caracterización fisicoquímica de los biosensores y las AuNPs CIT se utilizó la dispersión de luz dinámica (DLS) con el fin de determinar el diámetro hidrodinámico (tamaño), el potencial Z y el índice de polidispersidad.

Los resultados obtenidos mostraron que el AuNP CIT presentó un diámetro hidrodinámico promedio de 67.69 nm, mientras que el control AuNP-BSA y los biosensores AuNP-4G2 a concentraciones de 1, 3 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentaron un incremento en el diámetro hidrodinámico promedio de 103.5, 107.87, 117.20 y 103.63 nm respectivamente. El aumento de tamaño de los biosensores indicó la correcta formación

del complejo AuNP-Anticuerpo. Sin embargo, el aumento máximo en el tamaño de las AuNPs se observó en el biosensor AuNP-4G2 con 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo lo que indica que esta concentración es la óptima para la saturación de la superficie de la nanopartícula (ver figura 15A).

Por otro lado, el índice de polidispersidad medido fue menor a 0.2, lo que indicó que los biosensores AuNP-4G2 y el control estaban monodispersos (estado coloidal) y no presentaban agregación, lo cual es óptimo para su uso en la detección del analito (figura 15B).

Al analizar los valores de potencial Z obtenidos, pudimos observar que las AuNP CIT (AuNPs sin recubrir) presentaron un valor de -34.9 mV, valor inferior a los biosensores AuNP-4G2, indicando la unión del anticuerpo en la superficie de la nanopartícula, preservando estabilidad de esta (figura 15C).



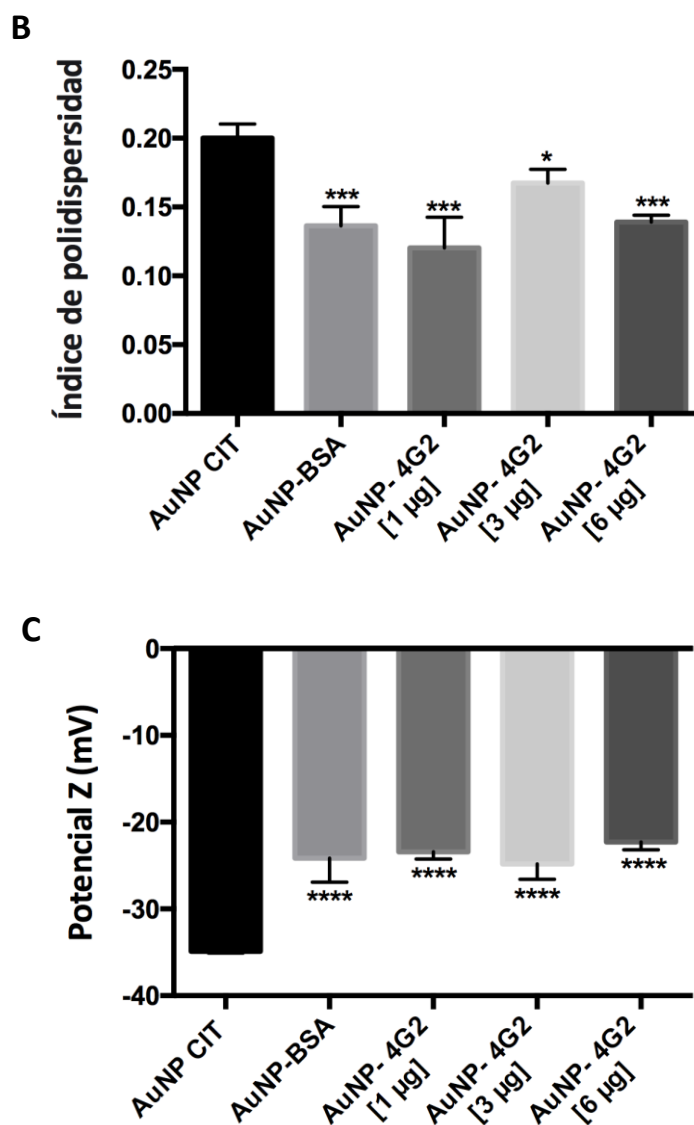


Figure 15. Análisis fisicoquímico de las AuNPs y los biosensores por DLS. (A) Diámetro hidrodinámico (Tamaño), (B) Índice de polidispersidad y (C) Valores de potencial Z de las AuNPs sin recubrir (AuNP CIT), las AuNPs control (AuNP-BSA) y los biosensores (AuNP-4G2) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, $n = 3$).

Como pruebas complementarias para la caracterización de las AuNPs y los biosensores AuNP-4G2, se realizaron las pruebas de movilidad electroforética y las pruebas de agregación de oro. De acuerdo con los resultados observados en la figura 16, las AuNPs presentaron un retraso en la movilidad cuando fueron recubiertas con 3 y 6 µg/mL de

anticuerpo en comparación con el control AuNP-BSA (sin anticuerpo). Este cambio en la movilidad sugiere un mayor tamaño de los biosensores AuNP-4G2 debido a que presentaron una migración más lenta.

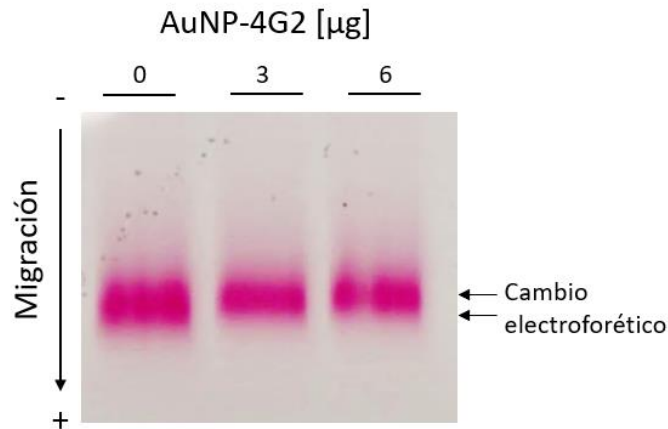


Figura 16. Ensayo de cambio de movilidad electroforética para los biosensores AuNP-BSA y AuNP-4G2.

Se utilizó electroforesis en gel de agarosa para identificar las diferencias de migración de cada biosensor de AuNPs con concentraciones crecientes de anticuerpos anti-flavivirus (0, 3 y 6 µg/mL).

Diseño y elaboración de la LFA para la detección de DENV

La LFA diseñada en este trabajo, se basó en la competencia del antígeno presente en la muestra analizada con el antígeno anclado a la membrana de nitrocelulosa mediante la unión al biosensor para la detección de DENV. En presencia de DENV, el biosensor forma un complejo con el antígeno presente en la muestra y no puede unirse al antígeno previamente inmovilizado en la tira, pero puede unirse al anticuerpo secundario (hacia la zona de control), observando un solo punto rojo en la ventana de detección. En ausencia de DENV en la muestra, el biosensor se une a la zona de prueba y la zona de control, dando como resultado una prueba negativa que muestra dos puntos rojos.

Para optimizar el LFA, se probaron diferentes medidas de los materiales para el ensamblado, además se modificó la distancia de superposición entre materiales para obtener mejor flujo en la tira y por ende mejorar la formación de complejos para la detección. Finalmente, se determinaron las medidas exactas del LFA como se muestra en la figura 17, adicionalmente se estableció que el volumen mínimo de muestra para obtener un resultado fue de 160 μ L.

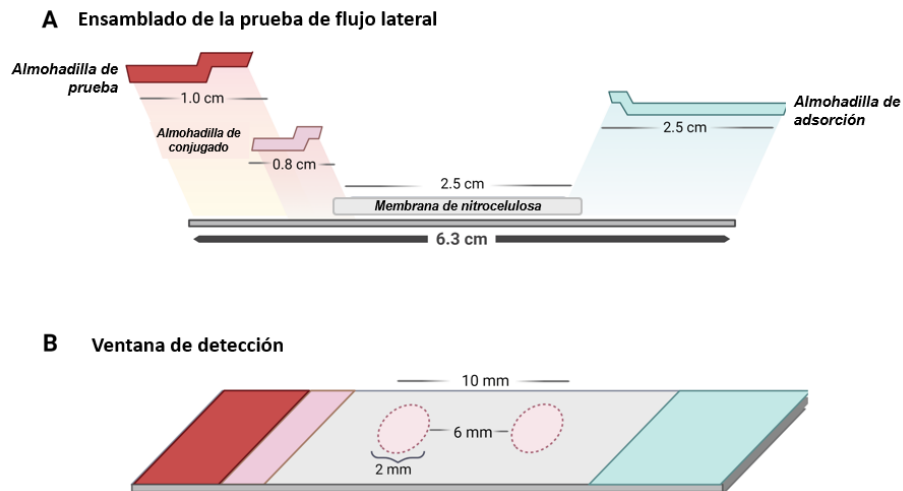


Figura 17. Diseño del ensayo de flujo lateral para la detección de flavivirus. (A) De izquierda a derecha, la tira se compone de una almohadilla de muestra, una almohadilla de conjugado, una membrana de detección (con una zona de prueba y una zona de control) y una almohadilla absorbente. Cada uno de los componentes superpuestos (como se muestra en la figura) tiene medidas específicas que permiten el flujo en la tira para la formación de complejos biosensor-virus para la detección. (B) La membrana de detección está formada por la zona de prueba y la zona de control, donde cada una tiene un tamaño definido que permite observar los resultados a simple vista, y la separación entre ellas, con una medida constante, permite que los resultados de ambas zonas no se superpongan.

Pruebas de funcionalidad de la prueba de flujo lateral para la detección de DENV

Para probar la funcionalidad de las LFAs, se usaron 160 μL de cada muestra (DENV aislado como muestra positiva y buffer PBS 1x como muestra negativa). Las muestras (positivas o negativas) se colocaron en la almohadilla de muestra de la LFA y se dejaron correr a 23°C y, después de 10 minutos, se observaron los resultados y se tomaron pruebas fotográficas. Los resultados se pueden observar en la figura 18, en donde en las LFAs que se colocaron muestras positivas, se observó una sola señal en la zona control, indicando la unión del DENV con el biosensor AuNP-4G2, formando un complejo, e impidiendo que el biosensor AuNP-4G2 se una al virus inmovilizado en la zona de prueba. Además, se observó una señal en la zona de control, donde el biosensor (formando o no un complejo con el antígeno) se unió al anticuerpo anti-IgG inmovilizado en la ventana de detección. Las LFAs donde se colocaron las muestras negativas (que contenían solo buffer PBS), mostraron dos señales en la ventana de detección (en la zona de prueba y la zona control), una que indica la unión del biosensor AuNP-4G2 al virus inmovilizado en la zona de prueba y la otra que indica el reconocimiento del biosensor al anticuerpo anti-IgG inmovilizado en la zona de control.

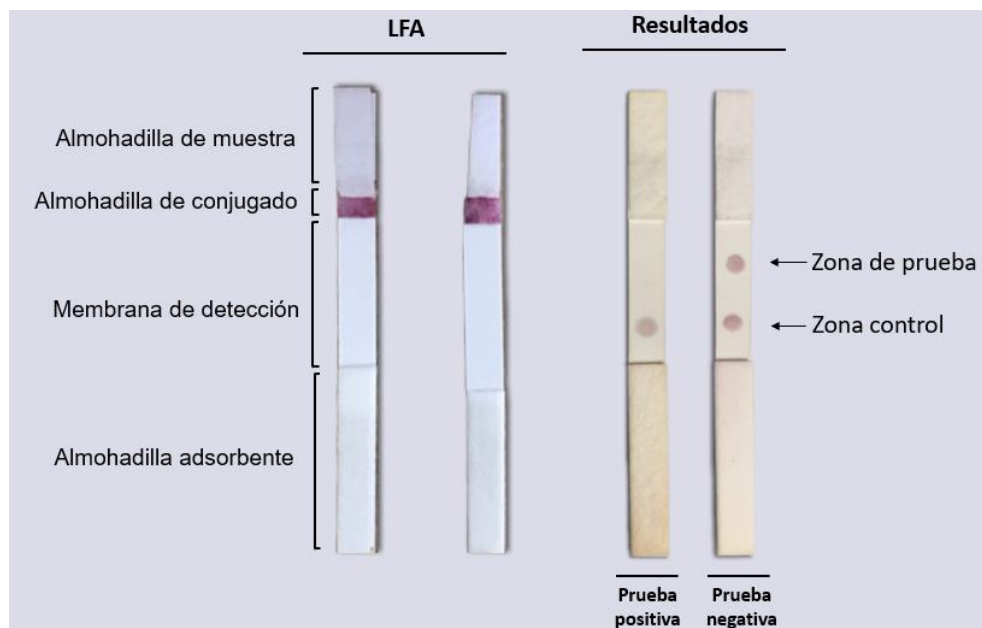


Figura 18. Prueba de funcionalidad de la prueba de flujo lateral para la detección de flavivirus. Se usó buffer PBS con DENV (positivo) y buffer PBS (negativo) para la prueba de funcionalidad de las LFAs. El biosensor colocado en la almohadilla de conjugado, al entrar en contacto con la muestra, reconoció al virus, formó un complejo y al no unirse al analito (DENV) unido a la membrana en la zona de prueba, solo se produjo una señal roja visible en la zona control, indicando la unión del anticuerpo 4G2 en el biosensor con el anticuerpo secundario IgG inmovilizado en la membrana.

Se probó la funcionalidad de quince LFAs del mismo lote para observar la reproducibilidad de la detección de DENV en las mismas condiciones. En la figura 19A se observan las imágenes representativas de los resultados de las pruebas del mismo lote donde se analizaron las muestras negativas (que no tenían DENV) solo buffer PBS. Se observó que el buffer PBS era óptimo para usar como buffer de corrida para esta LFA, porque ninguno de sus componentes generó falsos negativos ni provocó la agregación de las AuNPs (que conforman el biosensor). En la figura 19B se observan imágenes representativas de los resultados de las pruebas del lote de LFAs donde se analizaron muestras positivas (buffer PBS con DENV), donde se observó una sola señal en la zona de control que corresponde a un resultado positivo. La consistencia de los resultados

mostró que las LFAs del mismo lote tenían las mismas características y podían detectar el virus *in vitro* con la misma cantidad de virus y en con el mismo tiempo de respuesta.

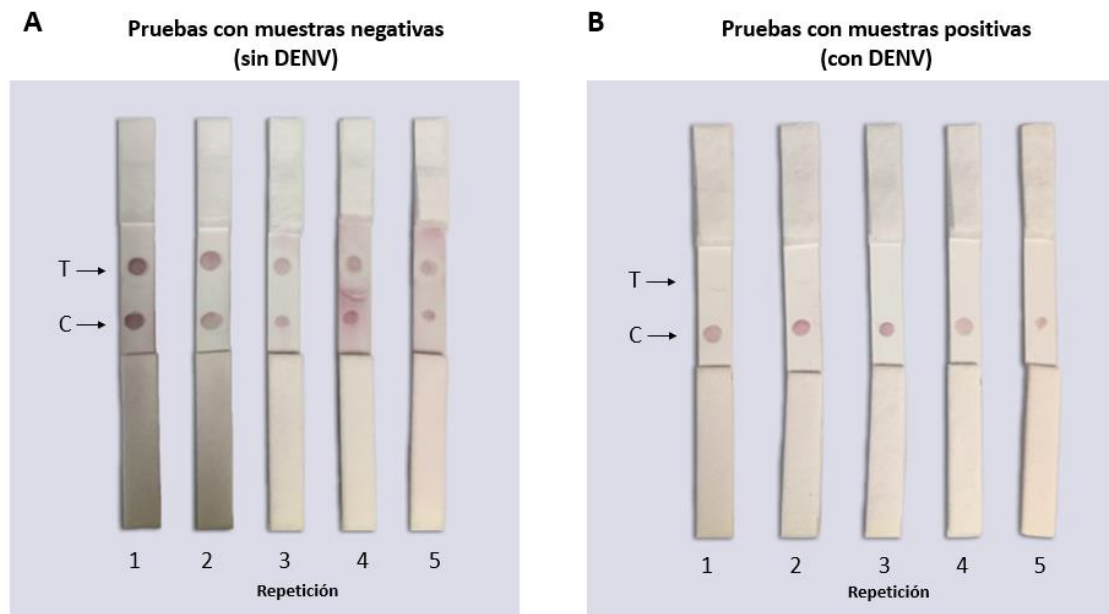


Figura 19. Prueba de reproducibilidad funcional de las pruebas de flujo lateral para la identificación de flavivirus. Las pruebas se realizaron con el mismo lote de pruebas ensambladas en las mismas condiciones, utilizando buffer PBS como muestra negativa y buffer PBS con DENV como muestra positiva (160 μ L de volumen total). (A) En las LFAs donde se colocaron muestras negativas (solo con buffer PBS), se observó dos señales rojas que indicaban la ausencia de DENV. (B) En las LFAs donde se colocaron muestras positivas (PBS con DENV) se observó una sola señal en la zona de control, donde el DENV en la muestra "compitió" con el virus inmovilizado en el LFA para unirse al biosensor. No se observaron falsos positivos ni negativos en ninguna de las pruebas realizadas.

Obtención y caracterización de los biosensores para la detección de SARS-CoV-2 (AuNP-RBD y AuNP-Spike)

La formación de los biosensores para la detección de SARS-CoV-2 se realizó utilizando el kit de conjugación de AuNPs siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los anticuerpos Anti-RBD y Anti-Spike se unieron a la superficie de las AuNPs de 40 nm (OD

1) mediante enlaces covalentes formando dos biosensores, AuNP-RBD y AuNP-Spike respectivamente. Como control de la conjugación, se usó BSA para recubrir las AuNPs formando el biosensor control AuNP-BSA. Los tres biosensores obtenidos AuNP-RBD, AuNP-Spike y el control (AuNP-BSA) se caracterizaron por diversas técnicas con el fin de evaluar las diferencias entre sus propiedades fisicoquímicas y su especificidad. Primero, se determinó el espectro de absorbancia del plasmón superficial de los biosensores mediante un escaneo espectral realizado en el rango UV-visible de 450 a 700 nm mediante espectrofotometría. El espectro UV-Vis de los biosensores AuNP-BSA, AuNP-RBD y AuNP-Spike reportaron un pico de absorbancia máximo a 530 nm, sin observarse un cambio entre el control y los biosensores con los anticuerpos específicos (ver figura 20).

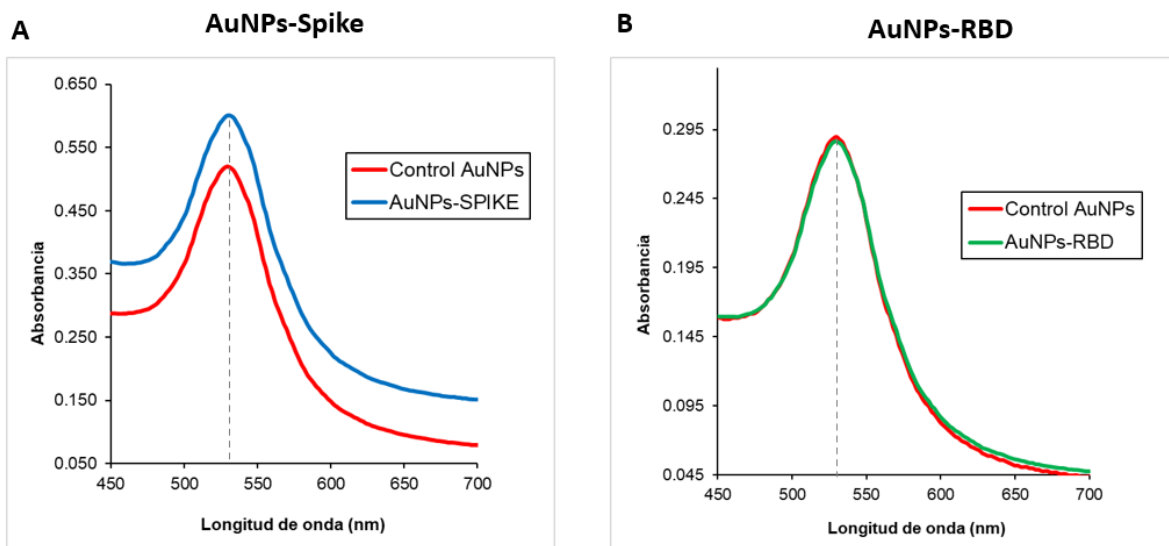


Figura 20. Caracterización de los biosensores AuNPs-RBD y AuNP-Spike. Espectros UV-Vis del biosensor AuNP-BSA (control) y las AuNPs conjugadas con anticuerpo anti-RBD y anti-Spike (Biosensores AuNP-RBD y AuNP-Spike, respectivamente). No se observó un cambio en el pico máximo de absorbancia del espectro

en los biosensores en comparación con el control (los picos máximos de absorbancia se indican con las líneas de punteadas).

Para corroborar el estado de agregación de los biosensores se realizó el ensayo GAT. Los resultados mostraron que el biosensor control AuNPs-BSA en presencia de PBS reportó un valor de agregación de 0.0716, mientras que los biosensores AuNP-RBD y AuNP-Spike presentaron valores de 0.0370 y 0.1140, respectivamente, donde todos presentaron valores menores a 0.2 lo cual indica la estabilidad de los conjugados formados (ver figura 21).

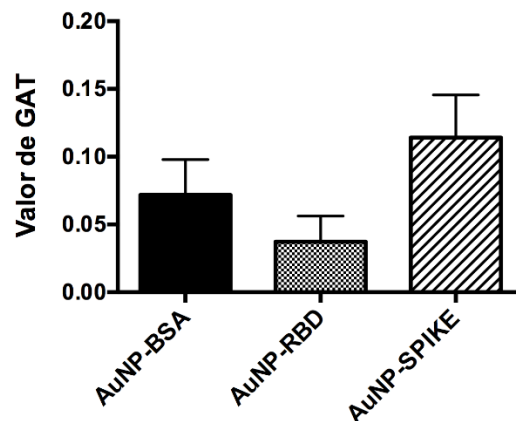


Figura 21. Determinación del valor de agregación de los biosensores para la detección de SARS-CoV-2 en buffer PBS. El valor de agregación se calculó mediante la prueba de agregación de oro (GAT). No hubo diferencia significativa entre el control y los biosensores con anticuerpos. Todos los biosensores presentaron valores inferiores a 0.2, indicando su estabilidad en estado coloidal.

Para determinar si cambiaba la estabilidad de los biosensores en presencia de una solución de transporte diferente al buffer PBS 1X, se determinó el valor de agregación de los biosensores en presencia de agua. Bajo esta condición, si se observó una diferencia significativa entre los biosensores con anticuerpo y el biosensor control, reportándose

un valor de agregación de 0.1193, 0.0653 y 0.0646 para el biosensor control y los biosensores AuNP-RBD y AuNP-Spike, respectivamente (figura 22).

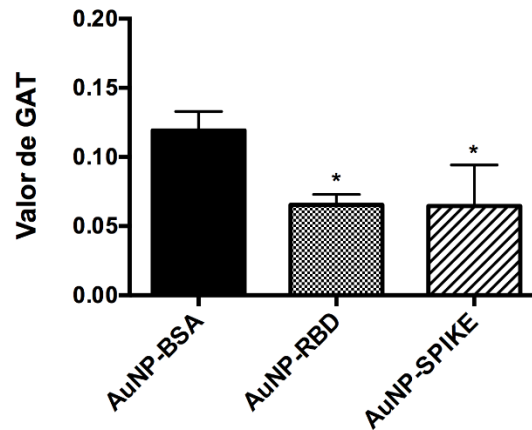


Figura 22. Determinación del valor de agregación de los biosensores para la detección de SARS-CoV-2 en agua. El valor de agregación se calculó mediante la prueba de agregación de oro (GAT). Se observó una diferencia significativa entre el control y los biosensores con anticuerpos, disminuyendo el valor de GAT indicando una mejor estabilidad y menor tendencia a la formación de conglomerados de los biosensores con anticuerpo en comparación con el control. Todos los biosensores presentaron valores inferiores a 0.2, indicando su estabilidad en estado coloidal. (* $p < 0.05$, $n = 3$).

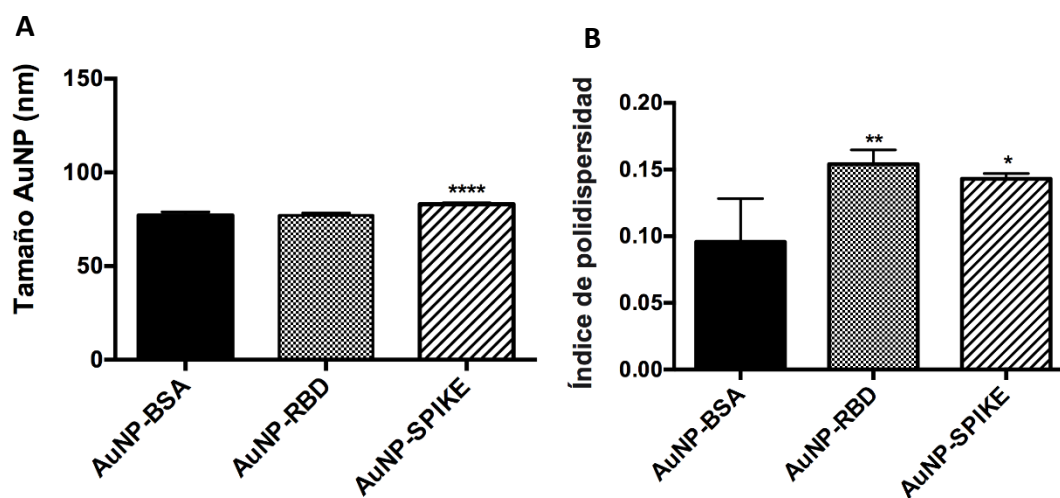
Para la caracterización fisicoquímica de los biosensores, se utilizó la dispersión de luz dinámica (DLS) con el fin de determinar el diámetro hidrodinámico (tamaño), el potencial Z y el índice de polidispersidad.

Los resultados obtenidos mostraron que el biosensor control AuNP-BSA presentó un diámetro hidrodinámico promedio de 77.01 nm, mientras que los biosensores AuNP-RBD y AuNP-Spike presentaron diámetros hidrodinámicos promedio de 77.04 y 83.06 nm respectivamente (figura 23A). A pesar de que no se esperaba estos tamaños (debido a que las AuNPs son de ≈ 40 nm según el proveedor), se observó un aumento en el diámetro hidrodinámico (tamaño) de las AuNPs que forman el biosensor AuNP-Spike. Este aumento se ha reportado como indicativo de la formación del complejo AuNP-

anticuerpo, sin embargo, no se observó un aumento de tamaño en el biosensor AuNP-RBD.

Por otro lado, el índice de polidispersidad medido en todos los biosensores fue menor a 0.2, lo que indicó que los biosensores y el control estaban monodispersos (estado coloidal) y presentaban menor variación en su conformación siendo una solución homogénea (figura 23B).

Al analizar los valores de potencial Z de los biosensores, se pudo observar que el biosensor control AuNP-BSA presentó un valor de -21.87 mV, un valor levemente inferior a los biosensores AuNP-RBD y AuNP-Spike (-20.80 y -21.33 mV, respectivamente), indicando que la superficie de la AuNP se modificó volviéndose más positiva (figura 23C).



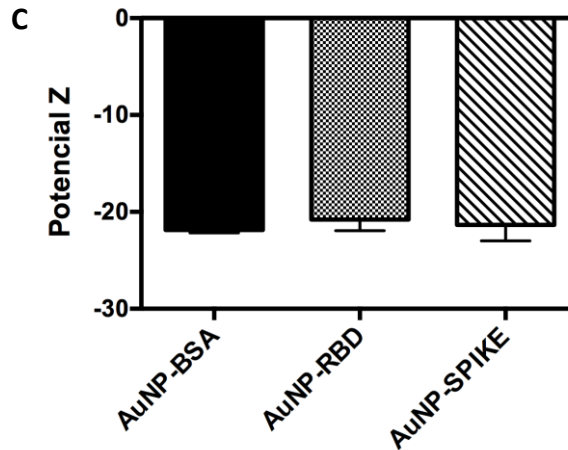


Figure 23. Análisis fisicoquímico de los biosensores para SARS-CoV-2 por DLS. (A) Diámetro hidrodinámico (Tamaño), (B) Índice de polidispersidad y (C) Valores de potencial Z del biosensor control (AuNP-BSA) y los biosensores (AuNP-4G2) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, $n = 3$).

Como pruebas complementarias para la caracterización de los biosensores (control, AuNP-RBD y AuNP-Spike), se realizaron las pruebas de movilidad electroforética. De acuerdo con los resultados observados en la figura 24A, las AuNPs presentaron un retraso en la movilidad electroforética cuando fueron recubiertas con anticuerpo anti-Spike en comparación con el control AuNP-BSA (sin anticuerpo). Este cambio en la movilidad sugiere un mayor tamaño de los biosensores AuNP-Spike debido a una migración más lenta. No se observó un cambio en la movilidad electroforética cuando las AuNPs fueron recubiertas con el anticuerpo anti-RBD (figura 24B).

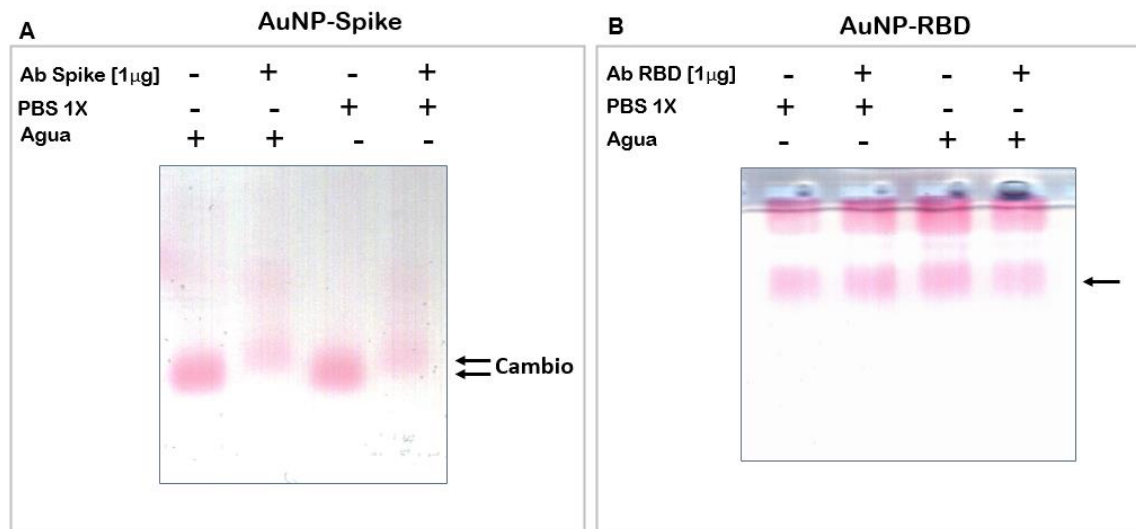


Figura 24. Ensayo de cambio de movilidad electroforética para los biosensores AuNP-BSA y AuNP-RBD, AuNP-Spike. Se utilizó electroforesis en gel de agarosa para identificar las diferencias de migración de cada biosensor de AuNPs, observándose diferencias únicamente entre el control y el biosensor AuNP-Spike.

Determinación de la especificidad de los biosensores por Dot blot.

Para determinar la funcionalidad de los biosensores, se realizaron dot blots, donde se inmovilizó en la membrana a la proteína RBD y se utilizó como sistema de detección a los biosensores diseñados. Se observó que el biosensor control no presentó reconocimiento de la proteína RBD a diferentes concentraciones. Los biosensores AuNP-RBD y AuNP-Spike se unieron a diferentes concentraciones de la proteína RBD y no presentaron afinidad por la proteína BSA, por lo que este ensayo demostró la especificidad de los biosensores diseñados a la proteína recombinante RBD y confirmó el correcto recubrimiento de las AuNPs con los anticuerpos a pesar de que no se observaron diferencias en los parámetros fisicoquímicos medidos entre el biosensor control y los biosensores para detectar SARS-CoV-2 (figura 25). Este sistema se propone como un sistema alternativo de detección del virus SARS-CoV-2 que no requiere equipos

especializados para la interpretación de los resultados ni un ambiente controlado de laboratorio.

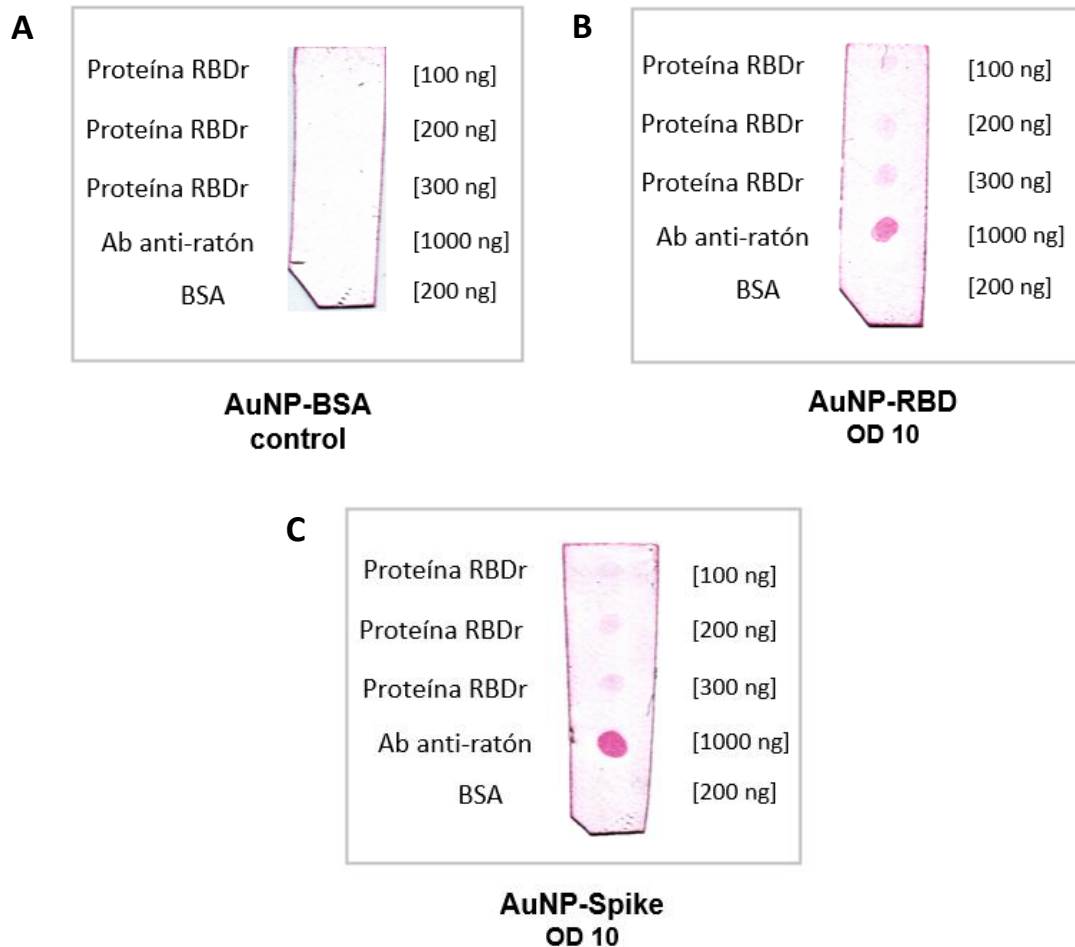


Figura 25. Resultados de los dot blots para determinar la especificidad de los biosensores. (A) Resultados del dot blot utilizando como marcador al biosensor AuNP-BSA (B) AuNP-RBD y (C) AuNP-Spike.

Obtención de los aptámeros específicos para la detección de influenza H1N1 y SARS-CoV-2.

Diseño y caracterización de la biblioteca

Para la obtención de aptámeros candidatos se diseñó una biblioteca aleatorizada y los primers para su amplificación (figura 26).

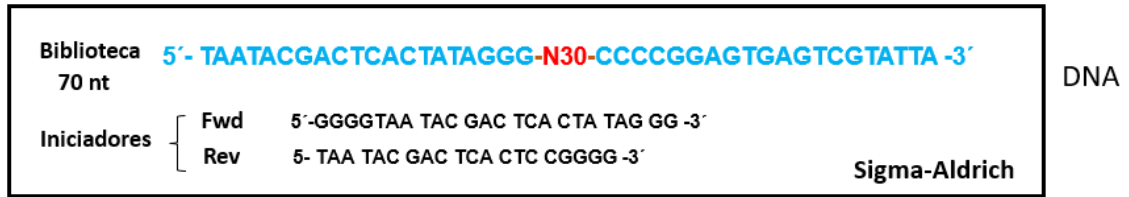


Figura 26. Secuencias de la biblioteca y los primers para la obtención de aptámeros de DNA.

Para obtener la biblioteca enriquecida como ssDNA se realizó un proceso de preparación de la biblioteca el cual se esquematiza en la siguiente figura:

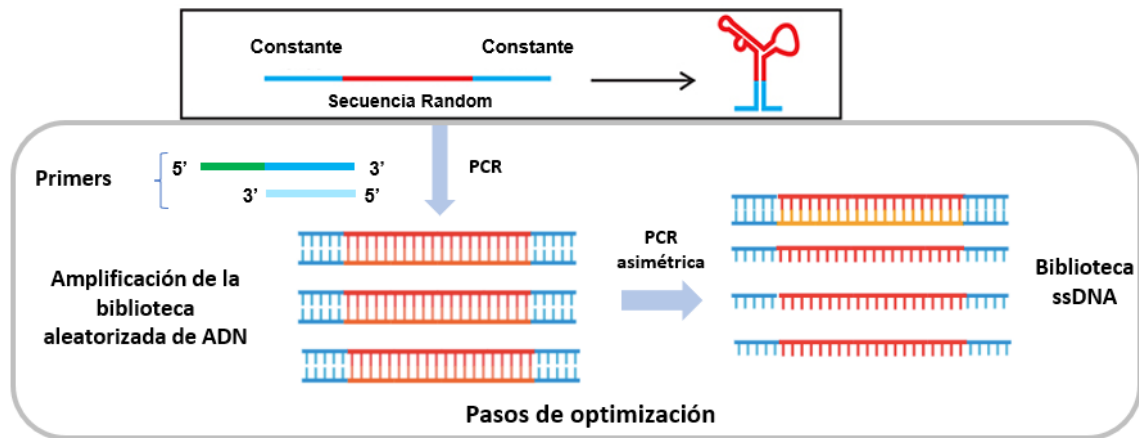


Figura 27. Pasos para la obtención de la biblioteca como DNA monocatenario para el SELEX.

La biblioteca se amplificó por PCR punto final, probando varios ciclos de amplificación para determinar los ciclos óptimos para obtener un mejor resultado. Se observó la amplificación de la biblioteca desde el ciclo 8, por lo tanto, se utilizaron estos ciclos en las reacciones de amplificación (ver figura 28). Se realizaron varias reacciones de amplificación con las mismas condiciones con el fin de obtener un enriquecimiento en la variabilidad de combinaciones de la secuencia aleatoria.

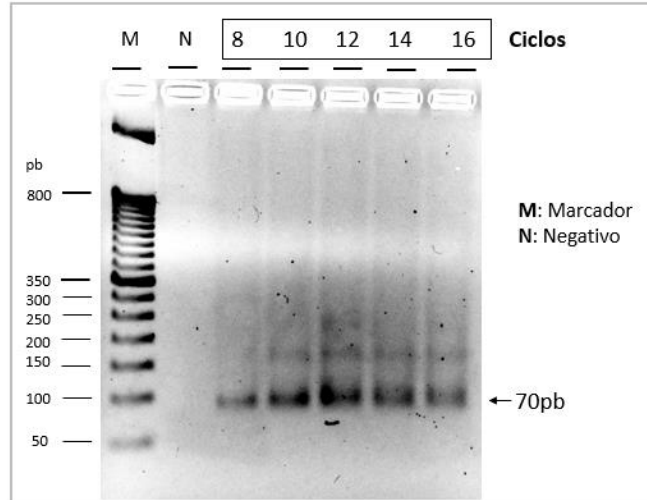


Figura 28. Optimización de la amplificación de la biblioteca de aptámeros. Amplicones obtenidos a partir de 100 nM de la biblioteca a diferentes ciclos de amplificación (8-16), M: Marcador de peso molecular 50 pb Invitrogen, N: control negativo. Gel de agarosa 3%, 80V/1hr.

Para optimizar la obtención de ssDNA a partir de la biblioteca (dsDNA) se realizaron pruebas con diversas condiciones de amplificación modificando la cantidad de primers (forward y reverso), la relación (o radio) entre estos y la cantidad de DNA molde a utilizar para favorecer la obtención de ssDNA. En la figura 29, se observan los productos de las PCRs para la optimización de la obtención de ssDNA, donde se observó favorecida la amplificación de ssDNA con respecto al dsDNA en las reacciones donde se colocó como DNA molde el producto de la amplificación de la biblioteca (dsDNA) como un 20% de volumen de la reacción asimétrica y 600 mM del iniciador fwd en una relación ya sea 100:1 o 50:1 (fwd:rev), por lo que se eligió trabajar con un radio de 100:1.

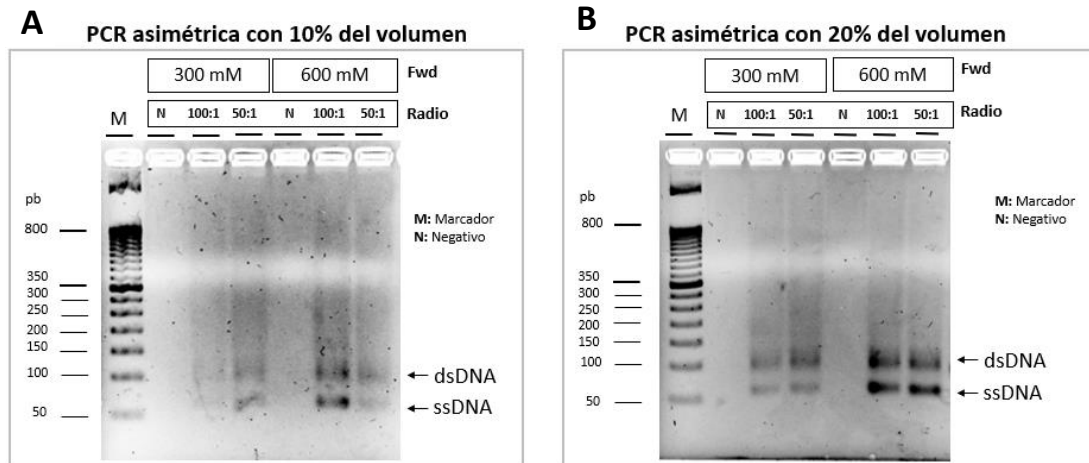


Figura 29. Optimización de la amplificación de ssDNA por PCR asimétrica. (A) Amplicones obtenidos a partir de 10% v/v de dsDNA con diferentes concentraciones y radios de primers forward y reverso. (B) Amplicones obtenidos a partir de 20% v/v de dsDNA. M: Marcador 50 pb Invitrogen, N: control negativo, Gel de agarosa 3%, 80V/1hr.

La biblioteca de ssDNA se purificó usando el protocolo de acetato de sodio-EDTA-SDS, obteniéndose una sola banda correspondiente al tamaño esperado de los oligonucleótidos de 70 nt (figura 30), este ssDNA se utilizó en la primera selección positiva para la selección de aptámeros contra las proteínas virales recombinantes RBD SARS-CoV-2 y H1 influenza H1N1.

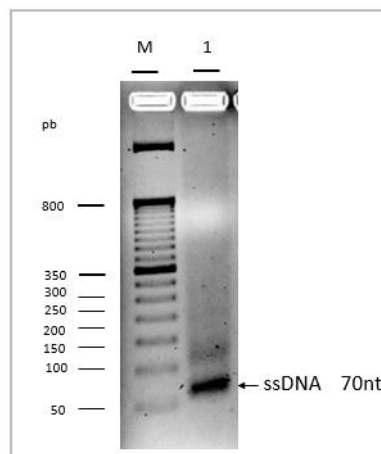


Figura 30. Biblioteca ssDNA purificada. M: Marcador 50 pb Invitrogen, 1: Pool de ssDNA a partir de la biblioteca para la selección de aptámeros candidatos. Gel de agarosa 3%, 90V/ 40 min.

Selección de aptámeros específicos contra las proteínas RBD del virus SARS-CoV-2 y H1 del virus Influenza H1N1

Para la selección de los aptámeros se desarrolló un proceso llamado SELEX, basado en la interacción de la biblioteca de ssDNA con el blanco inmobilizado (selección positiva) y en la exclusión de secuencias que pudieran ser específicas con otros elementos del sistema de detección (selección negativa), el esquema de cada selección se presenta a continuación:

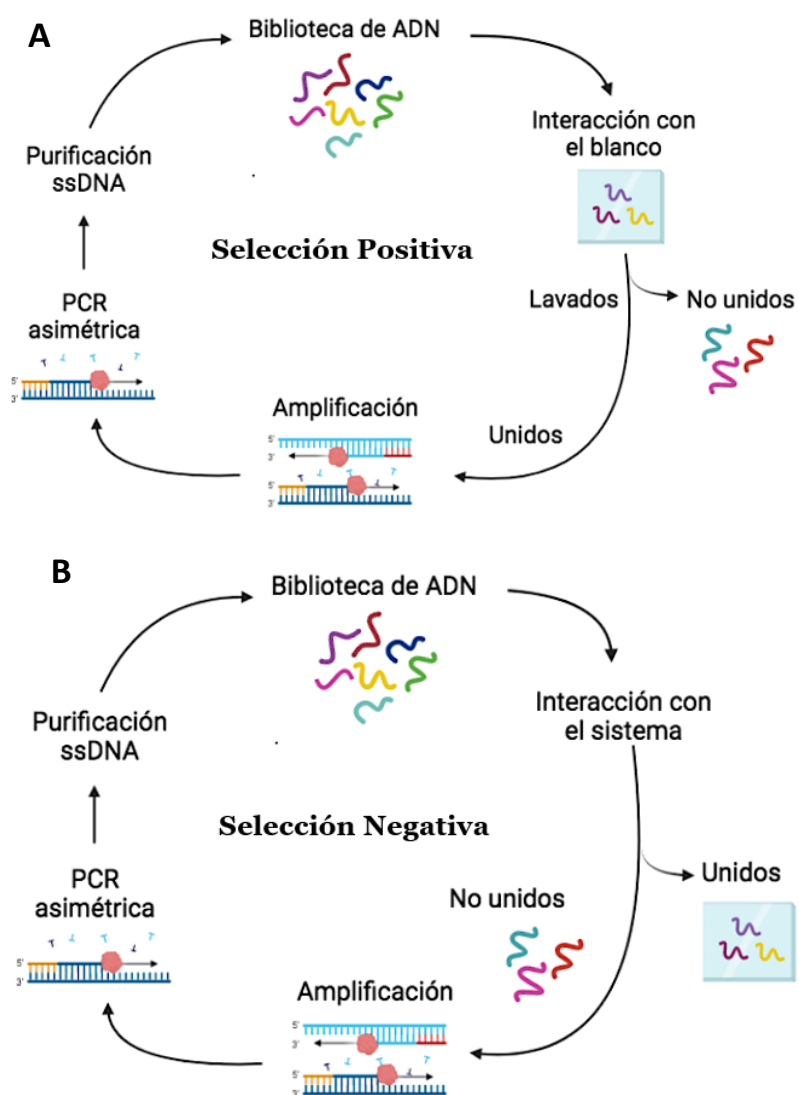


Figura 31. Esquemas representativos de la selección para la obtención de aptámeros candidatos. (A) Proceso para la selección y obtención de los aptámeros candidatos a partir de la interacción entre la biblioteca ssDNA y la proteína blanco. (B) Proceso de selección y obtención de los aptámeros candidatos descartando las secuencias que se unen a proteínas presentes durante la detección.

Aptámeros de DNA fueron seleccionados *in vitro* contra cada proteína blanco de cada virus. En el proceso de SELEX, se realizaron cinco rondas de selección positiva usando la proteína blanco (0.0005-50 ng) y seis rondas de selección negativa, tres contra la proteína H1 o RBD y tres contra BSA (1 µg). Después de la selección se amplificaron por PCR punto final las secuencias eluídas y se obtuvo el ssDNA por PCR asimétrica. El ssDNA se purifico y se cuantifico por nanodrop en cada ciclo. En la figura 32 y 33 se muestran imágenes representativas de la obtención del ssDNA por PCR asimétrica y la purificación de las secuencias durante los ciclos de selección positiva para RBD SARS-CoV-2 Y H1 H1N1, respectivamente.

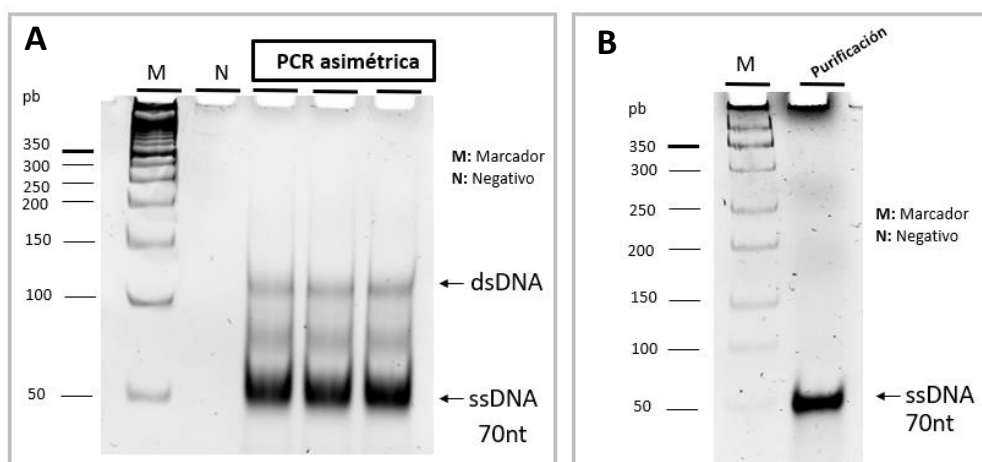


Figura 32. Resultados representativos de la obtención de ssDNA en cada ciclo. (A) Amplicones resultantes de la PCR asimétrica para la obtención de ssDNA, (B) ssDNA purificado después del ciclo de selección para entrar al siguiente ciclo. M: marcador 50 pb Invitrogen, N: negativo. Geles de acrilamida 10%, 90V/ 1 h.

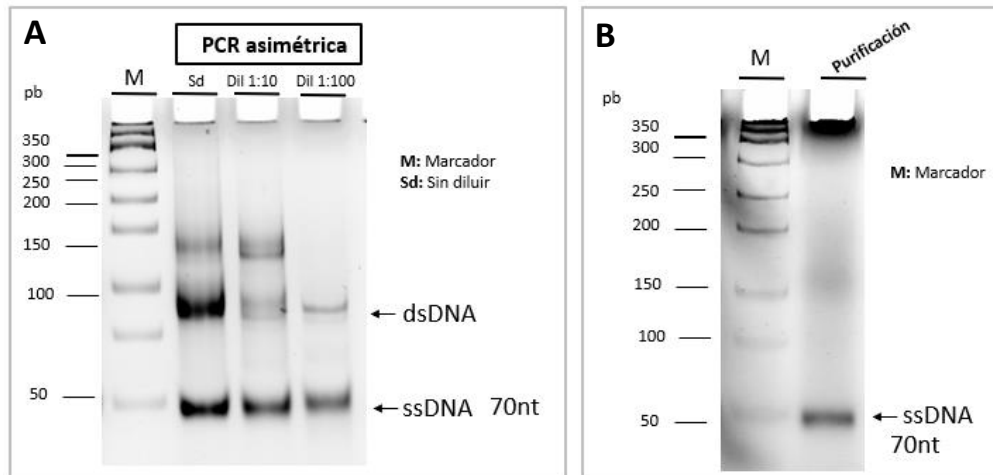


Figura 33. Resultados representativos de la obtención de ssDNA en cada ciclo. (A) Amplicones resultantes de la PCR asimétrica para la obtención de ssDNA, (B) ssDNA purificado después del ciclo de selección para entrar al siguiente ciclo. M: marcador 50 pb Invitrogen, N: negativo. Geles de acrilamida 10%, 90V/ 1 h.

Las condiciones de cada selección y la cantidad de ssDNA recuperado después de la selección positiva y las selecciones negativas contra las proteínas BSA y H1 para la obtención de los aptámeros contra RBD SARS-CoV-2 se observan en las tablas 16, 17 y 18, respectivamente. Las condiciones de la selección positiva y negativa y la cuantificación del ssDNA recuperado para la obtención de aptámeros dirigidos a RBD se reportan en las tablas 23, 24 y 25 y las de H1 se reportan en las tablas 26, 27 y 28.

Tabla 23. Condiciones y resultados de la selección positiva de los aptámeros contra la proteína RBD.

Ciclo	Proteína RBD (ng)	ssDNA para el SELEX (ng)	Tiempo de incubación con el blanco	ssDNA purificado (ng/μL)
1	1000	380	15 min	21.5
2	500	380	5 min	6.4
3	250	380	5 min	9.24
4	125	380	5 min	9.46
5	62.5	380	5 min	8.85

Tabla 24. Condiciones y resultados de la selección negativa con la proteína BSA de los aptámeros RBD.

Ciclo	Proteína BSA (μg)	ssDNA para el SELEX (ng)	Tiempo de incubación con el blanco	ssDNA purificado ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
1	1	450	5 min	10.01
2	1	980	5 min	16.13
3	1	806.5	5 min	11.5

Tabla 25. Condiciones y resultados de la selección negativa con la proteína H1 de los aptámeros RBD.

Ciclo	Proteína H1 (H1N1) (μg)	ssDNA para el SELEX (ng)	Tiempo de incubación con el blanco	ssDNA purificado ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
1	1	460	5 min	23.03
2	1	920	5 min	17.8
3	1	890	5 min	18.6

Tabla 26. Condiciones y resultados de la selección positiva de los aptámeros contra la proteína H1.

Ciclo	Proteína H1 (ng)	ssDNA para el SELEX (ng)	Tiempo de incubación con el blanco	ssDNA purificado ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
1	50	700	5 min	14.9
2	5	700	5 min	15.87
3	0.5	700	z5 min	22.8
4	0.005	700	5 min	18.33
5	0.0005	700	5 min	11.86

Tabla 27. Condiciones y resultados de la selección negativa con la proteína RBD de los aptámeros H1.

Ciclo	Proteína RBD (μg)	ssDNA para el SELEX (ng)	Tiempo de incubación con el blanco	ssDNA purificado ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
1	1	380	15 min	9.68

2	1	193	5 min	8.98
3	1	257	5 min	24.5

Tabla 28. Condiciones y resultados de la selección negativa con la proteína BSA de los aptámeros H1.

Ciclo	Proteína BSA (μg)	ssDNA para el SELEX (ng)	Tiempo de incubación con el blanco	ssDNA purificado ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
1	1	980	5 min	26.5
2	1	1060	5 min	13.6
3	1	544	5 min	14.9

En el último ciclo, las secuencias obtenidas se amplificaron por PCR punto final y se clonaron en el vector TOPO TA. Los plásmidos se caracterizaron tomando en cuenta el tamaño del fragmento obtenido, presentándose un tamaño de aproximadamente 140 pb cuando el vector está vacío y corresponde al total de nucleótidos de la región M13 del vector, mientras que un tamaño de amplicon de 210 pb corresponde a la región M13 más la secuencia correspondiente al aptámero (figura 34).

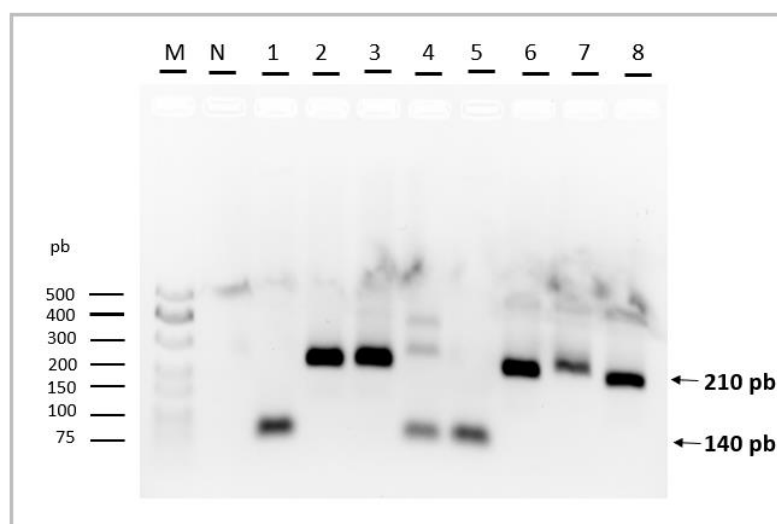


Figura 34. Amplificación de fragmentos para la caracterización de plásmidos (primers M13). Gel de acrilamida de las PCRs para la caracterización de los plásmidos obtenidos amplificado la región M13 del vector. M: marcador 50 pb Invitrogen, N: negativo. Geles de acrilamida 10%, 90V/ 1 h.

Una vez seleccionados los plásmidos que pudieran contener las secuencias (por la diferencia de tamaños de los amplicones en los geles), los fragmentos correspondientes a la región M13 se amplificaron, purificaron y se prepararon las reacciones de secuenciación de acuerdo con lo establecido en la metodología previamente descrita. Después de analizar las secuencias, se obtuvieron ocho secuencias candidatas. Las secuencias contaban con las dos regiones constantes de 20 nts flanqueando una región aleatoria, y 30 nts en la región aleatoria con excepción de la secuencia 769 que contaba con 29 nts. Las secuencias obtenidas se muestran en la siguiente tabla.

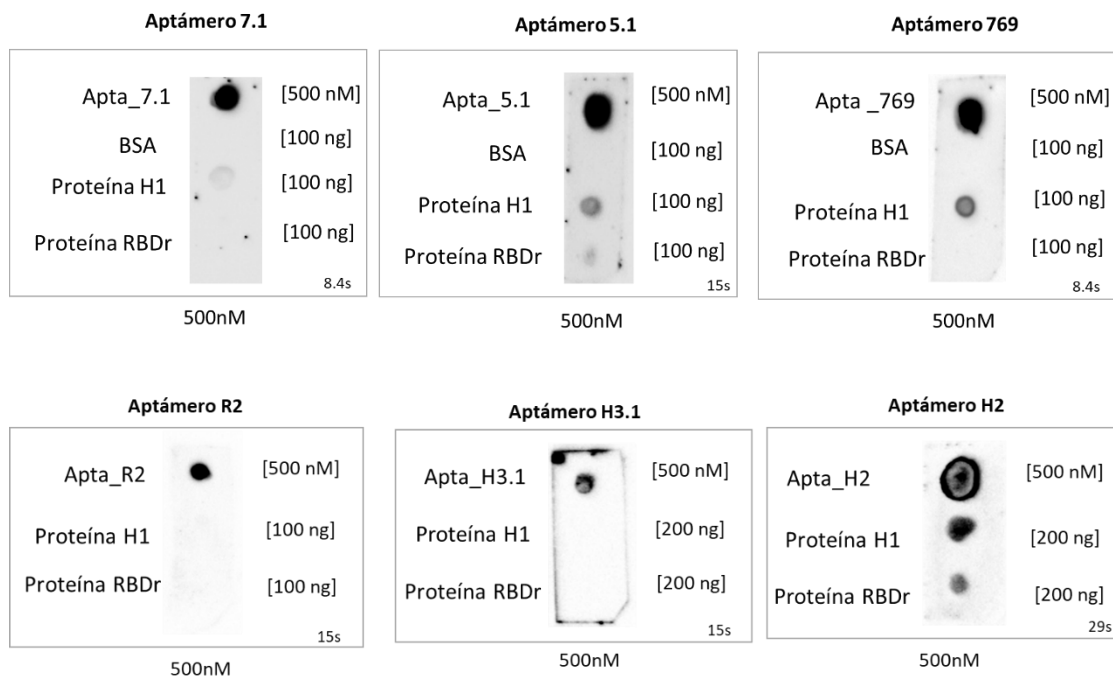
Tabla 29. Secuencias candidatas como aptámeros específicos para las proteínas virales.

Nombre	Secuencia
Apta 769	5'TAATACGACTCACTCCGGGGGAGGCGGATCGGGAGTGTGGGGCTAGGGCCTATAGTGAGTCGTATTA3'
Apta 5.1	5'TAATACGACTCACTATAGGGCACAGCCACCATCCCCACACCTCCCTCCCCCGGAGTGAGTCGTATTA 3'
Apta 7.1	5'TAATACGACTCACTATAGGGCCCTAGCCCCACACTCCCGATCCGCCTCCCCCGGAGTGAGTCGTATTA 3'
Apta R2	5'TAATACGACTCACTATAGGGCTCCTCGCCCTCCCTCCTCCTCCCTCCTCCCCCGGAGTGAGTCGTATTA 3'
Apta 3.1	5'TAATACGACTCACTATAGGGCACCGCCCGTACAACACATCCTCCCCCGCCCCCGGAGTGAGTCGTATTA 3'
Apta 2	5' TAATACGACTCACTATAGGGCGTATTACCCAGCGACCACTACCCACTGCCCCCGGAGTGAGTCGTATTA 3'
Apta 1.1	5'TAATACGACTCACTATAGGGCACCGCCCGTCTAGCCTCCTCACCCCGCCCCCGGAGTGAGTCGTATTA 3'

Determinación *in vitro* de la especificidad de los aptámeros

La especificidad de las secuencias candidatas obtenidas se determinaron *in vitro* por dot blot. Los aptámeros se mandaron a sintetizar marcados con biotina en el extremo 5'. Para cada ensayo, los aptámeros biotinilados (concentración 500 nM) se incubaron con

membranas de nitrocelulosa que tenían inmovilizadas proteínas virales (RBD y H1) y una proteína control BSA (100 ng cada una), y posteriormente, se utilizó estreptavidina conjugada con HRP para determinar la unión de los aptámeros a las proteínas. Los resultados de los dot blots se pueden observar en la figura 35. Los aptámeros H1.1, 5.1 y H2 mostraron afinidad por ambas proteínas RBD y H1. El aptámero 769 (500 nM) fue el único aptámero que resultó específico para la proteína H1 desde 100 ng. No se obtuvieron aptámeros candidatos que se unieran a la proteína RBD DEL SARS-CoV-2. Además, se realizó un dot blot como control positivo de la técnica, usando anticuerpo anti-Spike para corroborar que la proteína RBD se inmovilizó en las membranas (figura 36). Con estos resultados, se decidió trabajar únicamente con el aptámero 769 para los ensayos de caracterización *in vitro* e *in silico*.



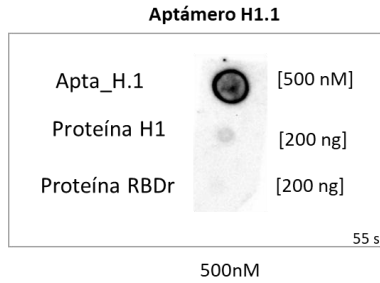


Figura 35. Resultados de los dot blot para determinar la especificidad de las secuencias candidatas. Como se muestra en la imagen, se demostró que todas las secuencias se encontraban biotiniladas, mediante la señal positiva de la estreptavidina-HRP observada en cada control. El aptámero Apta 769 fue el único que se unió selectivamente a la proteína recombinante H1.

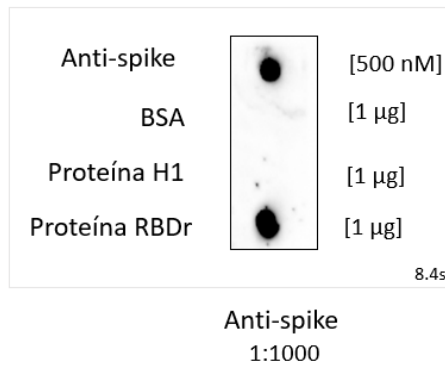


Figura 36. Dot blot control de la proteína RBD SARS-CoV-2. Por medio de un dot blot y el anticuerpo primario anti-RBD, se determinó que la proteína usada en los ensayos de especificidad de los aptámeros correspondía a RBD del virus SARS-CoV-2.

Análisis estructural del aptámero 769

Una vez que se determinó la especificidad del aptámero 769, se determinó el probable plegamiento del aptámero. La estructura secundaria del aptámero se predijo utilizando el software mFold, generándose dos estructuras probables para el aptámero Apta 769, donde en ambas estructuras se formaron tres bucles y un tallo (figura 37). Las estructuras presentaron una energía de Gibbs similar entre ellas, de -15.23 y -15.24 por lo que ambas

estructuras son probables y pudieran presentarse al momento del plegamiento del aptámero.

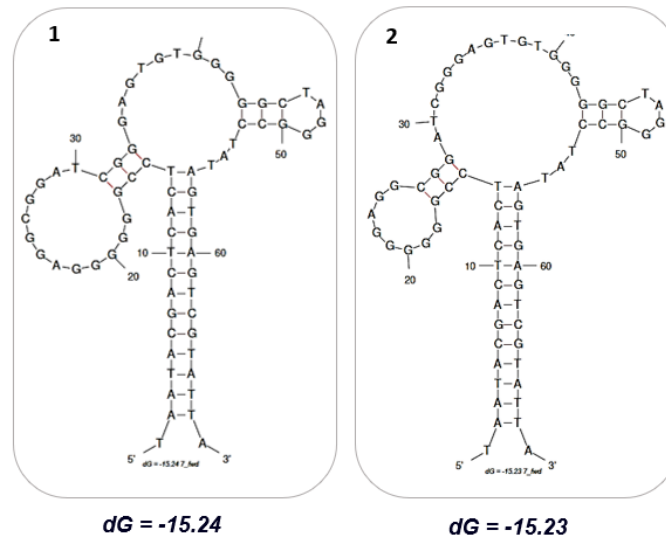


Figura 37. Predicción de las estructuras secundarias de los aptámeros. Se presentan las estructuras secundarias con la energía libre (dG) más baja.

Interacción *in silico* del aptámero 769 con su proteína blanco

Para determinar las interacciones entre del aptámero 769 y la proteína hemaglutinina (proteína blanco), se realizaron modelamientos mediante el servidor HADDOCK. Para obtener los modelos de interacción, primero se determinó la estructura 3D del plegamiento del aptámero. Para el aptámero Apta 769 se obtuvieron dos posibles plegamientos 3D que se muestran en la figura 38.

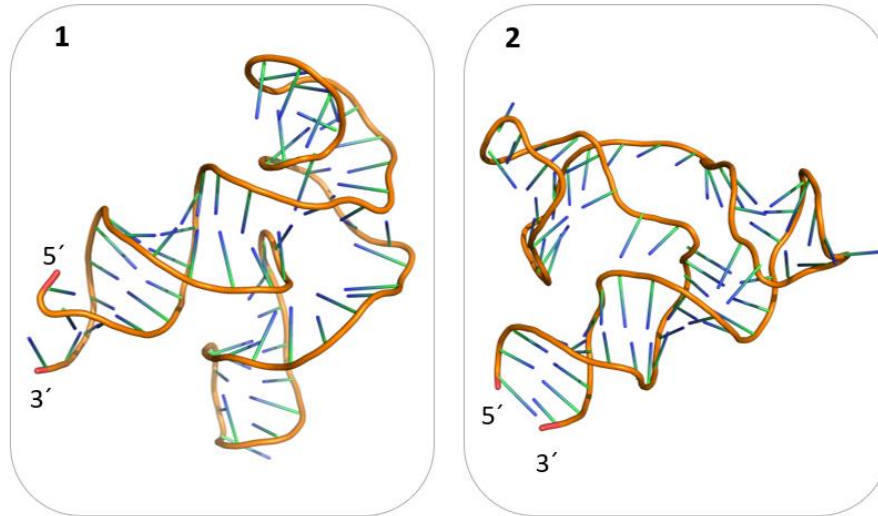


Figura 38. Estructuras 3D del aptámero Apta 769. Las estructuras 3D se establecieron a partir de las dos estructuras 2D posibles.

Después del modelamiento y la optimización de la estructura del aptámero, se determinó la interacción entre el aptámero Apta 769 y la proteína H1. Los resultados del software mostraron la formación de 132 estructuras agrupadas en 14 clústers que represento el 66% de los modelos refinados por el software. Las predicciones mostradas en la figura 39, corresponden al clúster superior, el más fiable según HADDOCK. Los parámetros de fiabilidad de las estructuras se reportan en la tabla 30. Los parámetros más importantes que se tomaron en cuenta para la selección de las estructuras fue el puntaje Z que indica cuántas desviaciones estándar del promedio se encuentra en este grupo en términos de puntaje (cuanto más negativo mejor), y el puntaje de HADDOCK que es una suma ponderada de una variedad de términos de energía, incluidos Van der Waals, energías electrostáticas, etc.

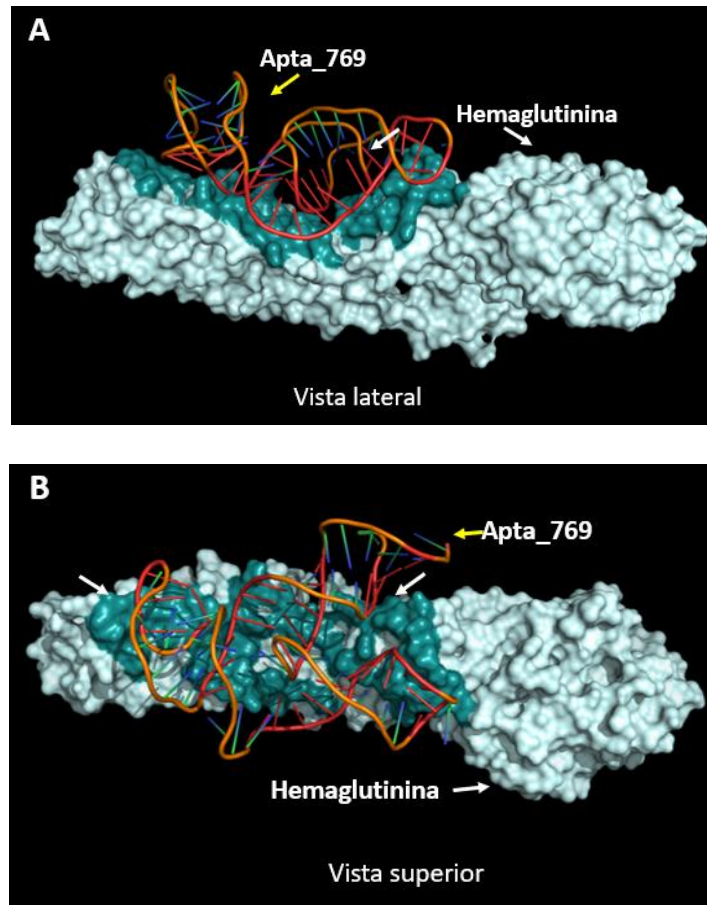


Figura 39. Esquema de la interacción entre el aptámero 769 y la proteína H1. El aptámero Apta 769 se representa en líneas coloreadas, mientras que la proteína H1 se representa en gris, la superficie de contacto entre la proteína y el aptámero se representa en azul.

Tabla 30. Parámetros de las estructuras proteína-aptámero modeladas por el software HADDOCK.

Parámetro	RBD-Apta_RBD	H1-Apta 769
Puntaje de HADDOCK		-80.6 +/- 2.3
Tamaño de clúster		32
RMSD (de la estructura general de energía más baja)		0.5 +/- 0.3
Energía de Van der Waals		-167.1 +/- 13.0
Energía Electrostática		-70.5 +/- 82.2
Área de superficie cubierta (BSA)		3629.7 +/- 184.3
Puntaje Z		-1.7

Las predicciones de las estructuras de interacción aptámero-proteína permitió determinar los aminoácidos involucrados en esta interacción. En la figura 40, se puede observar la interacción de cada aminoácido con el aptámero. Además, el programa pudo determinar qué tipo de interacción no covalente presentaban los aminoácidos con el aptámero agrupándolos ya sea en interacción por puentes de sal o por puentes de hidrogeno (ver tabla 31).

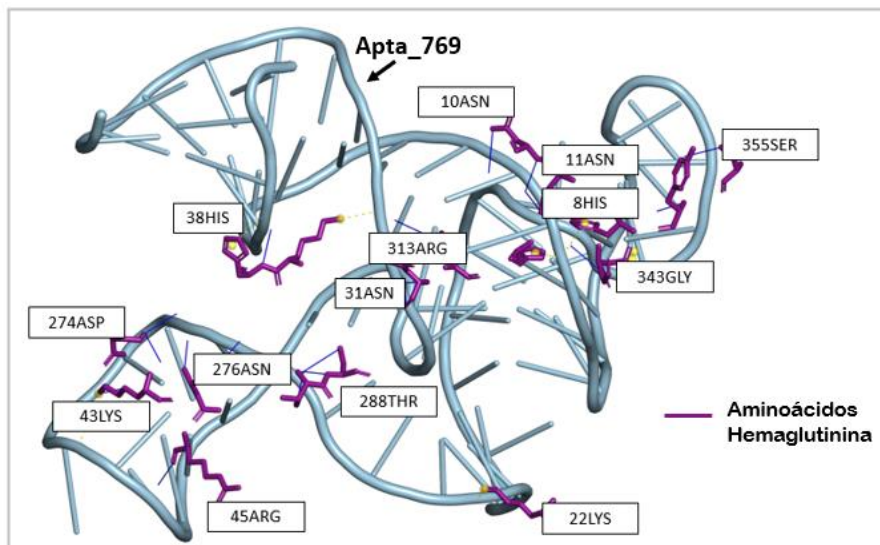


Figura 40. Sitios de unión de los aptámeros mostrados en la estructura tridimensional. La representación estructural de la proteína H1 se generó a partir de una estructura existente (PDB 3LZG). El aptámero 769 se encuentra representado en azul mientras que los aminoácidos que participan en la interacción se encuentran marcados como barras moradas.

Tabla 31. Aminoácidos que presentan interacciones moleculares con el aptámero Apta 769.

PUENTES DE HIDROGENO	PUENTES DE SAL
27ASN	25HIS
28ASN	45HIS
48ASN	53LYS
54HIS	54HIS
60LYS	60LYS
62ARG	363ASP
291ASP	22LYS
293ASN	
305THR	
306SER	
330ARG	
364GLY	
376SER	
378TYR	

Determinación de la afinidad de los aptámeros por ensayos ELONA

Se estandarizó el protocolo del ensayo ELONA incluyendo concentraciones, volúmenes y tiempos de incubación con el objetivo de mejorar la detección de la proteína con el aptámero. La figura 41 se muestra el esquema de funcionamiento del ELONA indirecto diseñado para la detección de hemaglutinina (Influenza H1N1). En el ELONA indirecto, la molécula diana (hemaglutinina) se inmoviliza en una placa de microtitulación y forma un complejo con el aptámero 769 biotinilado. Este complejo es reconocido por la estreptavidina-HRP que reacciona con la adición del sustrato TMB, se produciéndose un cambio de color. La intensidad del color indica la lectura de la señal que representa el nivel de aptámero que reacciona con el objetivo.

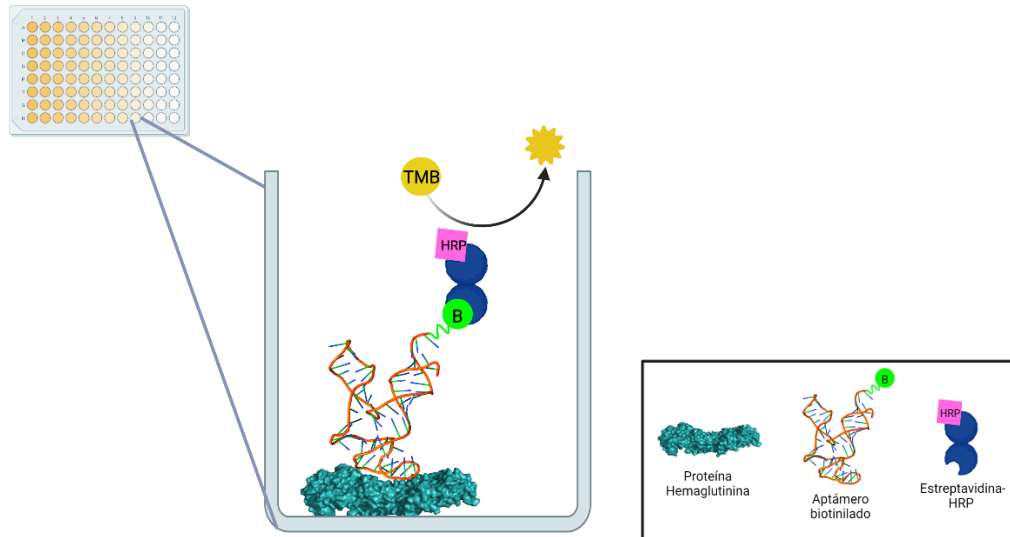


Figura 41. Esquema del ELONA indirecto basado en el aptámero 769 para la detección de hemaglutinina (Influenza H1N1).

Para evaluar la afinidad de los aptámeros frente a la proteína objetivo, se realizó un análisis dependiente de la concentración del aptámero, donde se recubrieron 500 ng de hemaglutinina H1N1 en cada pozo y se probaron diferentes concentraciones del aptámero 769 biotinilado de 0 a 400 nM.

Se determinó que el reconocimiento del aptámero 769 dependía de la concentración utilizada, por lo tanto, los niveles de absorbancia aumentaron a medida que aumentaban las concentraciones de aptámero mientras que no se observó esta tendencia dosis dependiente en el tratamiento con BSA a las mismas concentraciones de aptámero (figura 42).

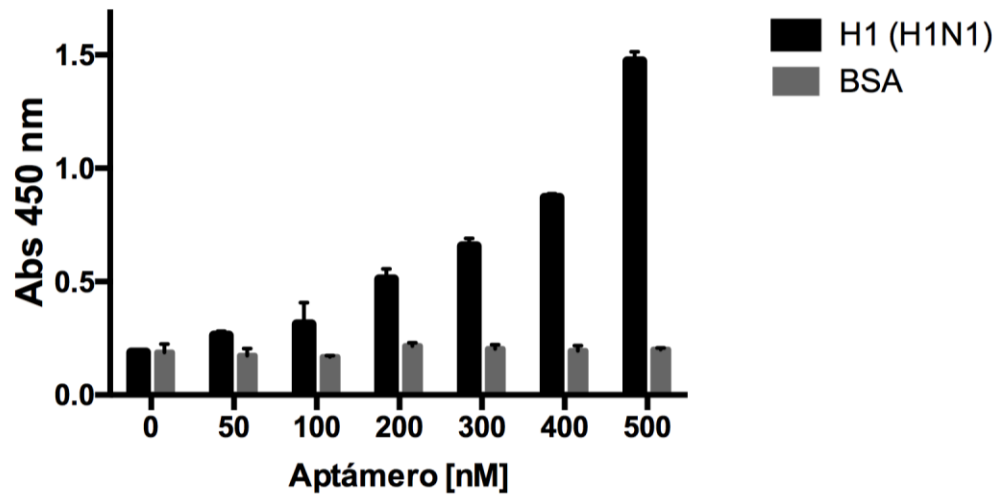


Figura 42. Resultados de la determinación de la afinidad del aptámero 769 a las proteínas H1 y BSA. El aptámero Apta 769 se une de manera dosis dependiente a la proteína recombinante H1, mientras que no se observó esa tendencia con la proteína BSA, demostrando la afinidad del aptámero Apta 769 por su proteína blanco. Todos los datos se muestran como media \pm SEM y los ensayos se realizaron por triplicado.

En base a estos resultados, la afinidad de unión (valor de K_d) se determinó con el software GraphPad Prism mediante el análisis de ajuste de curvas no lineales seleccionando la opción de saturación de unión de un sitio calculando el valor por unión total y restando la unión no específica del sistema. El valor de K_d calculado para el aptámero Apta 769 fue de 68.2 nM (figura 43).

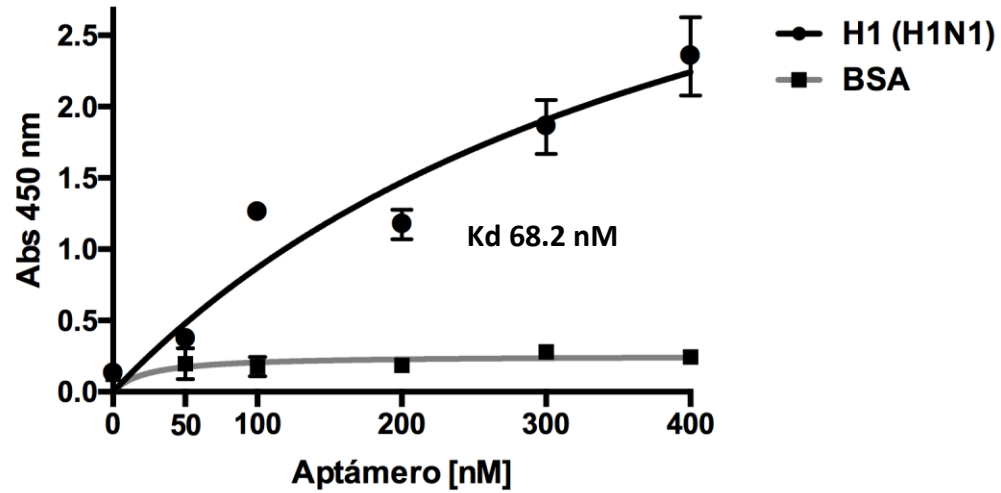


Figura 43. Resultado de la determinación de los valores de Kd del aptámero 769 por ELONA. La unión entre la proteína H1 y el aptámero 769 marcado con biotina se evaluó midiendo la absorbancia a 450 nm a diferentes concentraciones del aptámero. Los datos se analizaron con GraphPad Prism para realizar análisis de ajuste de curvas no lineales para el cálculo de Kd.

Ensayos de competencia en el sitio de unión por ELONA competitivo.

Para determinar si el aptámero 769 tenía más de un sitio de unión a su blanco se realizó un ELONA competitivo. En los experimentos de unión competitiva, se añadió un aptámero no modificado y un aptámero modificado con biotina para competir por la unión con hemaglutinina. Si el aptámero se unía a un solo sitio en el blanco, conforme fuera aumentando el aptámero no marcado, debía disminuir la señal del aptámero marcado con biotina.

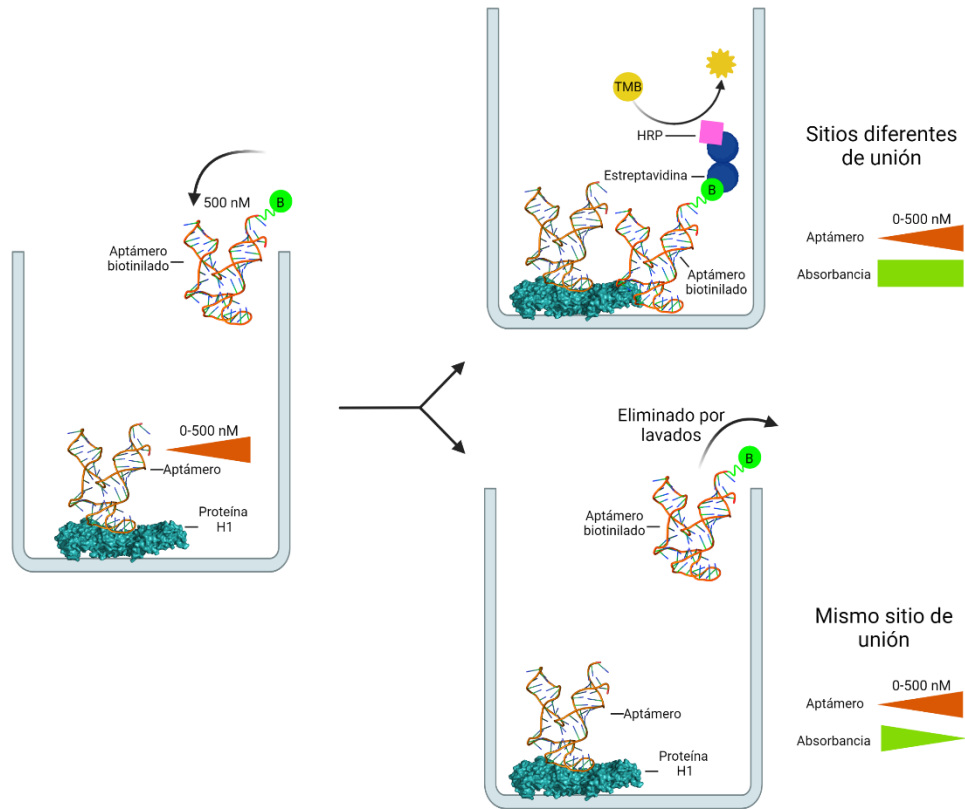


Figura 44. Esquema del ELONA competitivo basado en el aptámero 769.

Los resultados mostraron que el aptámero no modificado no afectó la unión específica del aptámero modificado con biotina a la proteína, lo que demostró que el aptámero tenía más de un sitio de unión, donde la señal del aptámero marcado se mantenía en un 100% cuando se agregó hasta 400 nM del aptámero no marcado (figura 45).

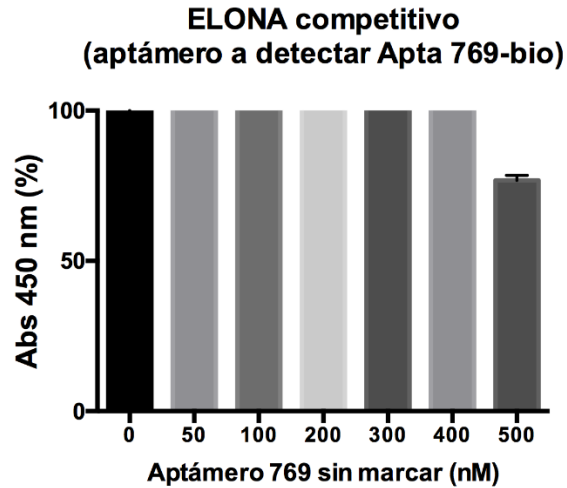


Figura 45. Ensayo de competencia en el sitio de unión en solución. El ELONA competitivo se utilizó evaluar si el aptámero 769 tenía más de un sitio de unión a la proteína H1. Para este ensayo, se utilizaron diferentes concentraciones del aptámero 769 no marcado (aptámero competitivo) y el aptámero 769 marcado con biotina como aptámero de detección. La señal obtenida se representó en la gráfica como porcentajes. Cada grupo de datos representa la media \pm DE (n = 3).

Ensayo ELONA para la detección de hemaglutinina del virus de la influenza H1N1.

El aptámero 769 se marcó en el extremo 5' con biotina y se utilizó para el diseño del ELONA indirecta (figura 41). El ensayo ELONA fue desarrollado como un método alternativo para la detección de la proteína hemaglutinina del virus de influenza A H1N1. En este ensayo, el aptámero actúa como una sonda de marcaje de la proteína, donde el aptámero biotinilado a una concentración de 500 nM de aptámero detectó hasta 5 μ g de proteína hemaglutinina, calculándose un límite de detección del ensayo de 6.8 ng ($Y=0.0045X + 0.4801$) (figura 46). Con este ensayo, demostramos que el aptámero 769 tiene el potencial de utilizarse en métodos de detección y marcaje de hemaglutinina (H1N1).

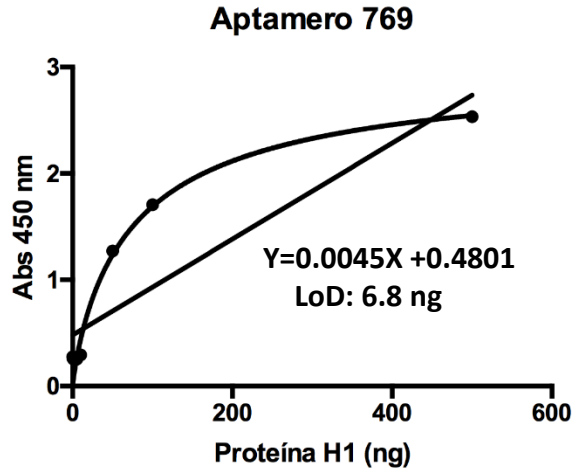


Figura 46. Curva para la determinación del Límite de Detección (LoD) del ELONA basado en el aptámero 769. La curva estándar se realizó con diferentes concentraciones de hemaglutinina (0- 500 ng) en buffer de carbonatos y obteniéndose la ecuación de la recta $y = 0.0045x + 0.4801$ con una $R^2 = 0.96$, donde “X” es la concentración de proteína H1 en ng, y “Y” es el valor de absorbancia (OD450) $n=3$.

Efecto del aptámero 769 en la viabilidad de células Vero

La citotoxicidad de los aptámeros se determinó en células Vero con el ensayo de viabilidad MTT. Las células permanecieron de 80 a 100% viables después de 24, 48 y 72 h de incubación con el aptámero a una concentración máxima de 1000 nM (ver figura 47). Estos resultados demostraron que el aptámero 769 hasta 1000 nM no es citotóxico para las células Vero y pueden utilizarse en ensayos in vitro con estas células para el desarrollo de aplicaciones terapéuticas.

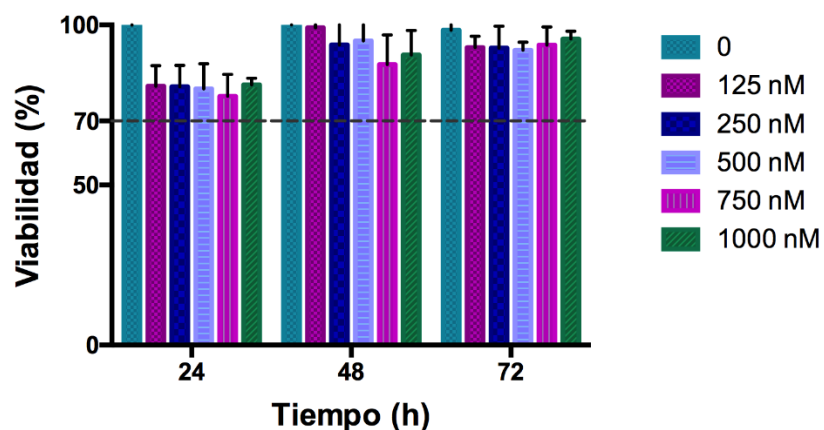


Figura 47. Ensayo de citotoxicidad de células Vero tratadas con concentraciones crecientes del aptámero 24, 48 y 72 h. Para determinar el porcentaje de viabilidad de las células se utilizó el ensayo de MTT. Cada grupo de datos representa la media \pm DE (n = 6).

Estabilidad del aptámero 769 en cultivo celular

La susceptibilidad de los aptámeros a las nucleasas es uno de los principales desafíos que deben abordarse para su uso en pruebas con cultivo celular, ya que se requiere que sean estables en condiciones fisiológicas. Se determinó la bioestabilidad del aptámero 769 en cultivo de células Vero en medio DMEM 5% SFB. Primero, se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas del aptámero 769 (diluidas 10,000 veces con medio DMEM suplementado) y se determinó el Ct para cada una, obteniéndose la ecuación de la recta (ver figura 48).

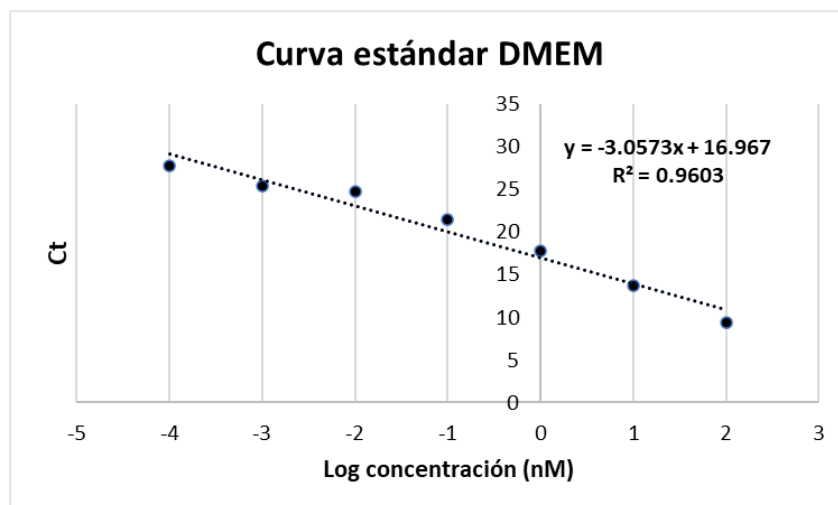


Figura 48. Curva estándar para la cuantificación de aptámero en medio celular por qPCR. Las concentraciones del aptámero (0.002, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 y 2000 pg) se representan de forma logarítmica y los valores de Ct correspondientes se graficaron en el eje Y. La eficiencia de la qPCR es del 96.03%.

Para determinar la estabilidad del aptámero en medio celular, concentraciones crecientes del aptámero (125, 250, 500, 750 y 1000 nM) en un volumen de 10 μ L se incubaron con células Vero sembradas en placas de 96 pozos (10,000 células/pozo) con un volumen de medio de 80 μ L. Los aptámeros se incubaron con las células a 37°C por 24, 48 y 72 h y posteriormente se cuantificó la cantidad de aptámero presente en cada sobrenadante mediante qPCR utilizando los primers de la biblioteca para su amplificación. Lo cuantificado en cada tiempo de recuperación se comparó con lo cuantificado en el tiempo 0 (100%). Como se observa en la figura 49, el porcentaje de aptámero presente en el sobrenadante de células Vero se observa mayor al 70% a las 24 y 48 h en todas las concentraciones probadas de aptámero. A partir de las 72 h, se observó un decremento en el porcentaje de aptámero intacto menor al 30% en todas las concentraciones probadas, indicando que el aptámero puede estar degradando a partir de las 48 h.

Estabilidad del aptámero en cultivo celular

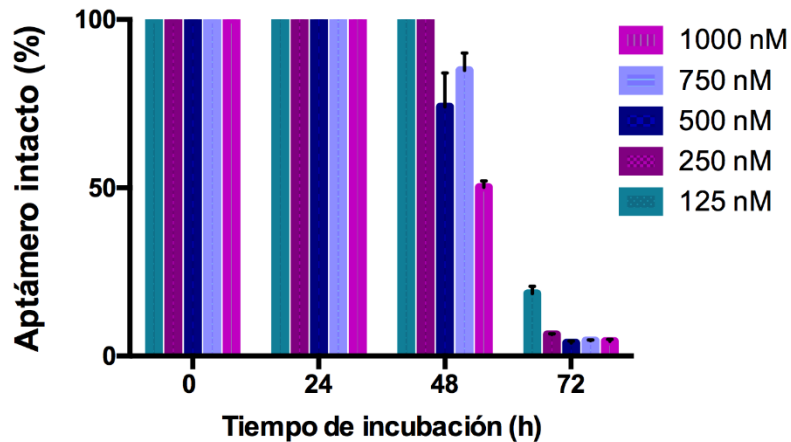


Figura 49. Estabilidad del aptámero 769 en cultivo celular. Se incubaron diferentes concentraciones del aptámero 769 en una proporción 1:8 en volumen con respecto al medio de cultivo DMEM y se incubó a 37 °C durante 0, 24, 48 y 72 h. Las muestras se cuantificaron por qPCR y se graficó como porcentaje de recuperación del aptámero con respecto al tiempo 0. Cada grupo de datos representa la media \pm DE (n = 3).

Evaluación del comportamiento de los aptámeros en presencia de la proteína blanco en cultivo celular

Se evaluó la localización del aptámero en células Vero en presencia de su proteína blanco, mediante microscopia de fluorescencia. Los aptámeros (en presencia de proteína H1) se incubaron con células Vero durante 24 y 72 h, y posteriormente, las células se fijaron para observar la localización de los aptámeros. Se observó que los aptámeros en presencia de la hemaglutinina se concentraron en puntos focales específicos, mientras que la localización del aptámero sin la proteína parece estar dispersa en la membrana celular, tanto a las 24 (figura 50) como a las 72 h (figura 51). No se observó que la señal del aptámero se localizaba con el núcleo por lo que es posible que los aptámeros no se

estén internalizando. Cabe mencionar que para asegurar que los aptámeros se unen a la membrana aún se requieren realizar más ensayos.

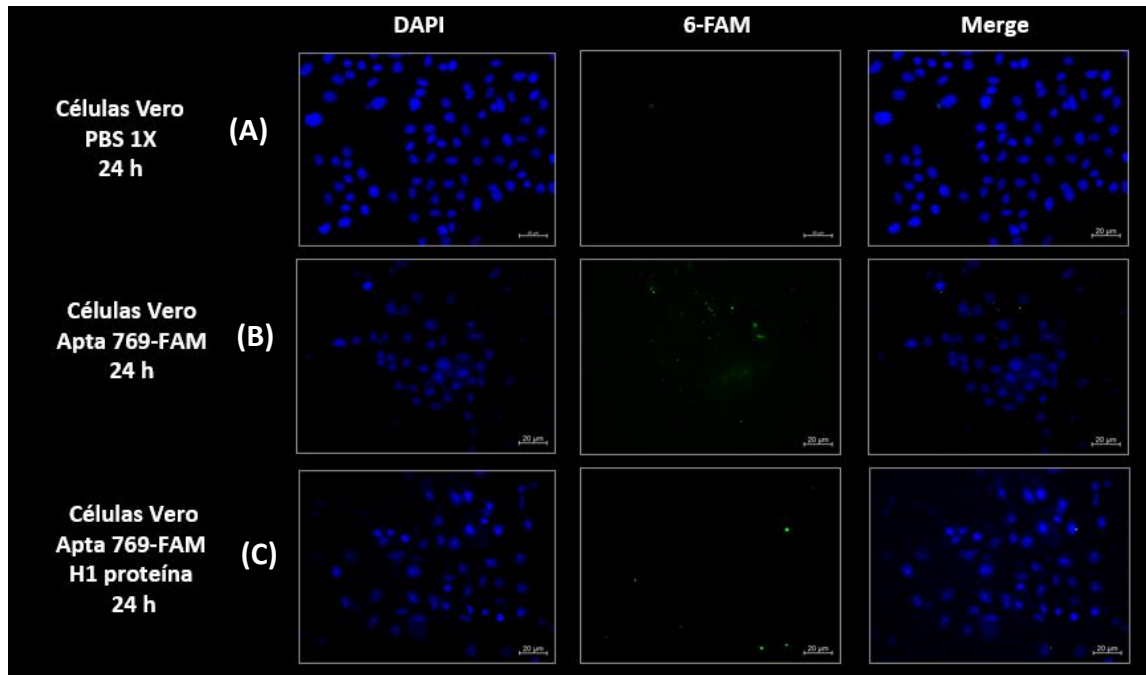


Figura 50. Micrografías de fluorescencia. (A) células Vero después de incubar 24 h con (B) Apta 769-FAM (1000 nM) y con (C) Apta 769-FAM y proteína H1 (500 ng). Las muestras se examinaron en el canal verde para observar FAM y los núcleos teñidos con DAPI, se observaron en el canal azul. Barra de escala, 20 µm.

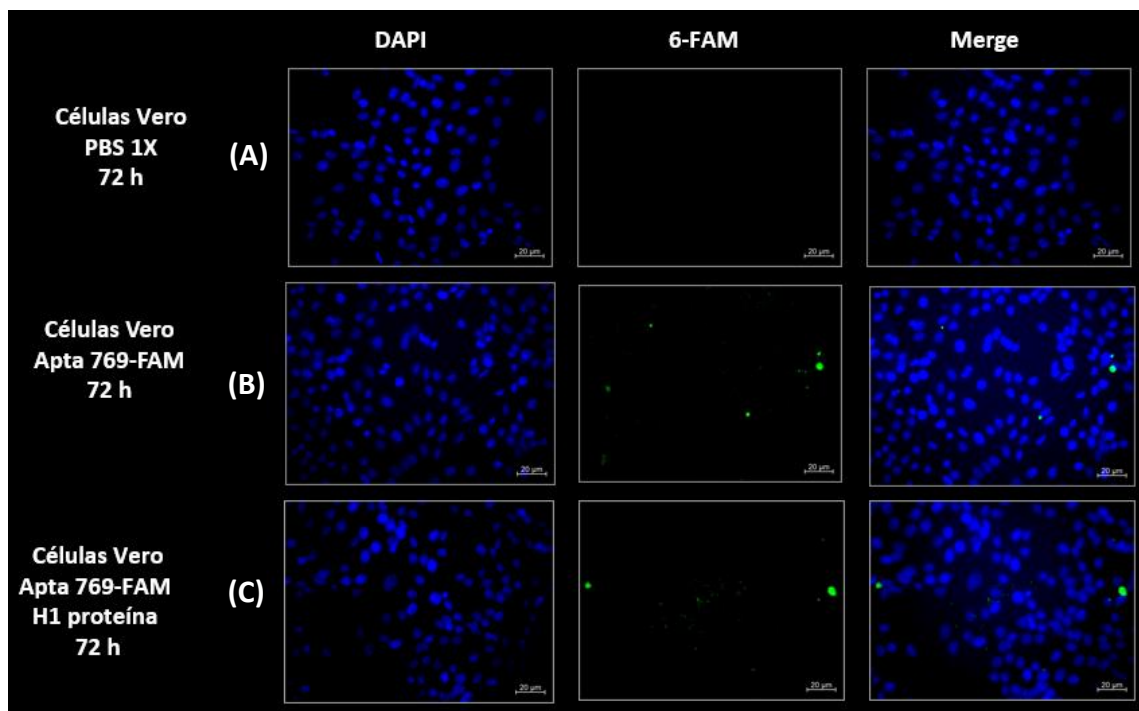


Figura 51. Micrografías de fluorescencia. (A) células Vero después de incubar 72 h con (B) Apta 769-FAM (1000 nM) y con (C) Apta 769-FAM y proteína H1 (500 ng). Las muestras se examinaron en el canal verde para observar FAM y los núcleos teñidos con DAPI, se observaron en el canal azul. Barra de escala, 20 μ m.

Caracterización de la biblioteca por qPCR

Para caracterizar la biblioteca diseñada para la obtención de aptámeros candidatos se realizó la cuantificación de ssDNA recuperado después de cada ronda de selección positiva por qPCR. Para la cuantificación se diseñó una curva estándar con concentraciones conocidas de la biblioteca en ssDNA. Los resultados se graficaron (ver figura 52) y se obtuvo la siguiente ecuación de la recta, con una R^2 de 0.9751:

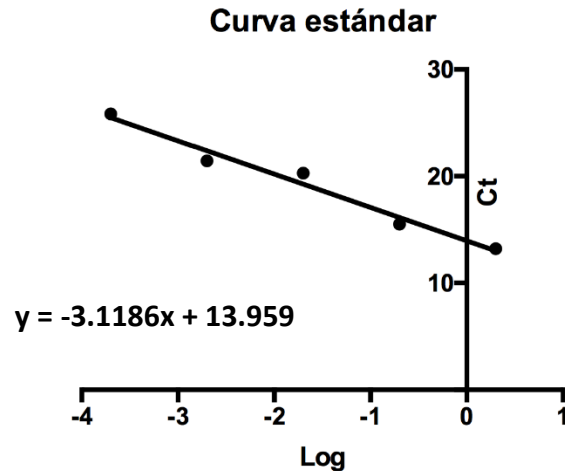


Figura 52. Curva estándar para la cuantificación de secuencias por qPCR. Se graficaron los Ct de diluciones lineales de la biblioteca en ssDNA de 2-0.0002 pg vs. el log base 10 de las diluciones. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

Para la cuantificación de ssDNA recuperado en cada ronda de selección, se realizaron diluciones de cada muestra recuperada, se obtuvieron los Ct y con la ecuación de la recta de la curva estándar se obtuvieron los valores del ssDNA recuperado para cada SELEX. Se observó que en el SELEX para H1 la cantidad de ssDNA recuperado disminuyó gradualmente durante las rondas alcanzando el menor valor en la ronda 4 (figura 53A). En el SELEX para RBD se observó una disminución en la recuperación de secuencias conforme pasaron las rondas de selección, sin embargo, se observó un aumento en la recuperación de ssDNA a partir de la ronda 4 (figura 53B).

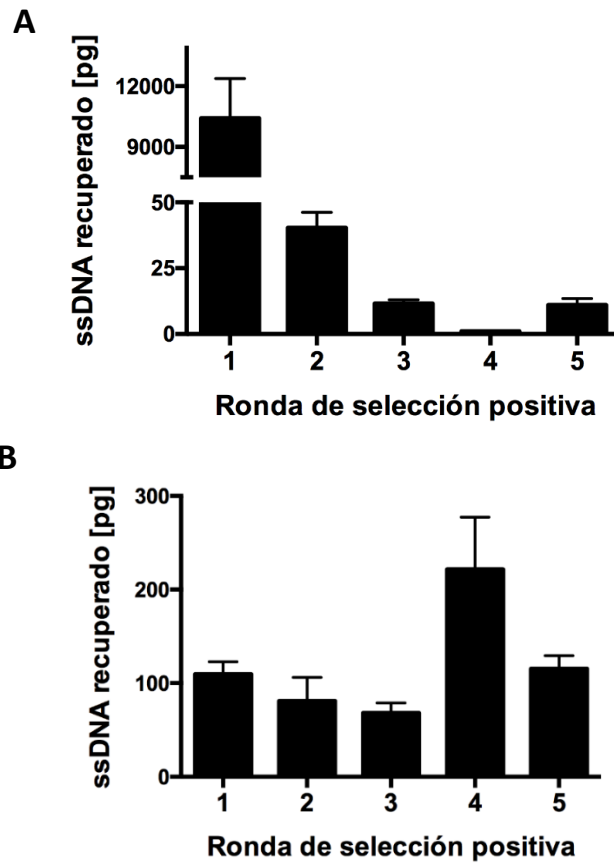


Figura 53. Cuantificación de ssDNA recuperado durante el SELEX. (A) Recuperación de secuencias en el SELEX H1 y (B) Recuperación de secuencias en el SELEX RBD.

CAPÍTULO 5

Discusión

A nivel mundial, la vigilancia de los brotes de virus emergentes ha sido de suma importancia debido al número creciente de casos infectados y a la gravedad de la presentación clínica que puede ocurrir durante la infección aguda en humanos y animales. La creación de hábitats ideales para la reproducción de los vectores transmisores y la transmisión rápida de estos virus amenaza constantemente la salud pública y se requiere de herramientas de seguimiento para la prevención y contención de virus. En respuesta a esta necesidad de diagnóstico rápido y certero, en esta tesis diseñamos pruebas rápidas tipo POC que utilizan biosensores compuestos por nanopartículas de oro y anticuerpos para la detección de virus de RNA como herramientas rápidas, de fácil uso y de bajo costo.

En esta tesis, se diseñaron dos biosensores con aplicación en nanotecnología. El biosensor contra flavivirus se elaboró mediante la funcionalización de nanopartículas de oro esféricas de 60 nm con anticuerpos anti-flavivirus por conjugación de adsorción pasiva. Los biosensores contra SARS-CoV-2 se elaboraron mediante la funcionalización de nanopartículas de oro esféricas de 40 nm con anticuerpos anti-RBD y anti-Spike a través de conjugación por enlaces covalentes. Se ha establecido que factores en la AuNP como el tamaño y la forma son cruciales para determinar la sensibilidad de la detección. En cuanto al tamaño, se ha reportado que las AuNPs con tamaños entre 20 y 40 nm son las más utilizadas para la detección en LFA (Kim et al., 2016; Lou et al., 2012). Sin

embargo, en un estudio reciente en 2017 por Zhan y colaboradores (Zhan et al., 2017), compararon AuNPs de 40, 60 y 100 nm, observando que eran capaces de mejorar la sensibilidad analítica hasta 256 veces cuando usaban AuNPs de 60 y 100 nm para la formación del biosensor con anticuerpos, esto se debe a que, a mayor tamaño, mayor área de superficie disponible para unirse a los anticuerpos y mejorar la detección del analito. Con respecto a esto, nosotros decidimos probar las AuNPs de 40 y 60 nm para el diseño de los biosensores y así evaluar el mejor sistema para la obtención de biosensores funcionales y sensibles para la detección de virus en pruebas de flujo lateral. Otros autores han utilizado y evaluado la funcionalidad de las AuNPs de 40-60 nm para el desarrollo de biosensores para su uso en LFA (X. Chen et al., 2022; Cui et al., 2015).

En cuanto a la forma, las AuNPs esféricas se han utilizado ampliamente en la detección de analitos, en pruebas LFA, debido a sus propiedades, propiedades ópticas y fisicoquímicas únicas, alta biocompatibilidad, monocapa modificable, dispersión controlada, alta área de superficie para funcionalización con elementos de detección, baja toxicidad, alta estabilidad y su característico color rojo que permite la detección directa de formaciones complejas sin necesidad de equipos de lectura extra.

Por otro lado, el anticuerpo utilizado para la formación del biosensor contra flavivirus (anticuerpo 4G2) ha sido ampliamente utilizado en ensayos de detección de flavivirus y recientemente se ha utilizado como control en ensayos de neutralización del virus del dengue (Durham et al., 2019) y en la inmunodetección de Zika (Vicenti et al., 2020). Su especificidad de unión a la proteína E de virus de la familia *flaviviridae* como el Dengue (los 4 serotipos incluidos el serotipo 2 utilizados en este trabajo) (Kurosu et al., 2020;

Rajamanonmani et al., 2009), Zika (Berneck et al., 2020), virus del Nilo Occidental (Hunt et al., 2002) y virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) (Agudelo et al., 2021) ha sido reportado por varios autores a lo largo del tiempo, por lo que su uso ha sido validado y es altamente sensible para utilizarlo como parte del sistema de detección. Los anticuerpos Spike y RBD utilizados para la formación de los biosensores para la detección de SARS-CoV-2 han sido utilizados para el estudio de este virus por diferentes grupos de investigación desde el 2020, ya sea para la detección de la proteína recombinante sobreexpresada en cultivo celular mediante western blot como en ensayos de neutralización, por lo que ya se encuentran validados (Rajasekharan et al., 2021; Rothen et al., 2022; Hebang Yao et al., 2021; Yu et al., 2022).

Para asegurar la funcionalización de las AuNPs con los anticuerpos, los biosensores se sometieron a diversas pruebas de caracterización fisicoquímica. Los resultados se compararon con las nanopartículas sin recubrimiento (AuNP CIT) o con el biosensor control (AuNPs funcionalizadas con la proteína BSA), obteniendo diferencias entre las propiedades de los biosensores, para establecer un patrón de control en la conjugación. En primer lugar, se determinaron las condiciones óptimas para la conjugación de las AuNPs por adsorción pasiva para la formación de los biosensores contra flavivirus, usando una concentración establecida de anticuerpo anti-flavivirus 4G2 (10 µg/mL), variando el pH de la solución de las AuNPs justo antes de colocar el anticuerpo durante el protocolo de conjugación. En estudios previos, se informó que el pH durante la conjugación determina la orientación de unión de los anticuerpos en las AuNP y puede influir en el recubrimiento óptimo de su superficie (Ruiz et al., 2019). Para optimizar el

protocolo de conjugación por adsorción pasiva, se determinó la estabilidad de cada biosensor formado a diferentes valores de pH mediante la prueba GAT. Se estableció que el pH óptimo para estos conjugados era 6, donde se observó una menor agregación de las AuNP en presencia de sales. El correcto recubrimiento de las AuNPs asegura su estado monodisperso que favorece la captación del antígeno por el biosensor y la formación de complejos individuales AuNP-anticuerpo-antígeno, que pueden ser utilizados en la LFA o en otros sistemas de detección. Para la formación de los biosensores para la detección de SARS-CoV-2 se siguió el protocolo establecido por la casa comercial (Abcam) usando 1 µg de anticuerpo.

Se ha reportado que el uso de una alta concentración de anticuerpo para recubrir la superficie de las AuNPs, si bien estabiliza la nanopartícula y aumenta la probabilidad de una correcta orientación de los anticuerpos en la superficie, también puede causar la inaccesibilidad de los anticuerpos debido a los efectos de superposición y, por tanto, podría comprometer su funcionalidad para detectar el antígeno una vez unido a la superficie (Saha et al., 2014).

Por lo tanto, una vez que se optimizó el protocolo de conjugación, se determinó la concentración óptima de anticuerpo requerida para la formación del biosensor. Para ello, se probaron tres concentraciones diferentes de anticuerpo (1, 3 y 6 µg/mL) para la formación de los biosensores. Cada biosensor se caracterizó y se analizó su estabilidad por parámetros fisicoquímicos y su resistencia a la agregación por la prueba GAT.

Se observó que en los tres biosensores AuNP-4G2 obtenidos (a las diferentes concentraciones de anticuerpo), el barrido espectral en el rango UV-visible, presentó un

desplazamiento en el pico máximo de absorbancia en comparación con las AuNPs sin recubrir. Este cambio en el pico máximo de absorbancia de los biosensores se ha reportado previamente como indicativo de la adsorción de los anticuerpos en la superficie de las AuNPs formando una monocapa (Tsai et al., 2011). Los biosensores para detectar SARS-CoV-2 no mostraron un cambio en el pico máximo de absorbancia con respecto a los biosensores control (AuNPs recubiertas con BSA). Se ha reportado previamente que las nanopartículas recubiertas por moléculas que evitan la agregación y estabilizan a las nanopartículas en estado coloidal como BSA o PEG (presentes en el buffer de preparación) también presentan un cambio en el pico máximo de absorbancia (Nghiem et al., 2010; Nicoară et al., 2019), por lo que, el cambio entre el biosensor control y el recubierto con el anticuerpo pudiera no ser tan evidente.

Como parte de la caracterización, se determinó el diámetro hidrodinámico de los biosensores por DLS. En los biosensores para detectar flavivirus se observó un aumento en el diámetro hidrodinámico (tamaño relativo) proporcional al aumento en el anticuerpo utilizado para la conjugación, lo que indica que, a mayor concentración de anticuerpo, aumentó la formación de la monocapa en las AuNPs. Sin embargo, cuando se agregaron 6 $\mu\text{g/mL}$ del anticuerpo, se observó una disminución en el diámetro hidrodinámico. Este resultado puede indicar la sobresaturación del anticuerpo en la superficie de las AuNPs donde, a concentraciones más altas de anticuerpo, existe competencia o impedimento estérico para la unión a la superficie. En cuanto a los biosensores para la detección de SARS-CoV-2 únicamente el biosensor Spike presentó un aumento significativo en el diámetro hidrodinámico con respecto al control. Esto pudiera

deberse a que el anticuerpo RBD presenta un tamaño superficial parecido a la proteína BSA en la superficie.

Otros parámetros, como el potencial Z y el índice de polidispersidad de los conjugados, se compararon entre los biosensores con anticuerpo, biosensores control y las AuNP sin recubrir. En los biosensores para la detección de flavivirus, se observó un aumento significativo en el potencial Z que coincide con la adición de anticuerpos en la superficie de las AuNPs al funcionalizarse, lo que sugiere que la carga negativa que posee la superficie de las AuNP disminuyó a medida que se formaron enlaces iónicos entre las AuNPs y el anticuerpo. En los biosensores para la detección de SARS-CoV-2 no se observó diferencia significativa entre el valor del potencial Z del control y de los biosensores con anticuerpo. Para complementar la caracterización y determinar la estabilidad de los biosensores, se realizó una prueba de agregación de oro (GAT). Esta prueba midió la estabilidad de los biosensores en solución salina (20% NaCl), poniendo a prueba el correcto recubrimiento de la nanopartícula con los anticuerpos. Los biosensores para la detección de flavivirus no presentaron una diferencia significativa entre la estabilidad del biosensor con 3 y 6 $\mu\text{g/mL}$ (valores GAT menores a 0.02), indicando que a partir de 3 $\mu\text{g/mL}$ la superficie de las AuNPs tiene una monocapa de anticuerpos que evita la agregación. Estos ensayos han sido realizados por otros autores con el fin de determinar la concentración mínima de anticuerpos para el recubrimiento de las AuNPs (Bunsanong et al., 2018; Parolo et al., 2013). Los biosensores para detectar SARS-CoV-2 no presentaron diferencia significativa en comparación con el biosensor control cuando la agregación se midió en presencia de PBS (buffer de corrida de las LFAs). Sin embargo,

cuando la agregación se midió en presencia de agua los biosensores con anticuerpo presentaron menor agregación que el biosensor control. Esto puede deberse a las fuerzas iónicas que presenta el PBS en la superficie de las AuNPs, lo que favorece la agregación entre nanopartículas. Este fenómeno se reportó por Du y colab. en el 2012, donde se observó mayor agregación y tamaño de las AuNPs (medidas por DLS) cuando fueron diluidas en PBS en comparación de cuando fueron diluidas en agua (Du et al., 2012).

Según sus características y los valores de agregación, el biosensor que se usó para ensamblar las LFAs para la detección de DENV fue el de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De los biosensores SARS-CoV-2, se decidió probar ambos biosensores para ensamblar las LFAs para la detección de la proteína RBD, a pesar de que el anticuerpo RBD y el aptámero pudieran competir entre ellos para la unión con el epítipo del antígeno.

La LFA diseñada en esta tesis para la detección de DENV se ensambló con el biosensor 4G2-AuNP (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) utilizando un formato competitivo para identificar el DENV y otros flavivirus. Este formato se basa en que el antígeno inmovilizado presente en la zona de detección compite con el antígeno de la muestra para unirse al biosensor. Sin embargo, inicialmente diseñamos ambos formatos, directo o tipo sándwich y tipo competitivo utilizando el mismo biosensor, donde en condiciones similares no conseguimos la detección del DENV en el formato tipo sándwich. De acuerdo a la literatura, el formato tipo sándwich se usa típicamente para analitos más grandes con múltiples sitios antigénicos, usando diferentes anticuerpos en el diseño de la LFA (Raeisossadati et al., 2016).

El primer diseño de LFA para la detección de DENV fue tipo sándwich, utilizando el mismo anticuerpo para la funcionalización de las AuNPs, como para los elementos inmovilizados en la membrana de detección. En las pruebas de funcionalidad realizadas, no pudimos observar ninguna señal en la zona de prueba cuando agregamos DENV con el buffer de corrida (PBS), sin embargo, sí se observó señal en la zona de control, lo que indicó que la muestra migró correctamente a través del LFA, pero no fue posible la detección del antígeno. Para que el LFA para DENV fuera funcional y detectara el analito, cambiamos los tratamientos de cada almohadilla con el objetivo que la detección mejorara, sin embargo, después de varios intentos de optimización, no hubo ningún resultado positivo. Existen múltiples trabajos donde se utiliza el formato sándwich en las LFAs para la detección viral, sin embargo, en el sistema de detección de DENV usando un solo anticuerpo (anti-flavivirus 4G2) reportado en esta tesis no funcionó.

Luego, con el mismo biosensor y el DENV como analito inmovilizado en la zona de prueba, se diseñó una LFA con formato competitivo. Posteriormente, la LFA competitiva se probó *in vitro* para determinar su funcionalidad con muestras de DENV y con buffer de corrida (PBS). Se observó que en un lote de LFAs, cuando la muestra DENV positiva se colocaba en la prueba, generaba una señal en la ventana de detección, lo que permitía identificar que el virus se estaba uniendo al biosensor impidiendo la unión al virus inmovilizado en la membrana. Las LFAs en las que solo se analizó el buffer de corrida PBS mostraron dos señales que indicaban que el biosensor se unía al antígeno inmovilizado en la membrana y, por lo tanto, indicaban un verdadero negativo. La LFA competitiva diseñada con el biosensor 4G2-AuNP permitió la detección de DENV *in vitro*, sin

embargo, cabe mencionar que esta prueba puede detectar varios flavivirus debido a la naturaleza del anticuerpo (anti-flavivirus 4G2) utilizado para la formación del biosensor, por lo que podría incluirse como una opción accesible para el monitoreo no solo de DENV si no de flavivirus en general.

Para la detección de DENV, el biosensor que se utilizó en la LFA contenía ~ 0.2 mg/mL de nanopartículas de oro. Se ha reportado que la concentración de AuNPs puede mejorar la detección del analito en las LFAs. Sin embargo, un estudio reciente publicado por Khlebtsov y cols, en 2019 (Khlebtsov et al., 2019), indica que si bien es cierto que la señal obtenida en la zona de prueba disminuye a medida que disminuye el número de partículas aplicadas, la cantidad de señal observada en la zona de prueba y el límite de detección LFA (LOD) está determinado principalmente por la absorción de luz de las partículas utilizadas (que también depende de su tamaño y forma).

Los resultados encontrados en este trabajo sitúan a estas LFAs como métodos alternativos y factibles para la detección de patógenos sobre el vector transmisor y en el humano. En 2018, Basso y cols. (Basso et al., 2018) generaron un sistema de detección de DENV similar (serotipos 1-4) utilizando un biosensor con nanopartículas recubiertas de anticuerpos, determinando la presencia del virus a través de los cambios fisicoquímicos observados en la nanopartícula. A pesar de sus ventajas, la desventaja de este método en comparación con el nuestro, es el equipo especializado que se requiere para el análisis de cada muestra, por lo que no es factible como prueba de campo, en comparación con nuestra prueba que es portátil y no se necesita equipo de lectura.

Otros métodos basados en biosensores compuestos por AuNPs recubiertas con otras moléculas, como las DNAsimas (Carter et al., 2013), se han utilizado para la identificación de arbovirus en el mosquito transmisor, sin embargo, estos suelen ser complejos de producir (y por lo tanto costosos) y requieren un ambiente favorable para el desarrollo de la reacción, lo que dificulta su manejo en un ambiente no controlado.

En cuanto al límite de detección, los autores suelen reportar este parámetro en diferentes unidades de medida, obteniendo el valor a través de una curva de calibración.

En esta tesis, usamos una solución de antígeno basada en el virus completo que se cuantificó mediante el método TCID₅₀, mientras que la mayoría de los otros sistemas de detección usan proteínas purificadas o copias del genoma. Bajo las condiciones reportadas, nuestro sistema tiene un límite de detección estimado de 5.12×10^2 PFU. Este valor estimado se basó en el rendimiento de la prueba cuando usamos muestras de virus diluidas, lo que demuestra que el LFA funcionó solo cuando agregamos la muestra sin diluir (consulte el material complementario SI). Cuando se probó la LFA con diluciones 1:10 del DENV se obtenían resultados negativos, sugiriendo que las concentraciones de antígeno analizadas en las pruebas de funcionalidad están cerca del límite de detección de la prueba.

La LFA diseñada presenta un límite de detección comparable al de otras pruebas basadas en anticuerpos, como el observado en el sistema de detección del virus de la influenza resistente que detecta la proteína neuraminidasa del virus con un LoD de 5×10^2 PFU (Ryu et al., 2018) o el sistema de flujo lateral diseñado para detectar la proteína Spike SARS-CoV-2 que mostró un límite de detección (a simple vista) de 6×10^2 PFU (Ren &

Irudayaraj, 2021). Como era de esperar, el límite de detección de los sistemas basados en anticuerpos es inferior al de las pruebas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, que pueden alcanzar un límite de detección de 2×10^2 PFU (Yrad et al., 2019). Entre las ventajas de las pruebas de detección desarrolladas en formato de flujo lateral, están su facilidad de uso y los mínimos pasos de manipulación de muestras, lo que es favorable si se usan fuera de un laboratorio. La prueba de funcionalidad, mostró que los resultados no se modifican con respecto al tiempo, conservando las señales en la ventana de detección lo que puede ser útil para capturar los resultados después de la realización de la prueba. Las lecturas a simple vista permitirán el monitoreo de los RNA virus sin la necesidad de un equipo especializado, haciendo que este método sea accesible para las regiones de bajos ingresos.

Consideramos a estos prototipos como unos sistemas LFA accesibles y fáciles de usar para la detección del virus del dengue y otros flavivirus, pero es necesario incluir otros estudios para determinar la sensibilidad y especificidad. Se requieren pruebas de funcionalidad del LFA con muestras de mosquitos y optimizar y mejorar este LFA para usar este LFA como una herramienta de monitoreo de vectores. Entre las mejoras y optimizaciones del diseño, se podrían probar diferentes anticuerpos para determinar si el formato sándwich puede mejorar el límite de detección y el rendimiento del LFA.

Como herramienta alternativa para la detección de SARS-CoV-2, en este trabajo también se desarrollaron y caracterizaron dos biosensores basados en AuNPs y anticuerpos, que detectan a la proteína RBD recombinante de este virus. Adicionalmente, con estos

biosensores, se diseñó un sistema de detección POC tipo dot blot para la detección de SARS-CoV-2. Durante la caracterización fisicoquímica de los biosensores, no se encontró diferencias entre los biosensores con el anticuerpo anti-RBD y anti-Spike en comparación con el biosensor control (AuNP-BSA). El diseño del dot blot consistió en utilizar a los biosensores como marcadores de detección del sistema, donde según lo probado, estos biosensores pueden detectar 100 a 300 ng de la proteína recombinante RBD. Diversos autores han reportado el desarrollo de pruebas rápidas principalmente electroquímicas y ópticas, compuestas de biosensores basadas en AuNP y anticuerpos para el diagnóstico de COVID-19 (Karakuş et al., 2021; G. Li et al., 2021; Roberts et al., 2021). Como primer paso para validar el funcionamiento de los biosensores en sistemas de detección, se realizan pruebas de dot blot, donde se determina la especificidad con el antígeno a detectar, la estabilidad y desempeño del biosensor en presencia de diferentes agentes de la muestra, entre otros. Los biosensores diseñados en esta tesis podrían ser utilizados para el diseño de pruebas colorimétricas rápidas para la detección de SARS-CoV-2, sin embargo, aún se requieren diversas pruebas para determinar el límite de detección del biosensor, entre otros parámetros de validación analítica.

Por otra parte, con el fin de mejorar el diagnóstico y diferenciación entre virus respiratorios, en esta tesis se diseñó un sistema de detección tipo ELONA basado en la identificación de proteínas virales utilizando aptámeros. Como primer paso, se diseñaron y caracterizaron aptámeros específicos contra la proteína hemaglutinina del virus de la

influenza A y contra la proteína RBD del virus SARS-CoV-2, como se describió anteriormente en este trabajo.

La selección de los aptámeros se realizó en diversas rondas de selección y amplificación positiva (con las proteínas blanco) y negativa (con otras proteínas) para que los aptámeros candidatos pudieran diferenciar entre la proteína RBD del SARS-CoV-2 y la proteína Hemaglutinina del virus de la influenza (H1N1). Como resultado se obtuvieron 10 secuencias candidatas que se probaron mediante dot blot para determinar su especificidad. Se determinó que únicamente una secuencia llamada aptámero 769 se unió específicamente a la proteína HA, sin embargo, ninguna secuencia se unió específicamente a la proteína RBD. La afinidad del aptámero 769 se determinó por ensayos de ELONA obteniéndose un valor de K_d de 68.2 nM para la proteína hemaglutinina de la cepa A/California/04/2009.

Diversos trabajos en los últimos años (Parekh et al., 2010; R. Wang et al., 2013; Zavyalova & Kopylov, 2016) han reportado el diseño de aptámeros específicos contra la proteína Hemaglutinina (HA) de diferentes cepas del virus de la influenza A, como Shiratori y cols. que reportaron al aptámero RHA000 con un valor de K_d de 24.7 nM (Shiratori et al., 2014) que reconoce a la proteína hemaglutinina de la cepa A/Anhui/1/2005 y Li y cols que diseñaron y caracterizaron al aptámero 1 con un valor de K_d de 78 nM que se une a la proteína hemaglutinina pero de la cepa A/Puerto Rico/8/1934 (W. Li et al., 2016). El aptámero 769 diseñado en esta tesis mostro una alta afinidad a la proteína HA y se encuentra dentro del rango de afinidad nanomolar.

Como parte de la caracterización, se determinó la posible estructura secundaria del aptámero 769 por medio del software mFold. Las predicciones estructurales presentaron estructuras tallo-asa, que han sido reportadas en otros aptámeros específicos contra hemaglutinina (Musafia et al., 2014; Woo et al., 2015). Además, dentro de la secuencia se encontraron motivos repetidos compuestos de Guaninas que pudieran actuar como secuencias protectoras contra la acción de las nucleasas, indicando que el aptámero pudiera mostrar una excelente estabilidad (Roxo et al., 2019).

Los ensayos tipo ELONA son los métodos de detección basados en aptámeros mejor establecidos para la detección óptica de diferentes virus. Es por ello, que con el aptámero 769, se diseñó y elaboro un sistema de detección tipo ELONA que permitió la detección específica de la proteína recombinante hemaglutinina, determinándose un LoD de 6.8 ng para este sistema. Diferentes grupos de investigación han diseñado ensayos ELONA con aptámeros para la detección de Influenza A H1N1, reportándose en estos sistemas límites de detección en nanogramos (Shiratori et al., 2014; Z. Wang et al., 2022), por lo que nuestro sistema es comparable a nivel de detección con esos sistemas.

El uso de aptámeros en sistemas de detección viral resuelve algunas desventajas del uso de anticuerpos en los inmunoensayos, como diferencia de afinidad entre lotes, inestabilidad a diferentes temperaturas o pH, altos costos entre otras. El ELONA presentado en este trabajo está diseñado con un aptámero que discrimina entre hemaglutinina y la proteína RBD del virus SARS-CoV-2, por lo que este sistema de detección pudiera ayudar en el diagnostico de enfermedades respiratorias causadas por

estos virus, sin embargo, aún se requieren de diversas pruebas de sensibilidad y especificidad con muestras de pacientes para usarlas en el entorno clínico.

CAPÍTULO 6

Conclusiones

En esta tesis se diseñaron tres sistemas de detección rápidos para la detención de virus emergentes de RNA.

1. Como parte del primer sistema de detección, se diseñaron y caracterizaron tres bionanosensores compuestos de nanopartículas de oro de 60 nm y anticuerpos anti-flavivirus para la detección del virus del Dengue y un bionanosensor control (nanopartícula-BSA).
2. El bionanosensor AuNP-4G2 [3µg] se utilizó para el diseño de una prueba de flujo lateral competitiva basada en papel para la detección del virus de dengue. La funcionalidad de la LFA diseñada se determinó *in vitro* con virus aislados de cultivo celular, con un LOD de 5.06×10^2 PFU.

3. Como parte del segundo sistema de detección, se diseñaron dos biosensores compuestos por nanopartículas de oro de 40 nm y anticuerpos que reconocen al dominio S1 de la proteína Spike SARS-CoV-2. Estos biosensores se caracterizaron fisicoquímicamente, sin mostrar ninguna diferencia en comparación con las nanopartículas control. Sin embargo, se demostró la funcionalidad de los biosensores en ensayos de especificidad por dot blot detectándose de 100-300 ng de la proteína RBD del SARS-CoV-2.
4. Como parte del tercer sistema de detección diseñado, se estandarizó la obtención y caracterización (*in vitro* e *in silico*) de aptámeros a partir de una biblioteca de DNA aleatorizada de 70 nt. Se obtuvo un aptámero candidato (aptámero 769) que reconoce específicamente a la proteína hemaglutinina del virus de la influenza A H1N1 cepa A/California/04/2009 con una alta afinidad (Kd 68.2 nM). Este aptámero se utilizó para desarrollar un sistema de detección tipo ELONA para la detección *in vitro* de influenza A (H1N1), que presentó un LoD de 6.8 ng.

Bibliografia

- Agudelo, M., Palus, M., Keeffe, J. R., Bianchini, F., Svoboda, P., Salát, J., Peace, A., Gazumyan, A., Cipolla, M., & Kapoor, T. (2021). Broad and potent neutralizing human antibodies to tick-borne flaviviruses protect mice from disease. *Journal of Experimental Medicine*, 218(5), e20210236.
- Ahmad, A., Fawaz, M. A. M., & Aisha, A. (2022). A comparative overview of SARS-CoV-2 and its variants of concern. *Le Infezioni in Medicina*, 30(3), 328.
- Alaqad, K., & Saleh, T. A. (2016). Gold and silver nanoparticles: synthesis methods, characterization routes and applications towards drugs. *J. Environ. Anal. Toxicol*, 6(4), 525–2161.
- Babendure, J. R., Adams, S. R., & Tsien, R. Y. (2003). Aptamers switch on fluorescence of triphenylmethane dyes. *Journal of the American Chemical Society*, 125(48), 14716–14717.
- Bagalkot, V., Farokhzad, O. C., Langer, R., & Jon, S. (2006). An aptamer–doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(48), 8149–8152.
- Bahadır, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2016). Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, 286–306.
- Bai, C., Zhong, Q., & Gao, G. F. (2022). Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Science China Life Sciences*, 65(2), 280–294.
- Baldo, V., Bertoncetto, C., Cocchio, S., Fonzo, M., Pillon, P., Buja, A., & Baldovin, T. (2016). The new pandemic influenza A/(H1N1) pdm09 virus: is it really "new"?

Journal of Preventive Medicine and Hygiene, 57(1), E19.

Barfield, C. A., Barney, R. S., Crudder, C. H., Wilmoth, J. L., Stevens, D. S., Mora-Garcia, S., Yanovsky, M. J., Weigl, B. H., & Yanovsky, J. (2010). A highly sensitive rapid diagnostic test for Chagas disease that utilizes a recombinant *Trypanosoma cruzi* antigen. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 58(3), 814–817.

Basso, C. R., Tozato, C. C., Crulhas, B. P., Castro, G. R., Junior, J. P. A., & Pedrosa, V. A. (2018). An easy way to detect dengue virus using nanoparticle-antibody conjugates. *Virology*, 513, 85–90.

Berezhnoy, A., Brenneman, R., Bajgelman, M., Seales, D., & Gilboa, E. (2012). Thermal stability of siRNA modulates aptamer-conjugated siRNA inhibition. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 1, e51.

Berneck, B. S., Rockstroh, A., Fertey, J., Grunwald, T., & Ulbert, S. (2020). A recombinant Zika virus envelope protein with mutations in the conserved fusion loop leads to reduced antibody cross-reactivity upon vaccination. *Vaccines*, 8(4), 603.

Bhatia, S. (2016). Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. In *Natural polymer drug delivery systems* (pp. 33–93). Springer.

Bosak, A., Saraf, N., Willenberg, A., Kwan, M. W. C., Alto, B. W., Jackson, G. W., Batchelor, R. H., Nguyen-Huu, T. D., Sankarapani, V., & Parks, G. D. (2019). Aptamer–gold nanoparticle conjugates for the colorimetric detection of arboviruses and vector mosquito species. *RSC Advances*, 9(41), 23752–23763.

- Bretnall, A. E., & Clarke, G. S. (2011). Validation of analytical test methods. In *Separation Science and Technology* (Vol. 10, pp. 429–457). Elsevier.
- Bunsanong, N., Chotigeat, W., Deachamag, P., & Thananimit, S. (2018). Semiquantitative dot-blot immunogold assay for specific detection of white spot syndrome virus. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *65*(4), 586–593.
- Byrd-Leotis, L., Cummings, R. D., & Steinhauer, D. A. (2017). The interplay between the host receptor and influenza virus hemagglutinin and neuraminidase. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7), 1541.
- Cardoso, J. R., Pereira, L. M., Iversen, M. D., & Ramos, A. L. (2014). What is gold standard and what is ground truth? *Dental Press Journal of Orthodontics*, *19*, 27–30.
- Carrio, A., Sampedro, C., Sanchez-Lopez, J. L., Pimienta, M., & Campoy, P. (2015). Automated low-cost smartphone-based lateral flow saliva test reader for drugs-of-abuse detection. *Sensors*, *15*(11), 29569–29593.
- Carter, J. R., Balaraman, V., Kucharski, C. A., Fraser, T. S., & Fraser, M. J. (2013). A novel dengue virus detection method that couples DNAzyme and gold nanoparticle approaches. *Virology Journal*, *10*(1), 1–15.
- Centros para el control y la preevención de enfermedades. (2019). *Dengue: diagnóstico*. <https://www.cdc.gov/dengue/es/healthcare-providers/diagnosis.html#:~:text=Las pruebas de diagnóstico del,pruebas de diagnóstico del dengue>
- Chamorro-Garcia, A., De La Escosura-Muñiz, A., Espinoza-Castañeda, M., Rodriguez-

- Hernandez, C. J., De Torres, C., & Merkoçi, A. (2016). Detection of parathyroid hormone-like hormone in cancer cell cultures by gold nanoparticle-based lateral flow immunoassays. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *12*(1), 53–61.
- Chen, X., Kang, S., Ikbal, M. A., Zhao, Z., Pan, Y., Zuo, J., Gu, L., & Wang, C. (2022). Synthetic nanobody-functionalized nanoparticles for accelerated development of rapid, accessible detection of viral antigens. *Biosensors and Bioelectronics*, *202*, 113971.
- Chen, Y., Xianyu, Y., & Jiang, X. (2017). Surface modification of gold nanoparticles with small molecules for biochemical analysis. *Accounts of Chemical Research*, *50*(2), 310–319.
- Citartan, M. (2021). Aptamers as the powerhouse of dot blot assays. *Talanta*, *232*, 122436.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(2), 155–170.
- Cui, X., Huang, Y., Wang, J., Zhang, L., Rong, Y., Lai, W., & Chen, T. (2015). A remarkable sensitivity enhancement in a gold nanoparticle-based lateral flow immunoassay for the detection of Escherichia coli O157: H7. *Rsc Advances*, *5*(56), 45092–45097.
- de Lourdes Moreno, M., Cebolla, Á., Muñoz-Suano, A., Carrillo-Carrion, C., Comino, I., Pizarro, Á., León, F., Rodríguez-Herrera, A., & Sousa, C. (2017). Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals

transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing. *Gut*, 66(2), 250–257.

DGE. (2022a). *INFORME SEMANAL DE LA TEMPORADA DE INFLUENZA ESTACIONAL Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS- 2021-2022 SEMANA 2021-2022*.

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/727353/INFLUENZA_OVR_SE20_2022.pdf

DGE. (2022b). *PANORAMA EPIDEMIOLOGICO DE DENGUE. SEMANA EPIDEMIOLOGICA 47 DE 2022*.

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/781496/Pano_dengue_47_2022.pdf

Du, S., Kendall, K., Toloueinia, P., Mehrabadi, Y., Gupta, G., & Newton, J. (2012).

Aggregation and adhesion of gold nanoparticles in phosphate buffered saline.

Journal of Nanoparticle Research, 14(3), 1–14.

Durham, N. D., Agrawal, A., Waltari, E., Croote, D., Zanini, F., Fouch, M., Davidson, E.,

Smith, O., Carabajal, E., & Pak, J. E. (2019). Broadly neutralizing human antibodies against dengue virus identified by single B cell transcriptomics. *Elife*, 8, e52384.

Ealia, S. A. M., & Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification,

characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263(3), 32019.

Ellenbecker, M., Sears, L., Li, P., Lanchy, J.-M., & Lodmell, J. S. (2012). Characterization

of RNA aptamers directed against the nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus. *Antiviral Research*, 93(3), 330–339.

- Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, *346*(6287), 818–822.
- Gao, X., Zheng, P., Kasani, S., Wu, S., Yang, F., Lewis, S., Nayeem, S., Engler-Chiurazzi, E. B., Wigginton, J. G., & Simpkins, J. W. (2017). based surface-enhanced Raman scattering lateral flow strip for detection of neuron-specific enolase in blood plasma. *Analytical Chemistry*, *89*(18), 10104–10110.
- Ghosh, S. K., & Pal, T. (2007). Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications. *Chemical Reviews*, *107*(11), 4797–4862.
- Girard, M. P., Tam, J. S., Assossou, O. M., & Kieny, M. P. (2010). The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine*, *28*(31), 4895–4902.
- Gobeil, S. M.-C., Janowska, K., McDowell, S., Mansouri, K., Parks, R., Stalls, V., Kopp, M. F., Manne, K., Li, D., & Wiehe, K. (2021). Effect of natural mutations of SARS-CoV-2 on spike structure, conformation, and antigenicity. *Science*, *373*(6555), eabi6226.
- Gwyn, S., Mitchell, A., Dean, D., Mkocha, H., Handali, S., & Martin, D. L. (2016). Lateral flow-based antibody testing for *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Immunological Methods*, *435*, 27–31.
- Hamula, C. L. A., Zhang, H., Li, F., Wang, Z., Le, X. C., & Li, X.-F. (2011). Selection and analytical applications of aptamers binding microbial pathogens. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *30*(10), 1587–1597.
- Hao, R.-Z., Song, H.-B., Zuo, G.-M., Yang, R.-F., Wei, H.-P., Wang, D.-B., Cui, Z.-Q., Zhang, Z., Cheng, Z.-X., & Zhang, X.-E. (2011). DNA probe functionalized QCM biosensor

- based on gold nanoparticle amplification for *Bacillus anthracis* detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(8), 3398–3404.
- Holland, D. J. (1998). Emerging viruses. *Current Opinion in Pediatrics*, 10(1), 34–40.
- Holmes, E. C. (2009). The evolutionary genetics of emerging viruses. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 40, 353–372.
- Horstmann, D. M. (1970). *DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR VIRAL AND RICKETTSIAL INFECTIONS*. American Public Health Association.
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X., Xu, W., & Liu, S. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9), 1141–1149.
- Hudson, M., Stuchinskaya, T., Ramma, S., Patel, J., Sievers, C., Goetz, S., Hines, S., Menzies, E., & Russell, D. A. (2019). Drug screening using the sweat of a fingerprint: lateral flow detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cocaine, opiates and amphetamine. *Journal of Analytical Toxicology*, 43(2), 88–95.
- Humbert, C., Pluchery, O., Lacaze, E., Tadjeddine, A., & Busson, B. (2013). Optical spectroscopy of functionalized gold nanoparticles assemblies as a function of the surface coverage. *Gold Bulletin*, 46(4), 299–309.
- Hunt, A. R., Hall, R. A., Kerst, A. J., Nasci, R. S., Savage, H. M., Panella, N. A., Gottfried, K. L., Burkhalter, K. L., & Roehrig, J. T. (2002). Detection of West Nile virus antigen in mosquitoes and avian tissues by a monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 2023–2030.
- INEGI. (2022). *ESTADÍSTICA DE DEFUNCIONES REGISTRADAS DE ENERO A JUNIO DE*

2021.

<https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/dr/dr2021.pdf>

Institute of Computing Science, P. U. of T. (n.d.). *RNAComposer: automated RNA structure modeling server*. <http://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/>

Jensen, S. M., Nguyen, C. T., & Jewett, J. C. (2016). A gradient-free method for the purification of infective dengue virus for protein-level investigations. *Journal of Virological Methods*, 235, 125–130.

Jo, H., Gu, H., Jeon, W., Youn, H., Her, J., Kim, S.-K., Lee, J., Shin, J. H., & Ban, C. (2015). Electrochemical aptasensor of cardiac troponin I for the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Analytical Chemistry*, 87(19), 9869–9875.

Karakuş, E., Erdemir, E., Demirbilek, N., & Liv, L. (2021). Colorimetric and electrochemical detection of SARS-CoV-2 spike antigen with a gold nanoparticle-based biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 1182, 338939.

Khlebtsov, B. N., Tumskiy, R. S., Burov, A. M., Pylaev, T. E., & Khlebtsov, N. G. (2019). Quantifying the numbers of gold nanoparticles in the test zone of lateral flow immunoassay strips. *ACS Applied Nano Materials*, 2(8), 5020–5028.

Kim, D. S., Kim, Y. T., Hong, S. B., Kim, J., Heo, N. S., Lee, M.-K., Lee, S. J., Kim, B. II, Kim, I. S., & Huh, Y. S. (2016). Development of lateral flow assay based on size-controlled gold nanoparticles for detection of hepatitis B surface antigen. *Sensors*, 16(12), 2154.

Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*, 60(1),

111–120.

- Kondratov, I. G., Khasnatinov, M. A., Potapova, U. V., Potapov, V. V., Levitskii, S. A., Leonova, G. N., Pavlenko, E. V., Solovarov, I. S., Denikina, N. N., & Kulakova, N. V. (2013). Obtaining aptamers to a fragment of surface protein E of tick-borne encephalitis virus. *Dokl. Biochem. Biophys*, *448*, 19–21.
- Kulbachinskiy, A. V. (2007). Methods for selection of aptamers to protein targets. *Biochemistry (Moscow)*, *72*(13), 1505–1518.
- Kumar, S., Thambiraja, T. S., Karuppanan, K., & Subramaniam, G. (2022). Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: a comparative computational study of spike protein. *Journal of Medical Virology*, *94*(4), 1641–1649.
- Kurosu, T., Hanabara, K., Asai, A., Pambudi, S., Phanthanawiboon, S., Omokoko, M. D., Ono, K., Saijo, M., Ramasoota, P., & Ikuta, K. (2020). Chimeric flavivirus enables evaluation of antibodies against dengue virus envelope protein in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–13.
- Lai, S.-C., Huang, Y.-Y., Wey, J.-J., Tsai, M.-H., Chen, Y.-L., Shu, P.-Y., Chang, S.-F., Hung, Y.-J., Hou, J.-N., & Lin, C.-C. (2022). Development of Novel Dengue NS1 Multiplex Lateral Flow Immunoassay to Differentiate Serotypes in Serum of Acute Phase Patients and Infected Mosquitoes. *Frontiers in Immunology*, *13*.
- Lai, Y. H., Koo, S., Oh, S. H., Driskell, E. A., & Driskell, J. D. (2015). Rapid screening of antibody–antigen binding using dynamic light scattering (DLS) and gold nanoparticles. *Analytical Methods*, *7*(17), 7249–7255.
- Lee, L. G., Nordman, E. S., Johnson, M. D., & Oldham, M. F. (2013). A low-cost, high-

- performance system for fluorescence lateral flow assays. *Biosensors*, 3(4), 360–373.
- Li, Chao, Ma, J., Fan, Q., Tao, Y., & Li, G. (2016). Dynamic light scattering (DLS)-based immunoassay for ultra-sensitive detection of tumor marker protein. *Chemical Communications*, 52(50), 7850–7853.
- Li, Chen-zhong, Vandenberg, K., Prabhulkar, S., Zhu, X., Schneper, L., Methee, K., Rosser, C. J., & Almeida, E. (2011). Paper based point-of-care testing disc for multiplex whole cell bacteria analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(11), 4342–4348.
- Li, G., Wang, A., Chen, Y., Sun, Y., Du, Y., Wang, X., Ding, P., Jia, R., Wang, Y., & Zhang, G. (2021). Development of a colloidal gold-based immunochromatographic strip for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 spike protein. *Frontiers in Immunology*, 560.
- Li, W., Feng, X., Yan, X., Liu, K., & Deng, L. (2016). A DNA Aptamer Against Influenza A Virus: An Effective Inhibitor to the Hemagglutinin–Glycan Interactions. *Nucleic Acid Therapeutics*, 26(3), 166–172.
- Liu, Juanzu, Wang, J., Li, Z., Meng, H., Zhang, L., Wang, H., Li, J., & Qu, L. (2018). A lateral flow assay for the determination of human tetanus antibody in whole blood by using gold nanoparticle labeled tetanus antigen. *Microchimica Acta*, 185(2), 1–7.
- Liu, Juewen, Mazumdar, D., & Lu, Y. (2006). A simple and sensitive “dipstick” test in serum based on lateral flow separation of aptamer-linked nanostructures.

- Angewandte Chemie*, 118(47), 8123–8127.
- Long, G. L., & Winefordner, J. D. (1983). Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry*, 55(7), 712A-724A.
- Lorente-González, M., Suarez-Ortiz, M., & Landete, P. (2022). Evolution and clinical trend of SARS-CoV-2 variants. *Open Respiratory Archives*, 4(2), 100169.
- Lou, S., Ye, J., Li, K., & Wu, A. (2012). A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay: the influence of nanoparticulate size. *Analyst*, 137(5), 1174–1181.
- Matsishin, M., Rachkov, A., Lopatynskiy, A., Chegel, V., Soldatkin, A., & El'Skaya, A. (2017). Selective amplification of SPR biosensor signal for recognition of rpoB gene fragments by use of gold nanoparticles modified by thiolated DNA. *Nanoscale Research Letters*, 12(1), 1–6.
- Medley, C. D., Smith, J. E., Tang, Z., Wu, Y., Bamrungsap, S., & Tan, W. (2008). Gold nanoparticle-based colorimetric assay for the direct detection of cancerous cells. *Analytical Chemistry*, 80(4), 1067–1072.
- Michael W. Davidson and The Florida State University. (2015). *The Influenza (Flu) Virus*. <https://micro.magnet.fsu.edu/cells/viruses/influenzavirus.html>
- Mieszawska, A. J., Mulder, W. J. M., Fayad, Z. A., & Cormode, D. P. (2013). Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease. *Molecular Pharmaceutics*, 10(3), 831–847.
- Miranda, O. R., Li, X., Garcia-Gonzalez, L., Zhu, Z.-J., Yan, B., Bunz, U. H. F., & Rotello, V. M. (2011). Colorimetric bacteria sensing using a supramolecular enzyme–

- nanoparticle biosensor. *Journal of the American Chemical Society*, 133(25), 9650–9653.
- Moreno, M., García-Sacristán, A., Martín, M. E., & González, V. M. (2023). Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay (ELONA). In *Nucleic Acid Aptamers* (pp. 235–242). Springer.
- Musafia, B., Oren-Banaroya, R., & Noiman, S. (2014). Designing anti-influenza aptamers: Novel quantitative structure activity relationship approach gives insights into aptamer–virus interaction. *PLoS One*, 9(5), e97696.
- Nghiem, T. H. L., La, T. H., Vu, X. H., Chu, V. H., Nguyen, T. H., Le, Q. H., Fort, E., Do, Q. H., & Tran, H. N. (2010). Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 1(2), 25009.
- NIAID. (2022). *NIAID Emerging Infectious Diseases/Pathogens*.
<https://www.niaid.nih.gov/research/emerging-infectious-diseases-pathogens>
- Nicoară, R., Ilieș, M., Uifălean, A., Iuga, C. A., & Loghin, F. (2019). Quantification of the pegylated gold nanoparticles protein corona. influence on nanoparticle size and surface chemistry. *Applied Sciences*, 9(22), 4789.
- Nimjee, S. M., White, R. R., Becker, R. C., & Sullenger, B. A. (2017). Aptamers as therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57, 61–79.
- Nitsche, A., Kurth, A., Dunkhorst, A., Pänke, O., Sielaff, H., Junge, W., Muth, D., Scheller, F., Stöcklein, W., & Dahmen, C. (2007). One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX. *BMC Biotechnology*, 7(1), 1–12.

OMS. (2014). *Handbook for Guideline Development* (2da ed.).

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/145714/9789241548960-chap17-eng.pdf>

OMS. (2022). *Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts*.

<https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>

Pan, Q., Law, C. O. K., Yung, M. M. H., Han, K. C., Pon, Y. L., & Lau, T. C. K. (2018). Novel RNA aptamers targeting gastrointestinal cancer biomarkers CEA, CA50 and CA72-4 with superior affinity and specificity. *PLoS One*, *13*(10), e0198980.

Parekh, P., Tang, Z., Turner, P. C., Moyer, R. W., & Tan, W. (2010). Aptamers recognizing glycosylated hemagglutinin expressed on the surface of vaccinia virus-infected cells. *Analytical Chemistry*, *82*(20), 8642–8649.

Parolo, C., de la Escosura-Muñiz, A., Polo, E., Grazú, V., De La Fuente, J. M., & Merkoçi, A. (2013). Design, preparation, and evaluation of a fixed-orientation antibody/gold-nanoparticle conjugate as an immunosensing label. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *5*(21), 10753–10759.

Parrish, C. R., Holmes, E. C., Morens, D. M., Park, E.-C., Burke, D. S., Calisher, C. H., Laughlin, C. A., Saif, L. J., & Daszak, P. (2008). Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *72*(3), 457–470.

Passos, M. L. C., & Saraiva, M. L. M. F. S. (2019). Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies.

Measurement, 135, 896–904.

Pecora, R. (2000). Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2(2), 123–131.

Prada, J. P., Maag, L. E., Siegmund, L., Bencurova, E., Chunguang, L., Koutsilieri, E., Dandekar, T., & Scheller, C. (2021). Estimation of R0 for the spread of SARS-CoV-2 in Germany from Excess Mortality. *MedRxiv*.

Raddatz, M. L., Dolf, A., Endl, E., Knolle, P., Famulok, M., & Mayer, G. (2008). Enrichment of cell-targeting and population-specific aptamers by fluorescence-activated cell sorting. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(28), 5190–5193.

Raeisossadati, M. J., Danesh, N. M., Borna, F., Gholamzad, M., Ramezani, M., Abnous, K., & Taghdisi, S. M. (2016). Lateral flow based immunobiosensors for detection of food contaminants. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 235–246.

Rajamanonmani, R., Nkenfou, C., Clancy, P., Yau, Y. H., Shochat, S. G., Sukupolvi-Petty, S., Schul, W., Diamond, M. S., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2009). On a mouse monoclonal antibody that neutralizes all four dengue virus serotypes. *The Journal of General Virology*, 90(Pt 4), 799.

Rajasekharan, S., Milan Bonotto, R., Nascimento Alves, L., Kazungu, Y., Poggianella, M., Martinez-Orellana, P., Skoko, N., Polez, S., & Marcello, A. (2021). Inhibitors of protein glycosylation are active against the coronavirus severe acute respiratory syndrome coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*, 13(5), 808.

RCSB PDB protein data bank. (n.d.). <https://www.rcsb.org/docs/programmatic->

access/file-download-services

Ren, W., & Irudayaraj, J. (2021). Based Test for Rapid On-Site Screening of SARS-CoV-2 in Clinical Samples. *Biosensors*, *11*(12), 488.

Roberts, A., Mahari, S., Shahdeo, D., & Gandhi, S. (2021). Label-free detection of SARS-CoV-2 Spike S1 antigen triggered by electroactive gold nanoparticles on antibody coated fluorine-doped tin oxide (FTO) electrode. *Analytica Chimica Acta*, *1188*, 339207.

Robertson, D. L., & Joyce, G. F. (1990). Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, *344*(6265), 467–468.

Robson, T., Shah, D. S. H., Solovyova, A. S., & Lakey, J. H. (2018). Modular protein engineering approach to the functionalization of gold nanoparticles for use in clinical diagnostics. *ACS Applied Nano Materials*, *1*(7), 3590–3599.

Rosenberg, R. (2015). Detecting the emergence of novel, zoonotic viruses pathogenic to humans. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(6), 1115–1125.

Rothen, D. A., Krenger, P. S., Nonic, A., Balke, I., Vogt, A.-C. S., Chang, X., Manenti, A., Vedovi, F., Resevica, G., Walton, S. M., Zeltins, A., Montomoli, E., Vogel, M., Bachmann, M. F., & Mohsen, M. O. (2022). Intranasal administration of a virus like particles-based vaccine induces neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and variants of concern. *Allergy*, *77*(8), 2446–2458.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/all.15311>

Roxo, C., Kotkowiak, W., & Pasternak, A. (2019). G-quadruplex-forming aptamers—characteristics, applications, and perspectives. *Molecules*, *24*(20), 3781.

- Ruiz, G., Tripathi, K., Okyem, S., & Driskell, J. D. (2019). pH impacts the orientation of antibody adsorbed onto gold nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, *30*(4), 1182–1191.
- Ryu, J. H., Kwon, M., Moon, J.-D., Hwang, M.-W., Lee, J.-M., Park, K.-H., Yun, S. J., Bae, H. J., Choi, A., & Lee, H. (2018). Development of a rapid automated fluorescent lateral flow immunoassay to detect hepatitis B surface antigen (HBsAg), antibody to HBsAg, and antibody to hepatitis C. *Annals of Laboratory Medicine*, *38*(6), 578–584.
- Saha, B., Evers, T. H., & Prins, M. W. J. (2014). How antibody surface coverage on nanoparticles determines the activity and kinetics of antigen capturing for biosensing. *Analytical Chemistry*, *86*(16), 8158–8166.
- Sajid, M., Kawde, A.-N., & Daud, M. (2015). Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*, *19*(6), 689–705.
- Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B. J., Oh, E., Stewart, M. H., & Medintz, I. L. (2013). Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical Reviews*, *113*(3), 1904–2074.
- Saraf, N., Villegas, M., Willenberg, B. J., & Seal, S. (2019). Multiplex viral detection platform based on a aptamers-integrated microfluidic channel. *ACS Omega*, *4*(1), 2234–2240.
- Schmidt, T., Mauracher, S., Bender, L., Greene, B., Kurzhals, J., Eming, R., Dostatni, R., & Hertl, M. (2018). A novel lateral flow immunoassay for the rapid detection of anti-

- Dsg3 IgG serum autoantibodies in pemphigus vulgaris. *Experimental Dermatology*, 27(3), 233–237.
- Schulze, H., & Bayer, W. (2022). Changes in symptoms experienced by SARS-CoV-2-infected individuals-from the first wave to the omicron variant. *Frontiers in Virology*, 57.
- Shangguan, D., Meng, L., Cao, Z. C., Xiao, Z., Fang, X., Li, Y., Cardona, D., Witek, R. P., Liu, C., & Tan, W. (2008). Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells. *Analytical Chemistry*, 80(3), 721–728.
- Shardlow, E., Rao, C., Sattarov, R., Wu, L., Fraser, P. E., & Exley, C. (2019). Aggregation of the diabetes-related peptide ProIAPP1-48 measured by dynamic light scattering. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 51, 1–8.
- Shen, Y., & Shen, G. (2019). Signal-enhanced lateral flow immunoassay with dual gold nanoparticle conjugates for the detection of hepatitis B surface antigen. *ACS Omega*, 4(3), 5083–5087.
- Shiratori, I., Akitomi, J., Boltz, D. A., Horii, K., Furuichi, M., & Waga, I. (2014). Selection of DNA aptamers that bind to influenza A viruses with high affinity and broad subtype specificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(1), 37–41.
- Si, J., Li, J., Zhang, L., Zhang, W., Yao, J., Li, T., Wang, W., Zhu, W., Allain, J., & Fu, Y. (2019). A signal amplification system on a lateral flow immunoassay detecting for hepatitis e-antigen in human blood samples. *Journal of Medical Virology*, 91(7), 1301–1306.

SIB Swiss Institute of Bioinformatics. (n.d.). *Viral attachment to host cell*.

<https://viralzone.expasy.org/956>

Souza, L. R., Colonna, J. G., Comodaro, J. M., & Naveca, F. G. (2022). Using amino acids co-occurrence matrices and explainability model to investigate patterns in dengue virus proteins. *BMC Bioinformatics*, *23*(1), 1–19.

Stanborough, T., Given, F. M., Koch, B., Sheen, C. R., Stowers-Hull, A. B., Waterland, M. R., & Crittenden, D. L. (2021). Optical detection of CoV-SARS-2 viral proteins to sub-picomolar concentrations. *ACS Omega*, *6*(9), 6404–6413.

Stoltenburg, R., Krafčiková, P., Víglaský, V., & Strehlitz, B. (2016). G-quadruplex aptamer targeting Protein A and its capability to detect *Staphylococcus aureus* demonstrated by ELONA. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–12.

Sun, H., & Zu, Y. (2015). A highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules*, *20*(7), 11959–11980.

Telenti, A., Hodcroft, E. B., & Robertson, D. L. (2022). The evolution and biology of SARS-CoV-2 variants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *12*(5), a041390.

Tsai, D.-H., DelRio, F. W., Keene, A. M., Tyner, K. M., MacCuspie, R. I., Cho, T. J., Zachariah, M. R., & Hackley, V. A. (2011). Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods. *Langmuir*, *27*(6), 2464–2477.

Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, *249*(4968), 505–510.

University at Albany. (n.d.). *UNAFold webserver*.

<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>

- Van Stralen, K. J., Stel, V. S., Reitsma, J. B., Dekker, F. W., Zoccali, C., & Jager, K. J. (2009). Diagnostic methods I: sensitivity, specificity, and other measures of accuracy. *Kidney International*, *75*(12), 1257–1263.
- Vicenti, I., Dragoni, F., Giannini, A., Giammarino, F., Spinicci, M., Saladini, F., Boccuto, A., & Zazzi, M. (2020). Development of a cell-based immunodetection assay for simultaneous screening of antiviral compounds inhibiting Zika and dengue virus replication. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery*, *25*(5), 506–514.
- Wang, J., Fang, X., Zhang, C., Ji, H., Pang, Q., Li, X., Luo, Z., Wu, Q., & Zhang, L. (2021). Development of aptamer-based molecular tools for rapid intraoperative diagnosis and in vivo imaging of serous ovarian cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *13*(14), 16118–16126.
- Wang, J., Li, T., Shen, R., Li, G., & Ling, L. (2019). Polymerase chain reaction-dynamic light scattering sensor for dna and protein by using both replication and cleavage properties of taq polymerase. *Analytical Chemistry*, *91*(5), 3429–3435.
- Wang, Q., Liu, R., Yang, X., Wang, K., Zhu, J., He, L., & Li, Q. (2016). Surface plasmon resonance biosensor for enzyme-free amplified microRNA detection based on gold nanoparticles and DNA supersandwich. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *223*, 613–620.
- Wang, R., Zhao, J., Jiang, T., Kwon, Y. M., Lu, H., Jiao, P., Liao, M., & Li, Y. (2013). Selection and characterization of DNA aptamers for use in detection of avian

- influenza virus H5N1. *Journal of Virological Methods*, 189(2), 362–369.
- Wang, Y., & Alocilja, E. C. (2015). Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens. *Journal of Biological Engineering*, 9(1), 1–7.
- Wang, Z., Zhao, Q., Huang, M., Duan, Y., Li, F., & Wang, T. (2022). Dual Detection of Hemagglutinin Proteins of H5N1 and H1N1 Influenza Viruses Based on FRET Combined With DNase I. *Frontiers in Microbiology*, 13, 934475.
- Wasik, B. R., de Wit, E., Munster, V., Lloyd-Smith, J. O., Martinez-Sobrido, L., & Parrish, C. R. (2019). Onward transmission of viruses: how do viruses emerge to cause epidemics after spillover? *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1782), 20190017.
- Wei Xiang, B. W., Saron, W. A. A., Stewart, J. C., Hain, A., Walvekar, V., Missé, D., Thomas, F., Kini, R. M., Roche, B., & Claridge-Chang, A. (2022). Dengue virus infection modifies mosquito blood-feeding behavior to increase transmission to the host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(3), e2117589119.
- Woo, H.-M., Lee, J.-M., Yim, S., & Jeong, Y.-J. (2015). Isolation of single-stranded DNA aptamers that distinguish influenza virus hemagglutinin subtype H1 from H5. *PLoS One*, 10(4), e0125060.
- Yamamoto, R., & Kumar, P. K. R. (2000). Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1. *Genes to Cells*, 5(5), 389–396.
- Yao, Hangping, Song, Y., Chen, Y., Wu, N., Xu, J., Sun, C., Zhang, J., Weng, T., Zhang, Z., & Wu, Z. (2020). Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell*, 183(3), 730–

738.

- Yao, Hebang, Cai, H., Li, T., Zhou, B., Qin, W., Lavillette, D., & Li, D. (2021). A high-affinity RBD-targeting nanobody improves fusion partner's potency against SARS-CoV-2. *PLoS Pathogens*, *17*(3), e1009328.
- Yi, S. Y., Kwon, J., Lee, J. H., Yoon, K., Shin, Y. B., & Park, K. (2022). Rapid and Simultaneous Detection of Dengue and Chikungunya Viruses by a Multiplex Lateral Flow Assay Using Ficolin-1, One of Human Innate Immune Defense Proteins. *Journal of Bacteriology and Virology*, *52*(1), 1–10.
- Yrad, F. M., Castañares, J. M., & Alocilja, E. C. (2019). Visual detection of dengue-1 RNA using gold nanoparticle-based lateral flow biosensor. *Diagnostics*, *9*(3), 74.
- Yu, S., Zheng, X., Zhou, B., Li, J., Chen, M., Deng, R., Wong, G., Lavillette, D., & Meng, G. (2022). SARS-CoV-2 spike engagement of ACE2 primes S2' site cleavage and fusion initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(1), e2111199119.
- Zavvalova, E., & Kopylov, A. (2016). Aptamers to Hemagglutinin: A Novel Tool for Influenza Virus Recognition and Neutralization. *Current Pharmaceutical Design*, *22*(31), 4835–4853. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160203142513>
- Zhai, G., Iskandar, M., Barilla, K., & Romaniuk, P. J. (2001). Characterization of RNA aptamer binding by the Wilms' tumor suppressor protein WT1. *Biochemistry*, *40*(7), 2032–2040.
- Zhan, L., Guo, S., Song, F., Gong, Y., Xu, F., Boulware, D. R., McAlpine, M. C., Chan, W. C. W., & Bischof, J. C. (2017). The role of nanoparticle design in determining analytical performance of lateral flow immunoassays. *Nano Letters*, *17*(12), 7207–

7212.

Zhang, C., & Johnson, L. W. (2009). Single quantum-dot-based aptameric nanosensor for cocaine. *Analytical Chemistry*, *81*(8), 3051–3055.

Zhang, J., Liu, B., Liu, H., Zhang, X., & Tan, W. (2013). Aptamer-conjugated gold nanoparticles for bioanalysis. *Nanomedicine*, *8*(6), 983–993.

Zhang, L., Fang, X., Liu, X., Ou, H., Zhang, H., Wang, J., Li, Q., Cheng, H., Zhang, W., & Luo, Z. (2020). Discovery of sandwich type COVID-19 nucleocapsid protein DNA aptamers. *Chemical Communications*, *56*(70), 10235–10238.

Zhang, Y., Bai, J., & Ying, J. Y. (2015). A stacking flow immunoassay for the detection of dengue-specific immunoglobulins in salivary fluid. *Lab on a Chip*, *15*(6), 1465–1471.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3406–3415.

Apéndices

Apéndice A

Preparación de las soluciones

TBE 5X (1 litro)

Tris base	54 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M pH 8	20 ml

Aforar a 1 litro con agua desionizada.

PBS 10X (1 litro)

Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
NaCl	80 g
KCl	2 g

Disolver en 600 mL, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1L con agua desionizada. Esterilizar.

Solución de acetato de amonio 7.5 M)

Disolver 57.81 g de acetato de amonio en agua desionizada en un volumen final de 100 mL. Esterilizar por filtración.

Buffer de elución para la purificación de ssDNA

Acetato de amonio	1.927 gr
EDTA	0.0186 gr
SDS	0.05 gr

Todos los reactivos se mezclaron y se aforaron a 50 mL con agua desionizada.

Solucion de Acrilamida-Bisacrilamida 19:1 (30%)

Se pesaron 38 gr de acrilamida y 2 gr de bisacrilamida y se disolvieron en 100 mL de agua desionizada. Se aforo a 200 mL con agua desionizada.

Solución de Acrilamida-Bisacrilamida 19:1 (10%)

66.66 mL de la solución de acrilamida-bisacrilamida al 30% se mezclaron con 133.33 mL de TBE 1X. Se homogenizo muy bien y se guardó a 4°C.

Preparación de geles de acrilamida 19:1 al 10%

Solución acrilamida-bisacrilamida 10%	20 mL
Persulfato 10%	144 µL
TEMED	20 µL

*Para preparar dos geles de 1.5 mm biorad

Solución I Lisis alcalina

Para 50 mL

Tris-HCl 1M pH8	1.25 mL
EDTA 0.5 M	1 mL
Glucosa	0.45 gr
RNAasa	20 µg/mL

Adicionar todos los reactivos y aforar con agua desionizada a 50 mL.

Solución II Lisis alcalina

NaOH 1M	10 mL
SDS 10%	5 mL

Disolver los reactivos y aforar a 50 mL con agua desionizada.

Solución III Lisis alcalina

Acetato de potasio 14.715 gr

Ácido acético 500 μ L

Disolver los reactivos y aforar a 50 mL con agua desionizada.