

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Desarrollo de un Sistema Inmunoconjugado de Nanopartículas
Metálicas para el Diagnóstico de Dengue



Presenta

Hector Ramses Ramirez Navarro

Hermosillo, Sonora

Junio de 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



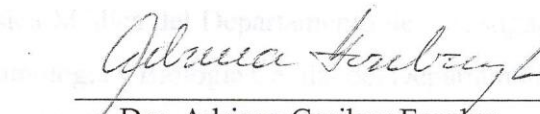
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN


Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Hector Ramses Ramirez Navarro** lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.




Dra. Aracely Angulo Molina
Director de Tesis



Dra. Adriana Garibay Escobar
Secretario



Dr. Miguel Angel Méndez Rojas
Sinodal



Dr. Martín Rafael Pedroza Montero
Sinodal

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Aracely Angulo Molina en el Laboratorio de Biofísica Médica del Departamento de Investigación en Física (DIFUS), el Laboratorio de Inmunología y Biología Celular del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora, y en Puebla en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular de la Universidad de las Américas Puebla y en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente. Financiamiento: Red SEP-PRODEP 2015-2017 NANOTECNOLOGÍA Y SALUD, proyecto “Nanotecnología como herramienta para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas, responsable UNISON-CA-183 Dr. Martín R. Pedroza Montero. Así como el Proyecto CONACYT-Ciencia Básica 154602: “Nanopartículas magnéticas para aplicaciones en terapia hipertérmica, imagenología y transporte de fármacos: Estudio de las condiciones fundamentales de control de morfología, tamaño y estabilización”. Proyecto apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación Básica CONACYT – Secretaría de Educación Pública (2011-2014), responsable Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas (UDLAP). Y Proyecto RED PRODEP UAEM-CA-215: “Nanotecnología como herramienta para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas”, responsable general Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyan, UAEM (2015-2017).

DEDICATORIA

A mi abuelo Héctor Ramírez y a mi bisabuela Ernestina Díaz, por ser las personas que siempre creyeron en mí y alentarme a que alcanzaría esta meta. Ahora la única meta que no alcanzaré es el poder tenerlos en este momento para que pudieran verlo.

“Yo soy mi propio experimento, mi propia obra de arte”.

– Madonna

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora y al Posgrado en Ciencias de la Salud, por estos dos años de formación y el apoyo otorgado durante este tiempo.

A la Dra. Aracely Angulo Molina, gracias por la oportunidad que me dio de trabajar con usted en este proyecto de tesis y así conocer en Puebla al Dr. Méndez, a Tania Hidalgo y al Dr. Julio Reyes.

Al Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas, por el apoyo en este trabajo, gracias por su paciencia y atención durante mis estancias en Puebla, por siempre estar disponible y al pendiente, fue un gran gusto el haberlo conocido. De igual manera a la UDLAP, donde se realizaron experimentos fundamentales para este trabajo.

A mis sinodales, Dra. Adriana Garibay Escobar, por sus consejos y pláticas, así como sus contribuciones en el trabajo. Y al Dr. Martín Rafael Pedroza Montero, por su apoyo en la gestión de recursos, no sólo para el proyecto, sino también para mis estancias y congresos.

Al Centro Biomédico de Oriente (CIBIOR), por aceptarme en sus instalaciones, con principal énfasis en el Dr. Julio Reyes Leyva y a la M.C. Carolina Jasso Miranda, por su apoyo en el trabajo, así como el tiempo para capacitarme en las técnicas utilizadas.

A mi familia, por ser una pieza inicial de la maquinaria, la cual fue necesaria para llegar hasta aquí.

A mis compañeros Thania Garzón, Lulú Valencia, Brenda Samaniego, Raúl Rascón, Efraín Alday, Paola Gastelum, Víctor Domínguez y la maestra Lucila Rascón, que durante todos estos años hemos acumulado experiencias, momentos, recuerdos tanto dentro como fuera del laboratorio, los cuales nos acompañaran para siempre. Gracias por su apoyo tanto en clases, consejos o simplemente distracciones, donde cada uno de nosotros ha dejado su propia marca. El convivir tanto con las personas, te hace que no las olvides nunca y que siempre las lleves contigo.

A Alejandra Valdez, por ser de gran apoyo durante este tiempo y más. Por ayudarme a preparar cada seminario y contestar dudas a las 3 am y junto con Miriam Domínguez, recordarme que nadie me puede detener de llegar a la meta más que yo mismo.

A Daniel I. Valenzuela Fontes, por ser una persona importante en este proceso. Por tu tiempo, los consejos, el apoyo, las esperas y por hacerme sentir que todo el esfuerzo valía la pena. Llegaste en el momento justo a mostrarme que “la fuerza me acompaña”.

A Tania Hidalgo, dejo al final a quien le agradezco tanto, fuiste una pieza fundamental en este trabajo. Gracias por acceder a ayudarme en todo este largo camino, aceptándome tal cual soy y enseñándome con paciencia y dedicación, a pesar de ni siquiera conocerme. Como dijo Frida Kahlo: "Yo solía pensar que era la persona más extraña en el mundo, pero luego pensé, hay mucha gente así en el mundo, tiene que haber alguien como yo, que se sienta bizarra y dañada de la misma forma en que yo me siento". Así mismo, fuiste esa persona tan extraña como yo, que desde el primer día pudimos convivir y trabajar como no lo había hecho con nadie, gracias por tu calidad humana y estar dispuesta a ayudar en cada momento. Y de igual manera, agradezco a tu bella hermana Ximena Hidalgo, porque me aceptó en su casa y me trató como uno más de la comuna en cada una de mis estancias. Gracias pequeñas Hidalgo por tanto amor.

Aquí termina un ciclo, se cierra un capítulo, donde me despido de personas y lugares que tal vez ya no frecuentaré, pero agradezco que hayan formado parte de mi vida por algún tiempo. Pero así mismo, cada final es un nuevo comienzo y me siento privilegiado, ya que rompí con el pasado y me atreví al futuro.

“No conozco ninguna fórmula única para el éxito. Pero con los años he observado que algunos atributos de liderazgo son universales y son a menudo de encontrar maneras de alentar a las personas a combinar sus esfuerzos, sus talentos, sus conocimientos, su entusiasmo y su inspiración para trabajar juntos”.

– Queen Elizabeth II

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
OBJETIVOS	xii
Objetivo General	xii
Objetivos Particulares.....	xii
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Dengue Virus.....	3
Generalidades del Virus.....	3
Inmunopatogénesis del Virus.....	5
Clasificación de la Enfermedad	7
Epidemiología.....	8
Diagnóstico del Virus del Dengue.....	10
Manifestaciones Clínicas	10
Pruebas Diagnósticas	10
Nanotecnología.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Síntesis, Funcionalización y Caracterización de Nanopartículas de Magnetita	20
Síntesis de Nanopartículas de Magnetita Fe ₃ O ₄	20
Funcionalización de Nanopartículas de Magnetita Fe ₃ O ₄ con APTMS	20
Caracterización de Nanopartículas de Magnetita Fe ₃ O ₄	21
Producción de Proteína NS1	21
Cultivo Celular.....	21
Protocolo de Producción de Proteína NS1 por Infección del Cultivo	23
Cuantificación de la Producción de Proteína Total	23
Análisis del Sobrenadante por Electroforesis SDS-PAGE	24

Ensayo de Inmunodetección de la Proteína NS1	24
Formación del Conjugado Nps Fe ₃ O ₄ – Ab	24
Preparación de Microplaca	26
Reconocimiento de la Proteína NS1	26
Reconocimiento de la Proteína NS1 Mediante el Conjugado Nps Fe ₃ O ₄ @Si-Ab ...	26
Revelado de la Placa	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Caracterización de Nps Fe ₃ O ₄	29
Tamaño	29
Morfología	31
Composición	33
Producción de Proteína NS1	35
Cuantificación de Proteína Total	35
Detección de la Proteína NS1 por Electroforesis SDS-PAGE	35
Diseño de Nanoplateformas para la Detección de Proteínas NS1	37
Evaluación del Sistema	37
Reproducibilidad del Sistema	42
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
APÉNDICE	61

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pagina
I	Tipos de pruebas diagnósticas del virus del Dengue.	13
II	Cuantificación de proteínas totales en sobrenadantes de células U937.DC.SIGN.	36
III	Análisis densitométrico de sobrenadantes de la línea celular U937.DC.SIGN.	40
IV	Datos de absorbancias del ensayo de inmunodetección de la proteína NS1 en sobrenadantes de células U937.DC.SIGN.	45
V	Análisis estadístico de los ensayos de reproducibilidad de la inmunodetección de la proteína NS1.	47
VI	Análisis estadístico por prueba de comparación múltiple de Dunn.	48
VII	Costos de pruebas comerciales para el diagnóstico de Dengue.	49

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Diagrama de inmunopatogénesis del virus del Dengue.	9
2	Algoritmo de diagnóstico para la detección del virus Dengue para servicios de salud diseñado InDRE.	15
3	Algoritmo de diagnóstico para la detección del virus para laboratorios de referencia diseñado por el InDRE.	16
4	Esquema que representa el proceso de silanización superficial de la Np de magnetita.	22
5	Esquema que representa la conjugación entre la Np magnética silanizada y el anticuerpo.	25
6	Esquema de formación de complejo de inmunodetección.	27
7	Gráficas de distribución de tamaño de partícula por DLS.	30
8	Microscopía STEM de Nps de Fe ₃ O ₄ .	32
9	Espectro de infrarrojo que compara las Nps de Fe ₃ O ₄ sin funcionalizar (línea superior) y Nps de magnetita funcionalizadas Fe ₃ O ₄ @Si (línea inferior).	34
10	Electroforesis en gel de poliacrilamida de sobrenadantes U937.DC.SIGN.	39
11	Evaluación del diseño del inmunoconjugado para la detección de proteína NS1.	41
12	Evaluación cualitativa de la reproducibilidad del ensayo de inmunodetección de la proteína NS1.	44
13	Ensayo de reproducibilidad del sistema inmunoconjugado.	46

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la capacidad colorimétrica para la detección de la proteína NS1 del virus del Dengue, asistidas con nanoplataformas metálicas (Fe_3O_4).

Objetivos Particulares

- Sintetizar y funcionalizar nanopartículas de magnetita.
- Caracterizar la composición de las nanopartículas de magnetita en las diferentes etapas de síntesis y funcionalización.
- Obtener la proteína NS1 a partir de cultivos de la línea celular U937.DC.SIGN.
- Evaluar la capacidad colorimétrica de las nanoplataformas metálicas de hierro para la detección de la proteína NS1.

RESUMEN

Introducción: Actualmente, el diagnóstico de la infección por el virus del Dengue se basa en la RT-PCR y otras técnicas serológicas, con limitantes económicas, de sensibilidad y especificidad. Además, su utilización se ve limitada en grandes brotes debido a su elevado costo y a la baja disponibilidad. El desarrollo de nanoplataformas como sistemas de diagnóstico tiene un uso potencial para este fin.

Objetivo: Evaluar la capacidad colorimétrica para la detección de la proteína NS1 del virus del Dengue, asistidas con nanoplataformas metálicas (Fe_3O_4).

Métodos: Se sintetizaron y funcionalizaron nanopartículas de hierro (Nps), las cuales fueron caracterizadas por FTIR, DLS y STEM. Se diseñó un sistema tipo ELISA conjugando las Nps con anticuerpos anti-NS1 del Dengue virus. Esta proteína se obtuvo de los sobrenadantes de cultivos de U937.DC.SIGN infectados con el serotipo 2. La reacción positiva se evaluó y reveló por tinción de Perls.

Resultados: Se obtuvieron Nps magnéticas con las características de tamaño, forma y estabilidad apropiadas para el diseño de la nanoplataforma. Sólo las muestras positivas con la proteína NS1 reaccionaron con el inmunoconjugado Nps-Ab, mostrando un cambio de color azul característico y reproducible con una diferencia significativa $p < 0.001$.

Conclusión: Se logró demostrar que las Nps metálicas utilizadas en un sistema colorimétrico son capaces de detectar la proteína NS1 producida por el virus del Dengue. La nanoplataforma tiene un uso potencial como herramienta de diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

En años recientes la incidencia de nuevas enfermedades infecciosas y la reincidencia de enfermedades que eran consideradas controladas ha tenido un aumento notorio. Estas infecciones, mejor conocidas como enfermedades emergentes y reemergentes respectivamente, se definen como infecciones nuevas que surgen en una población o que ya han existido, pero cuya frecuencia está aumentando vertiginosamente por número de casos e incluso en un espacio geográfico determinado (Guzmán y col., 2001; Torres-Galicia y col., 2014). Hoy en día, sabemos que las interacciones entre múltiples factores naturales y el crecimiento en la población humana generan riesgos, ya que favorecen situaciones o eventos que pueden producir un impacto negativo en la salud de la población, a lo que se suma la adaptación y cambios que sufren en su patogenicidad los microorganismos.

Entre las enfermedades infecciosas con mayor presencia durante las últimas décadas están las causadas por los virus del género Flavivirus, como la enfermedad febril y fiebre hemorrágica causadas por el virus del Dengue (DENV). Estas enfermedades infecciosas emergentes son de gran importancia en salud pública a nivel mundial no sólo por el aumento en el número de casos, sino también por el incremento en la mortalidad de estos (World Health Organization, 2012). Actualmente el diagnóstico del Dengue es una de las prioridades para los servicios de salud, debido a que es una enfermedad reemergente y los casos graves de fiebre hemorrágica presentan una incidencia cada vez mayor en regiones tropicales y subtropicales. En estos casos, una identificación temprana permitiría una rápida capacidad de respuesta y un tratamiento adecuado, con el fin de ofrecer mayores posibilidades de recuperación.

La nanotecnología, la cual se define como el desarrollo de ciencia y tecnología a nanoescala, presenta grandes oportunidades en el área de la investigación diagnóstica. La principal ventaja de estos nanomateriales es que, al ser reducido su tamaño, las partículas presentan nuevas propiedades eléctricas, ópticas, y magnéticas que difieren de aquellas

del material nativo, dándole nuevas capacidades para su utilización en diversas áreas (FECYT, 2009). Trabajos anteriores indican que es factible la utilización de Nps para la detección de patógenos con mayor sensibilidad. En el caso del virus del Dengue, su detección se realiza mediante métodos que tienen un alto costo y tienen un tiempo de realización largo o a través de métodos serológicos que presentan problemas en su sensibilidad. Esto lleva a que muchos de los casos se detecten en periodos muy avanzados, lo que puede complicar la salud del paciente al no recibir los tratamientos necesarios.

Con base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue el desarrollar un nanoconjugado de Nps magnéticas para la detección la proteína SN1, mediante inmunoensayos colorimétricos. Con este trabajo pretendemos establecer un método eficaz para la detección del virus del Dengue en etapas tempranas.

ANTECEDENTES

Dengue Virus

Generalidades del Virus

El virus del Dengue pertenece a la familia *Flaviviridae*, del género *Flavivirus*. Está conformado por cuatro serotipos, que van de DENV-1 a DENV-4. El virus tiene forma esférica de envoltura lipídica, con un diámetro aproximado de 40-50 nm (Tuiskunen-Bäck, 2013). El genoma viral consiste en una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva y tiene aproximadamente 11000 bases de largo (Paixão y col., 2017). La proteína de la nucleocápside es un polipéptido básico, no glicosilado, asociado con el RNA viral, que da lugar a ésta, la cual está rodeada por una bicapa de lípidos con la que interacciona una proteína glicosilada transmembranal denominada (V3/E, 53-59 kDa). En la bicapa residen las principales actividades biológicas del virus como son: hemaglutinación, neutralización y su unión a receptores celulares (Brathwaite-Dick y col., 2012). El virus presenta tres proteínas estructurales, conocidas como núcleo (C), premembrana (M) y envoltura (E), las cuales constituyen la partícula viral, pero a su vez presenta 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) las cuales están implicadas en el ensamblaje y replicación viral, así como en la modulación de la respuesta de las células del hospedero (Guabiraba and Ryffel, 2014).

Dentro de las proteínas no estructurales se encuentra la proteína NS1, la cual es altamente conservada en el virus, con un peso aproximado de 48 kDa. Esta se sintetiza como monómero, la cual en retículo endoplásmico forma dímeros por modificaciones postraduccionales. Posteriormente es procesado en el aparato de Golgi y se secreta en el espacio extracelular como una partícula hexamérica con núcleos ricos en lípidos que se mantienen unidos por interacciones hidrofóbicas débiles (Edeling y col., 2014). La proteína NS1 intracelular es fundamental para la replicación viral, mientras que la proteína secretada y la unida a la membrana son las causantes de la respuesta inmune. La glicosilación de esta proteína es importante para la virulencia, replicación viral, en la

secreción eficiente al espacio extracelular y así como en la evasión de la respuesta inmune. Esta proteína tiene la capacidad de secretarse en niveles elevados al medio extracelular, presentando concentraciones acumuladas de hasta 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ en sueros de pacientes infectados con el virus del Dengue (Rastogi y col., 2016).

El principal vector de transmisión del virus del Dengue es el mosquito del género *Aedes aegypti*, el cual se concentra a nivel mundial en las regiones tropicales y subtropicales. Sin embargo, en los últimos años su diseminación ha abarcado otras áreas más frías. Esto ha llevado a un aumento de la enfermedad en regiones donde antes no se presentaba. Los mosquitos *Aedes aegypti*, sobreviven y se reproducen dentro de un rango de condiciones climáticas óptimas, siendo la temperatura y la precipitación las más importantes. Con el cambio climático, el aumento evidente de la temperatura afecta su desarrollo y supervivencia, y aunado a las precipitaciones cada vez mayores influyen en el transporte y la diseminación del virus, promoviendo nuevos brotes y el aumento de casos (McMichael y col., 2008). Según la OMS los efectos globales del cambio climático pueden ser muy negativos, en particular de las enfermedades transmitidas por vector, ya que se pueden prolongar las estaciones de transmisión (WHO, 2018).

Los mosquitos infectan principalmente a los humanos los cuales desarrollan la enfermedad (Patterson y col., 2016). Las picaduras son provocadas por las hembras adultas fecundadas, las cuales pican buscando obtener sangre con la cual cumplir los requerimientos alimenticios para el desarrollo de sus huevos. Estas antes de succionar, proceden a inyectar saliva la cual contiene sustancias las cuales funcionan como lubricantes y anticoagulantes que ayudan en la extracción de sangre. El virus se multiplica dentro del intestino medio y seguido migra a las glándulas salivares de los mosquitos, los cuales se transmiten a través de ella hasta pasar a torrente sanguíneo, donde se multiplican dentro de las células del portador y se extiende por todo el cuerpo produciendo la enfermedad (Kantor, 2016).

Inmunopatogénesis del Virus

Actualmente, se han realizado avances significativos en la inmunopatogenia del virus del Dengue, durante sus infecciones. Donde se ha demostrado que las células dendríticas son el primer objetivo en humanos, los cuales actúan como guardianes del sistema inmune. Los receptores de lectina de tipo C (CLR) son receptores de reconocimiento del hospedero útiles para detectar patógenos invasores. Diversos integrantes de esta familia se encuentran expresados en células mieloides, incluyendo los monocitos, macrófagos y células dendríticas, jugando un papel central en la activación de la defensa inmune. Hay una gran evidencia de que la no integrina ICAM-3 específica de células dendríticas (DC-SIGN o CD209) proporcionan un puente crítico entre la replicación viral en el vector y la infección del hospedero (Kim y col., 2017). DC-SIGN es una lectina tetramérica de tipo C especializada en la captura de patógenos para la presentación de antígenos y se expresa constitutivamente en células dendríticas. Durante la infección, las partículas virales que se encuentran en la dermis son internalizadas por las células dendríticas, ya que el virus tiene la capacidad de infectar estas células para su replicación, causando su activación. Sin embargo, esta activación contribuye a la propagación del virus una vez que migra a los ganglios linfáticos (Guabiraba and Ryffel, 2014).

Una vez infectada, esta célula reduce su capacidad de producir interferón tipo I (IFN-I), lo que conduce a la pérdida del efecto antiviral promoviendo la propagación del virus. De esta forma, el virus genera un efecto antagónico que da lugar a un método de evasión para el establecimiento de la respuesta inmune (Fernandez-Garcia y col., 2009). Observando la capacidad antagonista de las proteínas virales, se ha encontrado que la expresión de las proteínas NS2A, NS4A o NS4B induce el secuestro de IFN-1. Se ha demostrado que la expresión de estas estas proteínas no estructurales reducen la fosforilación de STAT1, la cual es clave de la vía de transducción de señales de IFN de tipo I. Además de esto, NS4B también produce una disminución en la expresión de IFN- β , lo que causa que no se presente la forma activada de STAT-1, de igual manera que las proteínas NS2A y NS4A también contribuyen a la inhibición de STAT-1. Por otro lado,

en el caso de la proteína NS5, tiene una afinidad por unirse a STAT-2, la cual provoca su degradación en el proteosoma. Esto muestra que desactivar la función STAT-1 y STAT-2 son componentes importantes para neutralización de la respuesta antiviral durante la infección (Zeidler y col., 2017). A pesar de que la vía del complemento es un mecanismo importante de la respuesta innata, ésta se ve afectada durante la infección por Dengue. Las proteínas virales tales como NS1, tienen la capacidad de unirse a C4, lo que induce su degradación, evitan la acumulación de C4b, y por lo tanto, no se forma C3 convertasa, evitando dicho mecanismo de defensa (Avirutnan y col., 2010).

Otro de los puntos de defensa durante la infección por el virus del Dengue es la generación de anticuerpos específicos, mismos que se han utilizado como biomarcador para el diagnóstico. La producción de anticuerpos contra Dengue es eficaz, pero en el caso de una infección secundaria con un serotipo diferente, puede causar una potenciación mediada por anticuerpos, lo que favorece el aumento de la fagocitosis de partículas virales en los macrófagos y las células dendríticas. Este tipo de infección a través del receptor de Fc tiene la capacidad de suprimir la transcripción de genes para IL-12, IFN- γ y TNF- α . También suprime la liberación de NO al bloquear la activación de STAT-1 (Avirutnan y col., 2010; Wahala and de Silva, 2011; Wang y col., 2017). Esta segunda infección puede ser relacionada o explicada por la teoría del “pecado original”, donde el hospedero es expuesto en una infección posterior con un serotipo diferente, el cual presenta una proliferación y activación de linfocitos de memoria CD8 + específicos para la primera cepa, mostrando una respuesta cruzada que contribuye al daño por infección secundaria (Park y col., 2016; Patel y col., 2017; Priyamvada, 2016).

También el sistema inmune presenta una respuesta inmune mediada por células T en el caso de linfocitos T CD4 +, los cuales son activados por péptidos presentados por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II, los cuales polarizan una respuesta hacia la eliminación del patógeno, ya sea hacia Th1, Th2, Th17 o células T reguladoras. Pero como ya se mencionó, las células dendríticas infectadas no muestran producción de IFN-I, lo que significa que las células T vírgenes no se pueden activar hacia

Th11. Además, hay reportes que muestran que las células dendríticas infectadas con DENV2 no pueden inducir la respuesta en células CD4 + y producir IFN- γ (Rothman and Ennis, 1999). En el caso de los linfocitos T CD8 +, se ha descubierto que muy pocos son específicos y que están programados para la apoptosis. En el caso de aquellos que son específicos para las proteínas Dengue, producen naturalmente IFN- γ y TNF- α . En el caso de infecciones secundarias, es evidente la presencia de una activación de la memoria de los linfocitos T CD8 + que presenta una reactividad cruzada entre los serotipos (Elong Ngono y col., 2016). De esta manera, el virus presenta varias formas en que puede evadir la respuesta inmune. Y así mismo, las complicaciones que acompañan a la enfermedad cuando se presenta por 2da vez dependen de los efectos en la memoria celular tras la primoinfección (Figura 1).

Clasificación de la Enfermedad

La enfermedad por el virus del Dengue se puede presentar de dos formas, mejor conocidas como Fiebre por Dengue (FD) o Fiebre hemorrágica por Dengue (FHD), las cuales se diferencian por el cuadro clínico al que dan lugar. En el caso de la FD, esta se caracteriza por la presencia de un cuadro febril agudo con temperaturas que pueden superar los 40°C, incluyendo una cefalea frontal, dolor retroorbital, mialgias, artralgias y exantema. Este cuadro clínico de FD, suele confundirse con la leptospirosis, fiebre amarilla, influenza, entre otros. La infección primaria generalmente se resuelve en una semana y los pacientes quedan protegidos contra una infección del mismo serotipo. Sin embargo, una segunda infección por un serotipo diferente del primero, puede dar lugar a un curso más grave de la enfermedad, presentándose en los casos graves de la FHD. Los cuales se caracterizan por 4 manifestaciones clínicas fundamentales: fiebre alta, fenómenos hemorrágicos, hepatomegalia y, frecuentemente, insuficiencia circulatoria, causados por una respuesta cruzada generando una propagación del virus mayor. Esto es debido a un aumento de la infección favorecida por anticuerpos; es decir, una persona que tiene anticuerpos contra alguno de los serotipos del virus del Dengue y resulta infectada por uno distinto al primario, va a desarrollar una formación de inmunocomplejos (virus-inmunoglobulina)

que facilitan la penetración de este en el mononuclear a través del receptor Fc. Generando una alta replicación viral y la agresión del virus a muchas células, lo que causa una mayor permeabilidad vascular, generando hemoconcentración, hipoalbuminemia y sangrados. (Halstead and Cohen, 2015; Khetarpal and Khanna, 2016).

Epidemiología

En las últimas décadas ha aumentado en gran medida la incidencia de Dengue en el mundo. A pesar de que el número real de casos de Dengue no es insuficientemente notificado y en muchos de los casos están mal clasificados, la estimación más reciente resalta que se producen alrededor de 390 millones de infecciones por Dengue cada año, de los cuales solo 96 millones se manifiestan clínicamente (Bhatt y col., 2012; OMS, 2018). En México, los primeros reportes de Dengue se registraron en 1941, cuando se notificaron 6,955 casos en toda la República Mexicana. Posteriormente se reportaron pocos casos, hasta su desaparición en 1963 gracias a la campaña de erradicación del mosquito *Aedes aegypti* que mantuvo el Dengue ausente durante 12 años. Sin embargo, en 1978 se reintrodujo en México, donde los casos aumentaron a partir de 1980 (Dantés y col., 2014; Torres-Galicia y col., 2014). En la actualidad el Dengue representa un problema importante de salud pública en nuestro país, según reportes del panorama epidemiológico del Dengue, publicado por la Secretaría de Salud, durante el 2016, México presentó un total de 1,344 casos confirmados, con una letalidad de 34 muertes por cada 100 habitantes, siendo Guanajuato, Nuevo León, Veracruz, Chiapas, Jalisco, Sonora y Puebla los estados que concentran el 69% de los casos. Debido a esto se ha convertido en objeto de estudio en nuestro país (Secretaría de Salud, 2017).

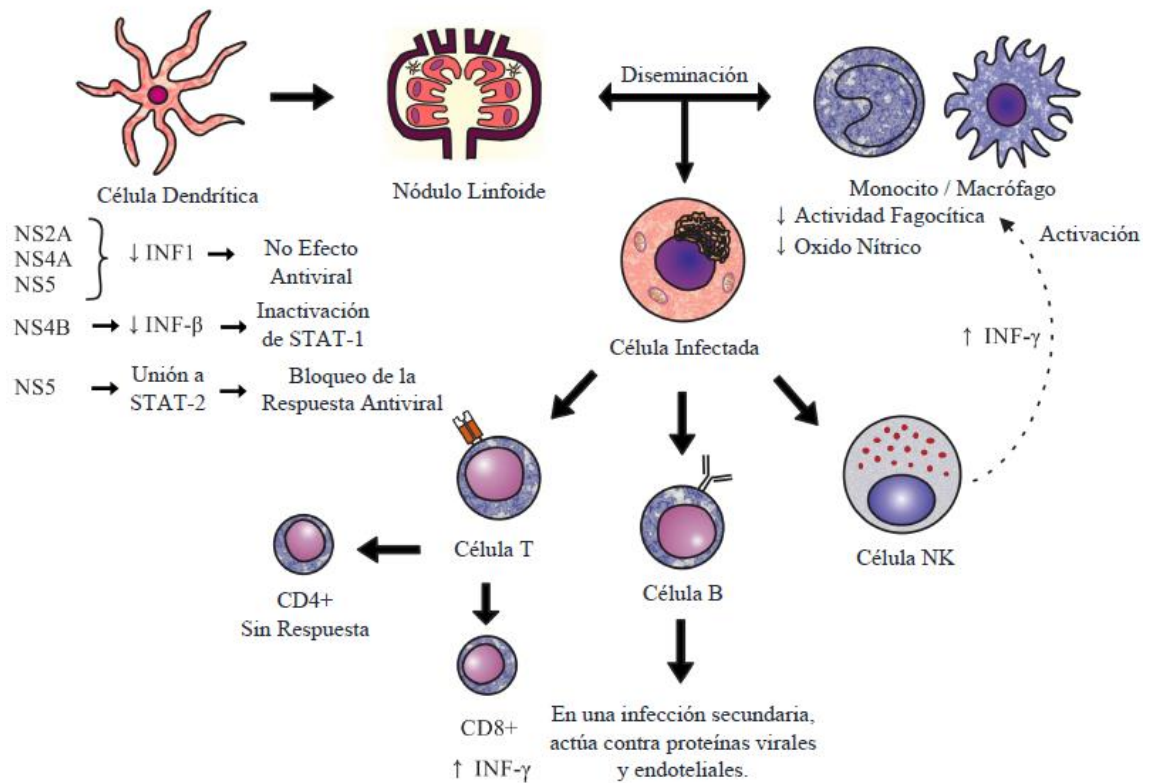


Figura 1. Diagrama de inmunopatogénesis del virus del Dengue. Se presentan las diversas vías por la cual el virus del Dengue evita la respuesta antiviral y a su vez se muestran las diversas acciones presentadas por las células del hospedero ante la infección.

Diagnóstico del Virus del Dengue

Manifestaciones Clínicas

Durante décadas las manifestaciones clínicas han sido el principal objeto para la detección del virus. Esta infección puede ser clínicamente inaparente o puede mostrar una variada intensidad. Pasado un período de incubación que puede ser de 5 a 7 días aparecen las manifestaciones clínicas, aunque un alto porcentaje de las personas infectadas cursan la enfermedad de manera asintomática. Las infecciones sintomáticas pueden variar desde formas leves de la enfermedad, que solo presentan un cuadro febril agudo, que dura de 2 a 7 días; a otros cuya fiebre se asocia a intenso malestar general, y se incluyen cefaleas, dolor muscular, así como dolores articulares. Como se ha mencionado, algunos casos de Dengue pueden evolucionar a formas graves en las que hay manifestaciones hemorrágicas, pérdida de plasma debida al aumento de la permeabilidad vascular, lo que ocasiona un incremento del hematocrito, además de derrame pleural y derrame pericárdico, lo que puede llevar a un cuadro de shock. El Dengue es una enfermedad sistémica y muy dinámica, en la que en pocas horas un paciente puede pasar de un cuadro leve a un cuadro grave. Al inicio de la fiebre, no es posible predecir si el paciente tendrá síntomas o si evolucionará a una forma grave de la enfermedad. Por lo tanto, los servicios de salud deben realizar un seguimiento del paciente, y éste junto a su grupo familiar deben estar atentos a los signos de alarma, hasta al menos 48 horas después de terminar la etapa febril (Kumar, Abbas y Fausto, 2010).

Pruebas Diagnósticas

Una de las primeras pruebas utilizadas para el diagnóstico del virus del Dengue fue el aislamiento viral. Uno de los sistemas biológicos más empleados para el diagnóstico, a pesar de su baja sensibilidad, fue la inoculación intracerebral de ratones de entre 1 a 3 días de edad (Oliveira y col., 2016). También se han utilizado diferentes líneas celulares de mamíferos, ambas susceptibles a la infección y muerte por el virus, como las células de riñón de mono verde africano, conocidas como células VERO (Sucipto y col., 2018), y

células de riñón de Hámster (BHK21) (Chan y col., 2016). Recientemente, se han desarrollado otros sistemas más sensibles a la infección por el virus. Estas nuevas metodologías utilizan líneas celulares del mosquito *Aedes albopictus*, como las AP61 y C6\36, las que permiten un alto índice de aislamiento viral (Fallecker y col., 2017). Por último, se está estudiando el aislamiento viral mediante la inoculación intratorácica de mosquitos, que ha demostrado ser el más sensible (Secundino y col., 2017).

En cuanto a las técnicas para la identificación del virus se tiene la inmunofluorescencia, introducida en los años 50's para este fin. Esta técnica se basa en la unión inmunológica de un anticuerpo marcado con un fluorocromo (isocianato de fluoresceína) a su antígeno homólogo (Ministerio de Salud, 2013). Por otra parte, a partir de la década de los 80's se comenzaron a desarrollar los sistemas inmunoenzimáticos conocidos como ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), este ha sido de gran utilidad en el diagnóstico serológico del virus Dengue. El ensayo cuantificaba los anticuerpos IgM o IgG anti-Dengue en el suero del paciente. Sin embargo, su principal limitante eran los falsos negativos asociados a la baja sensibilidad en las muestras de pacientes con enfermedad inicial. Además de requerir una segunda muestra a los 14 a 21 días después de la primera visita, para medir IgG y obtener un diagnóstico definitivo. (Thiha and Ibrahim, 2015).

Durante los años 90, hubo una introducción rápida de diversos protocolos para la detección del ARN viral mediante la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). En su desarrollo se realiza la amplificación del fragmento genómico que comprende parte de los genes C-prM. Este fragmento está envuelto por una secuencia conservada entre todos los virus del Dengue, que permite la amplificación genómica usando cebadores universales de Dengue. Esta técnica surgió a nivel mundial como un nuevo estándar oro, ya que tiene un tiempo de respuesta rápido y puede distinguir entre los serotipos de Dengue. Sin embargo, se requiere equipos sofisticados y personal experimentado, lo que la hace poco práctica para laboratorios con recursos limitados (Lopez-Jimena y col., 2018; Najioullah y col., 2014).

En el año 2000, se desarrolló el primer ELISA capaz de detectar la proteína no estructural 1 (NS1). Esta como ya se mencionó, se encuentra tanto en la membrana celular, también una forma hexamérica soluble de NS1, la cual se libera durante la infección Dengue y se acumula en altas concentraciones de hasta 50 µg/mL en suero humano. Además, esta proteína es altamente conservada y se puede detectar desde el día cero de la infección primaria y secundaria. Por ello, la presencia de NS1 en muestras clínicas humanas la convierten en un objetivo atractivo para el desarrollo de ensayos de diagnóstico (Pal y col., 2014). Una variación del sistema son las pruebas de casete, como lo es Dengue Dúo, donde se utiliza membrana de nitrocelulosa en lugar de la placa de poliestireno, la cual presenta limitante en su sensibilidad (Anexo 11).

En la Tabla I, se presenta un resumen de las pruebas para el diagnóstico de Dengue. La confiabilidad del método se ordena a partir del aislamiento viral, su identificación genómica y por último la detección de antígenos virales y anticuerpos. Sin embargo, desde el punto de vista de accesibilidad a las poblaciones el orden se invierte (Acosta-Bas and Gómez-Cordero, 2005). De ahí que, la prueba más accesible en poblaciones marginadas es la serología para la detección de anticuerpos IgG e IgM, así como la proteína NS1.

Actualmente en México, el diagnóstico del Dengue se mantiene como una prioridad, dada la incidencia de esta enfermedad reemergente y el aumento en el número de casos graves confirmados. Hasta el momento RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) es considerado el estándar de oro en la identificación del virus, pero su utilización se ve limitada en grandes brotes debido a su elevado costo y a la baja disponibilidad (Acosta-Bas and Gómez-Cordero, 2005; Ahmed and Broor, 2014).

Tabla I. Tipos de pruebas diagnósticas del virus del Dengue.

Tipo de Diagnóstico	Muestra y procesamiento	Indicaciones	Limitaciones
RT-PCR	Suero u otra muestra clínica (orina, tejido o líquido cefalorraquídeo).	Para detección temprana, durante la etapa febril.	A menudo negativo durante la presentación clínica tardía. Sensible a los procedimientos de laboratorio y requiere un estricto control de calidad. Solo se realiza en laboratorios regionales de referencia. Alto costo.
Detección antigénica de la proteína NS1	Suero, orina, líquido cefalorraquídeo, frotis orales. Prueba inmunocromatográfica rápida o prueba de ELISA	Para la detección durante la fase sintomática. Detección más prolongada. Sensibilidad menor el día 1.	Necesidad de equipo para pruebas ELISA. Sensibilidad menor en infección secundaria y en DENV-4.
Detección de anticuerpos IgM	Suero, orina, líquido cefalorraquídeo, frotis orales. Prueba inmunocromatográfica rápida o prueba de ELISA	Infección primaria elevada 5 y 7 días después de la enfermedad. A menudo detectable solo en la fase defervescente o incluso convaleciente. Se deben realizar pruebas repetidas.	Un aumento inespecífico de la exposición previa al Dengue o flavivirus relacionados (incluida la exposición a la vacuna). Las pruebas rápidas "no mostraron un rendimiento aceptable" en evaluación OMS.
Detección de anticuerpos IgG	Suero, orina, líquido cefalorraquídeo, frotis orales. Prueba inmunocromatográfica rápida o prueba de ELISA	Más útil como marcador de infección pasada en lugar de infección aguda. Niveles marcadamente altos pueden indicar una infección secundaria, pero no deberían ser el único criterio utilizado para el diagnóstico. La seroconversión es más confiable que una sola lectura aguda para indicar infección aguda	Puede confundirse con una exposición previa a flavivirus relacionados (incluida la exposición a la vacuna). Valores de umbral para niveles que indican infección secundaria no bien establecida.
Aislamiento del virus	Suero o tejido.	Prueba de investigación para la propagación de la tensión clínica y la caracterización fenotípica. No es tan sensible como la PCR. No dará un resultado dentro del marco de tiempo requerido para la gestión clínica.	Muchos recursos. Raramente útil clínicamente. La mejor opción para la viremia alta antes del inicio de la fiebre.

En el caso particular de México, en 1995 se conformó la Red para el Diagnóstico de Dengue, integrada por siete Laboratorios Estatales de Salud Pública, los cuales a su vez llevaron a la creación del Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágico del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Estos, fungían como laboratorios de referencia para la identificación por aislamiento del virus. A finales del año 2006, se introdujo la prueba antidengue en formato de ELISA basada en la identificación de la proteína NS1. Además, era útil para los primeros días de evolución de la enfermedad, aunque se reportaron falsos negativos.

El InDRE, creó un algoritmo de trabajo para el diagnóstico del virus, presentado en la Figura 2. En este algoritmo se presenta el flujo de trabajo para la detección del virus, el cual consiste en seleccionar cuál es la prueba más adecuada dependiendo del día en que se encuentre la infección. De 0 a 5 días del inicio de la fiebre, se procede a la utilización de la prueba ELISA para la detección de la proteína NS1, si ésta da positiva se confirma el caso. Pero en el caso de dar negativo y encontrarse en el periodo de 3 a 5 días de fiebre se confirma mediante una prueba para la detección de anticuerpos IgM. Por otro lado, en infecciones mayores a 6 días se inicia con la detección de anticuerpos IgM y en caso de un resultado negativo se realiza la detección de anticuerpos IgG. De igual manera, teniendo en cuenta los síntomas y presentando todas las pruebas negativas se realizan pruebas diferenciales (DGE, 2015).

Más recientemente, además del flujo de trabajo mencionado para los servicios de salud básicos, se utiliza otro algoritmo especializado para los laboratorios de referencia (Figura 3). Como se puede observar el algoritmo inicia con la detección del RNA viral mediante la técnica RT-PCR triplex en tiempo real, la cual es útil para diferenciación diagnóstica de Dengue, Zika y Chikungunya. En aquellos pacientes con un resultado negativo para estos virus, se realiza el descarte con otras enfermedades febriles incluyendo Malaria, Rickettsia y Fiebre amarilla (SSA and DGE, 2017).

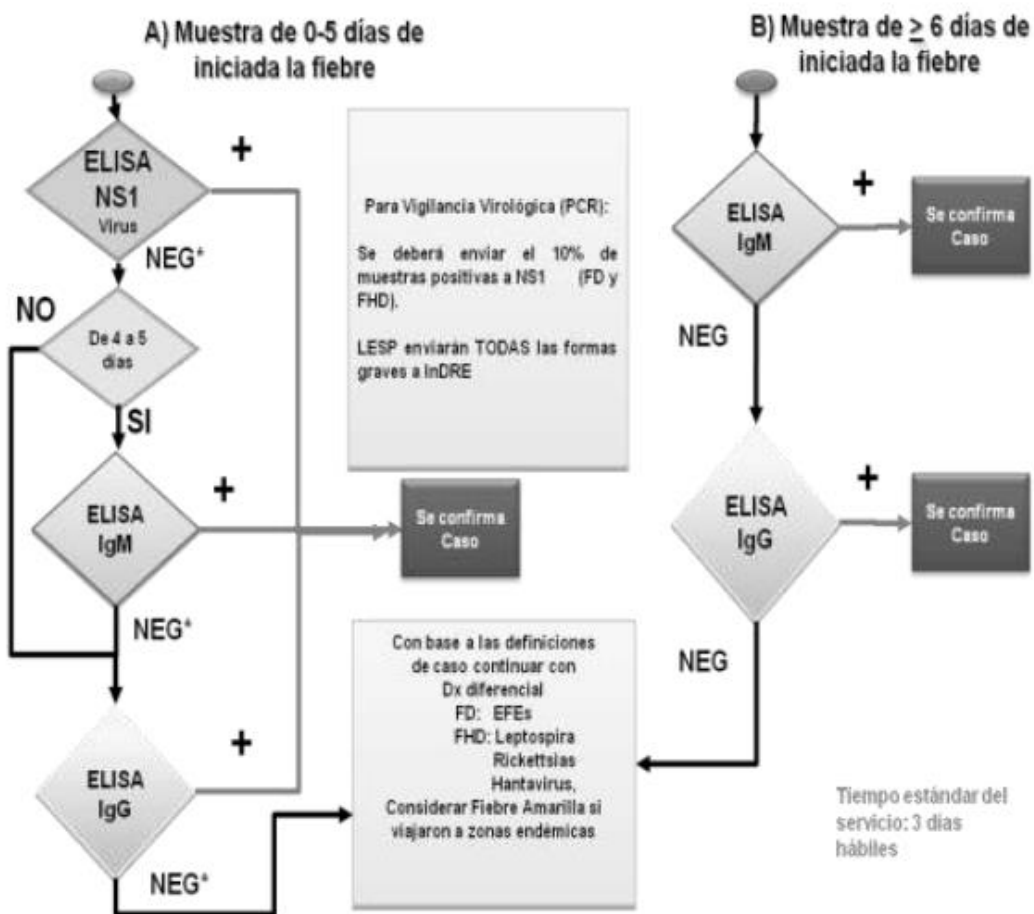


Figura 2. Algoritmo de diagnóstico para la detección del virus Dengue para servicios de salud diseñado InDRE. En la figura se presenta el flujo de trabajo considerando los días de infección (DGE, 2015).

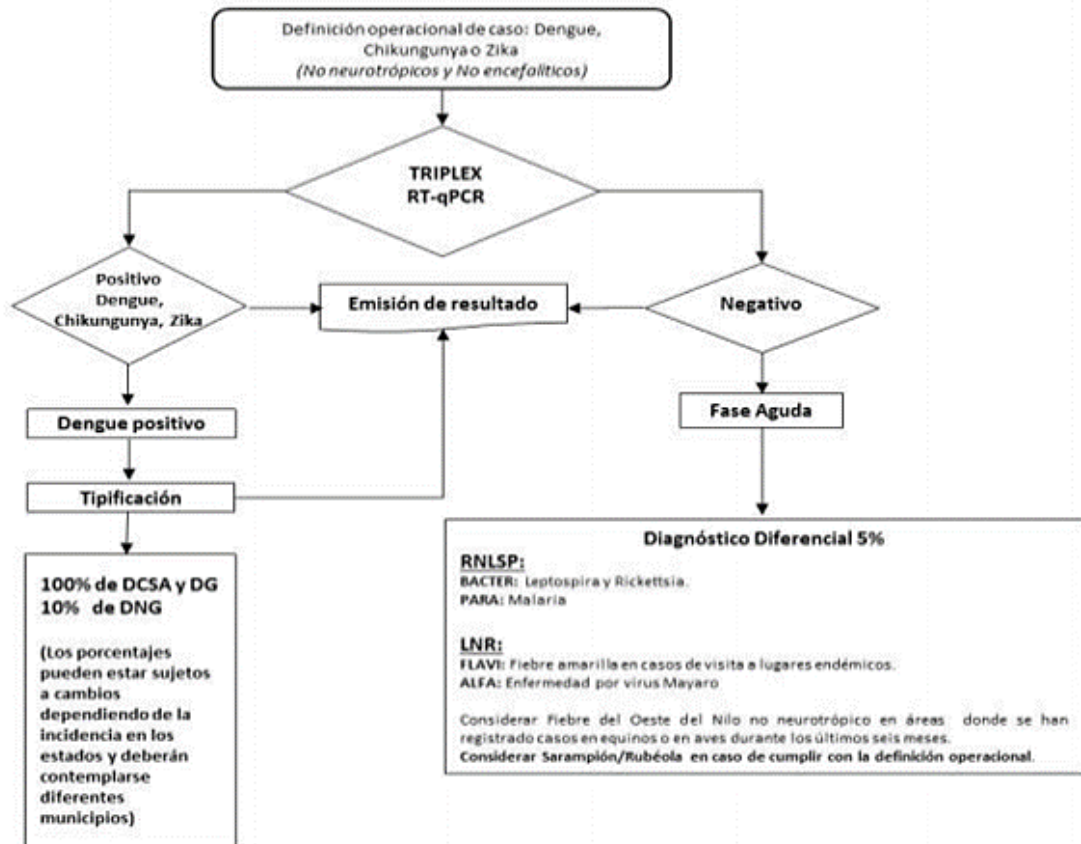


Figura 3. Algoritmo de diagnóstico para la detección del virus para laboratorios de referencia diseñado por el InDRE (SSA and DGE, 2017).

Algunas de las limitantes de la RT-PCR Trioplex es su uso exclusivo en los laboratorios de referencia, como los laboratorios estatales. En el caso particular de Sonora, existe un solo laboratorio estatal en la ciudad de Hermosillo que la utiliza. Esto fue constatado al aplicar una encuesta rápida a tres instituciones públicas (IMSS, ISTESSION e ISSSTE), así como tres laboratorios privados (Laboratorios Ramos, San José y Clínica CIMA). Todas las instituciones son importantes y de reconocido prestigio en la ciudad. Sin embargo, según la encuesta, estos laboratorios utilizaban pruebas serológicas de casete, mejor conocidas como Dengue Dúo. Estas pruebas detectan la proteína NS1 y anticuerpos IgG e IgM, y en ninguno de los casos reportaron el uso del RT-PCR Trioplex.

Al revisar las técnicas diagnósticas actuales podemos notar que no todas son accesibles, además existen problemas de sensibilidad, costo y de facilidad de uso. Varios grupos alrededor del mundo continúan trabajando en el desarrollo de metodologías que subsanen estas limitantes. Un área de oportunidad es el uso de la nanotecnología.

Nanotecnología

Las nuevas tendencias en investigación de enfermedades infecciosas virales incluyen la participación multidisciplinaria de especialistas y el uso de tecnologías emergentes en el área (Lechuga, 2010). Una de ellas es la nanotecnología aplicada en las ciencias de la salud, también llamada nanomedicina. Esta ciencia, presenta la posibilidad de trabajar con nanomateriales aplicados en usos biomédicos, la cual se postula como una de las ramas de la nanotecnología que mayor impacto social puede generar por sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas. Estas Nps presentan propiedades físicas, tanto eléctricas, ópticas, y magnéticas, que difieren del material en bruto (Yu y col., 2016). Además, presentan la capacidad de aumentar la especificidad de la prueba, haciendo más sencillo y económico el método. Se espera que en los próximos años la aplicación de las herramientas nanotecnológicas que se están desarrollando actualmente permitan la detección temprana de enfermedades así como su tratamiento (Verma, 2015).

La nanotecnología se define como “el desarrollo de ciencia y tecnología a niveles atómicos y moleculares, en la escala de aproximadamente 1-100 nm. La nanotecnología pretende alcanzar un conocimiento elemental del fenómeno o material que se estudia en escala nanométrica con la finalidad de crear y usar estructuras, que tengan nuevas propiedades y funciones debido a su tamaño” (Lechuga, 2010). Lo más interesante de la nanotecnología no es la posibilidad de trabajar con materiales a nanoescala, sino el cambio a veces radical, que sufren las propiedades físicas y químicas de la materia. Entre ellas se encuentran, la conductividad eléctrica, la resistencia, el color, o la elasticidad, entre otras propiedades, las cuales se comportan de manera distinta a como lo hace el material a macroescala (Grande, 2007).

Entre los nanomateriales con mayor relevancia en las últimas décadas se encuentran las Nps de óxidos de hierro, como la magnetita (Fe_3O_4) (Angulo y col., 2014; Arteaga y col., 2017). Estas Nps han sido ampliamente estudiadas debido a sus propiedades físicas, que han demostrado gran potencial para aplicaciones biomédicas. La reducción del tamaño de las partículas resulta en nuevas propiedades que difieren de aquellas del material macrométrico (Ramimoghadam y col., 2014). Además, otras de sus propiedades útiles para fines biomédicos es que, al generar una mayor superficie adquiere una mayor reactividad debido a que las Nps tienen un mayor número de sitios superficiales disponibles para la unión con otras moléculas (Lim y col., 2013). Uno de los objetivos de trabajar a nanoescala en áreas de detección biomédica es el buscar incrementar la sensibilidad del sistema. Generalmente los kits de diagnóstico utilizan una detección a micro o macro escala. Pero al trabajar en la nanoescala podemos identificar las enfermedades en sus estadios iniciales incrementando su sensibilidad ya que requerirá de concentraciones menores del antígeno para su detección (Cristea y col., 2017).

El grupo de investigación en Biofísica Médica del DIFUS, en colaboración con el grupo de Nanotecnología de la UDLAP y miembros de la RED PRODEP Nanomedicina y Salud, postularon la utilización de este nanomaterial para la detección de proteínas de Dengue. Las investigaciones iniciales fueron realizadas por Peter Polesnak y Andrea Díaz Gaxiola

a cargo de los doctores Miguel Ángel Méndez Rojas (UDLAP), Dra. Aracely Angulo Molina (UNISON) y Dr. Julio Roberto Reyes Leyva (CIBIOR), quienes trabajaron en la inmovilización de anticuerpos específicos contra proteínas del virus de Dengue en Nps de magnetita (Díaz-Gaxiola, 2016; Polesnak, 2014). Continuando con esta línea de investigación e incluyendo los avances de la investigación en la utilización de Nps magnéticas (Angulo-Molina y col., 2014; Arteaga-Cardona y col., 2016b) nos propusimos estudiar la capacidad colorimétrica y sensibilidad de nanoplataformas de hierro a base de magnetita para la detección de la proteína NS1 del virus de Dengue.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis, Funcionalización y Caracterización de Nanopartículas de Magnetita

Síntesis de Nanopartículas de Magnetita Fe₃O₄

Se realizó la síntesis de Nps de magnetita (Nps Fe₃O₄) por coprecipitación de dos sales de cloruro ferroso tetrahidratado (FeCl₂ · 4 H₂O, Cat: 2202997, Lot: MKBJ2807, 98%, SIGMA), y cloruro férrico hexahidratado (FeCl₃ · 6 H₂O, Cat: F2877, Lot: WXBB5679V; 98%, SIGMA), con una solución de hidróxido de amonio al 25 % (NH₄OH, Cat: 221228, Lot: SHBG1201V, 28-30%, SIGMA) y citrato de sodio como estabilizador (Na₃C₆H₅O₇, Cat: 54641, Lot: SLBM1808V, 99%, SIGMA), de acuerdo con lo reportado en la literatura con algunas modificaciones (Angulo et al, 2014; Arteaga et al, 2016b). Se usaron 1.233 g (4.562 mmol) de FeCl₃·6H₂O y 0.4261 g (2.143 mmol) de FeCl₂·4H₂O, con una relación molar 2:1, disueltos en 8 mL de agua tridestilada y agitación intensa. Se colocó en ebullición durante 30 minutos, con un sistema de reflujo. Seguido, se agregaron 2 mL de la solución de NH₄OH al 25 %, y 5 minutos más tarde, se añadieron 500 µL de una solución de citrato de sodio de una concentración de 500 mg / mL. La solución se dejó reaccionar por 60 minutos, en las mismas condiciones de ebullición y reflujo. Posterior a esto, se realizó una separación de las aguas madres mediante decantación magnética. Posteriormente se realizaron lavados con agua tridestilada y luego lavados con etanol en relación 1:1 y decantación magnética. Por último, fueron puestas a secar a vacío de 80 Kpa, 60 °C, durante 16 horas (Qu y col., 1999; Zhang and Zhang, 2005).

Funcionalización de Nanopartículas de Magnetita Fe₃O₄ con APTMS

Después de su síntesis, las Nps de Fe₃O₄ fueron redispersadas en 15 mL de tolueno anhidro (Cat: 244511, Lot: SHBC9582V, 99.8 %, SIGMA). Esta solución se colocó en agitación magnética intensa y se agregaron 35 µL de APTMS ((3-aminopropil) trimetoxisilano, H₂N (CH₂)³ Si (OCH₃)³) (Cat: 281778, Lot: BCBL6126V, 97 %, SIGMA) necesarios para obtener una solución con concentración final de 3 µM (Figura 4). La reacción se llevó

acabo a 60 °C por 4 horas, buscando recubrir las Nps de grupos amino terminales, los cuales fueron utilizados para el acoplamiento del anticuerpo. Posterior a esto, se procedió a hacer lavados con tolueno para eliminar todo el APTMS que no fue acoplado a la nanopartícula, luego de lo cual se realizaron lavados con agua tridestilada. Las Nps funcionalizadas fueron secadas a condiciones de vacío (80 Kpa), a 60 °C por 16 horas, con el fin de evitar la oxidación (Li y col., 2014).

Caracterización de Nanopartículas de Magnetita Fe₃O₄

Para la caracterización, se analizaron tres puntos importantes: tamaño, morfología y grupos funcionales. Para analizar el tamaño, se utilizó un analizador de distribución de tamaño de partícula basado en dispersión dinámica de luz (DLS) en el equipo Microtac, Nano-Flex Serial W3298 (Lim y col., 2013). Para conocer la morfología de las Nps, se utilizó microscopia STEM ((Scanning Electron Microscope of Field Emission, model Nova Nano SEM 200 Mark FEI), a una intensidad de 30 kV (Arteaga-Cardona y col., 2016b). Y para garantizar la silanización de la superficie de las Nps y la presencia de grupos funcionales que nos permitan acoplar otras moléculas a esta, las muestras se analizaron mediante análisis de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR). Para esto, se utilizó el equipo Cary 630 FTIR, Agilent Technologies FT, en el cual se realizó un barrido de 4000 nm a 400 nm (Angulo-Molina y col., 2014; Arteaga-Cardona y col., 2016a).

Producción de Proteína NS1

Cultivo Celular

Para este estudio, se utilizó la línea celular U937-DC-SIGN (ATCC® CRL-3253™) la cuales está compuesta por monocitos humanos transfectados con el gen de la proteína DC-SIGN; esta línea celular fue proporcionada por el Dr. Julio Reyes en el CIBIOR (Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Metepec, Puebla, México). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂.

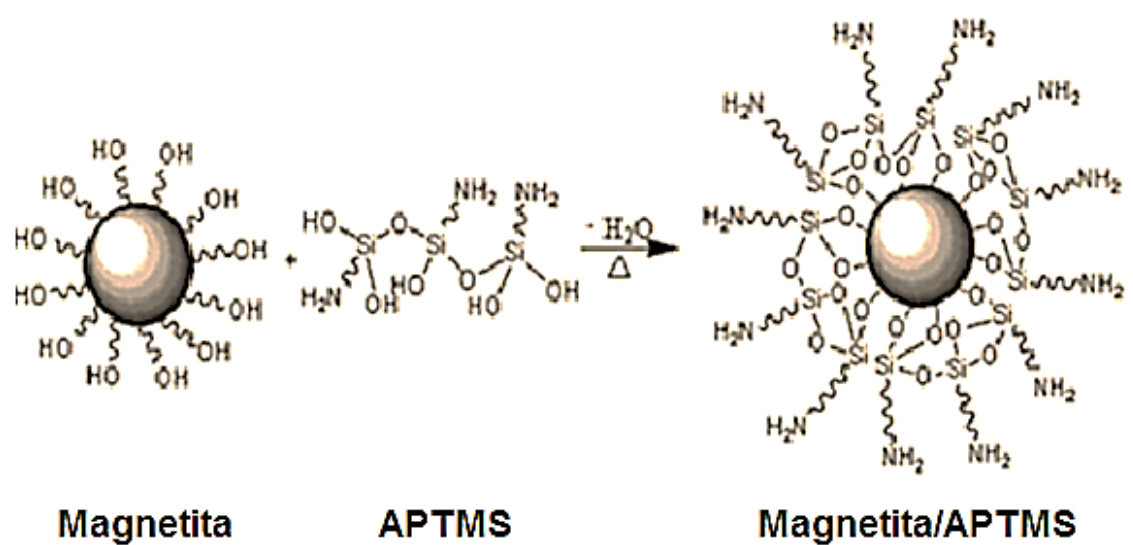


Figura 4. Esquema que representa el proceso de silanización superficial de la Np de magnetita.

Protocolo de Producción de Proteína NS1 por Infección del Cultivo

Se colocaron células U937.DC.SIGN, en cajas de cultivo de 25 mm³, en condiciones de crecimiento, hasta llegar a confluencia. A continuación, fueron contadas en cámara de Neubauer, con el objetivo de conocer la cantidad de virus necesario para la infección del cultivo. Las células fueron centrifugadas en dos tubos a 232.32 x g, 27 °C por 5 minutos y se resuspendieron en 1 mL de suero RPMI sin suero (centrifuga Allegra X-15R, Beckman Coulter). Un tubo fue infectado a 1 MOI (Multiplicity of infection) del virus del Dengue del serotipo 2, de un inóculo de concentración 6x10⁸ UFP/mL, el segundo tubo fue tratado bajo las mismas condiciones, pero sin ser infectado, con el fin de utilizarse como control. Se dejaron incubar por una hora a 37 °C y 5 % de CO₂, para después a centrifugar a 232.32 x g, 27 °C por 5 minutos, descartando el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en RPMI al 5 % SFB, ajustando la cantidad de células a una concentración de 1,000,000 células/mL, y se colocaron en cajas de cultivo p25, incubándose a 37 °C y 5 % de CO₂ por 24 horas. Pasado el tiempo, se procedió a centrifugar a 2845.92 x g, a 27 °C por 5 minutos, donde se recuperó el sobrenadante el cual contendría la proteína NS1 (Klomporn y col., 2011; Kraus y col., 2007).

Cuantificación de la Producción de Proteína Total

Para conocer la cantidad de proteína total producida en el sobrenadante de la línea celular U937.DC.SIGN, se procedió a cuantificar mediante el método de Bradford, utilizando el reactivo Quick Start™ Bradford 1X Dye Reagent (Cat: 500-0205, Lot: 200005735, BIO-RAD). Para esta prueba se tomaron 5 µL de la muestra y 250 µL del reactivo, el cual se dejó reaccionar por 15 minutos y su lectura se llevó a cabo en lector de microplaca a 570 nm. Se analizó el sobrenadante infectado y sobrenadante control, los cuales se compararon contra una curva estándar de albumina (Orna and Tsaffir, 2010).

Análisis del Sobrenadante por Electroforesis SDS-PAGE

Teniendo en cuenta que la proteína NS1 en medio extracelular se presenta en forma de dímero con un peso aproximado de 96 kDa, se procedió a analizar el perfil electroforético del sobrenadante celular de las células U937.DC.SIGN en busca de la presencia de dicha proteína. Para esto, se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 12 % en condiciones reductoras, y analizando el sobrenadante celular infectado de manera nativa y en condiciones desnaturalizantes. Además, como controles se incluyó sobrenadante celular preinfectado y sobrenadante celular control. Los geles preparados tuvieron un grosor de 0.75 mm y fueron cargados con 35 µg de proteína. Como referencia, se utilizaron 10µL de marcador de peso molecular (SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Broad Range, Cat. No. 161-0317). El corrimiento se realizó a 100 volts por hora y media, para después ser teñido mediante Azul de Coomassie (He, 2011; Laemmli, 1970). El perfil de bandeo, abundancia relativa y cálculo de masa molecular se realizó mediante el uso de fotodocumentador (XR + Imaging System, Gel Doc, Molecular Imager, BIO-RAD).

Ensayo de Inmunodetección de la Proteína NS1

Formación del Conjugado Nps Fe₃O₄ – Ab

Se evaluaron 3 condiciones de trabajo para el desarrollo del inmunoconjugado (Figura 5), donde 1 mL de una suspensión de Nps Fe₃O₄ a una concentración de 4 mg/mL disuelto en PBS 1X pH=7.3, se mezcló con 20, 40 y 60 µL de una dilución 1:30 del anticuerpo ab41616 (ms mAb [DN2] Dengue virus NS1 glycoprotein antibody, Lot: GR256259-1, abcam[®], concentración stock comercial de 0.705 mg/mL) (Balmaseda y col., 2003). La reacción de conjugación se llevó a cabo por una hora a temperatura ambiente, con movimiento ocasional. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados, decantando magnéticamente y resuspendiendo en 1 mL de PBS 1x. Una vez que se tuvo el conjugado entre el anticuerpo y las Nps magnéticas, se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su uso, para evitar que el anticuerpo se degrade (Sassolas y col., 2012).

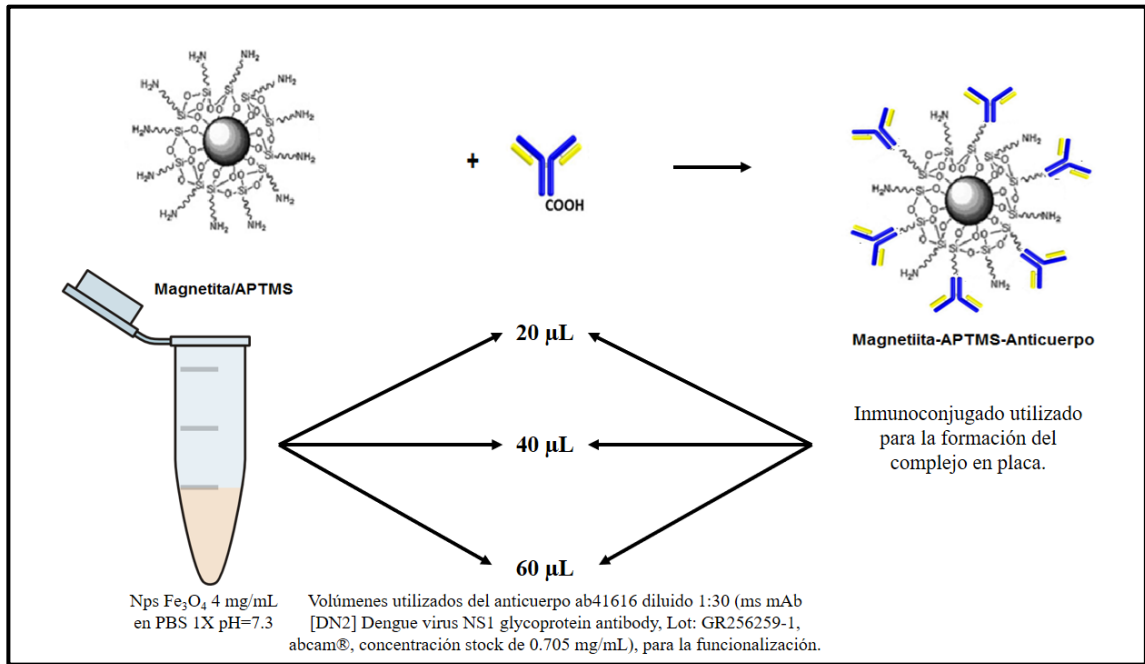


Figura 5. Esquema que representa la conjugación entre la Np magnética silanizada y el anticuerpo. Para la formación del inmunoconjugado, se probaron diferentes cantidades de anticuerpos antidengue AB41616 a una concentración inicial del stock comercial de 0.705 mg/mL.

Preparación de Microplaca

Para este ensayo, se utilizaron placas de ELISA de 96 pozos de la marca BioLegend (Lot: B211303), a las cuales se les adicionó 100 μ L de una dilución 1:30 del anticuerpo ab42316 (ms mAb [DN2] Dengue Virus NS1 glycoprotein antibody Lot: GR280343-1, abcam[®], concentración del stock comercial 1.2 mg/mL) (Balmaseda y col., 2003); la placa se incubó por 24 horas a 4 °C, realizando 3 lavados con PBS 1X. Los sitios de unión disponibles en la placa se bloquearon con una solución de bloqueo que contenía un 5 % de albumina, de la cual se colocaron 100 μ L en cada pozo y se dejó incubar 1 hora, para posteriormente realizar 6 lavados con PBS 1X (Qu y col., 1999).

Reconocimiento de la Proteína NS1

Se procedió a realizar el reconocimiento de la proteína NS1, utilizando el sobrenadante celular de 24 horas en cultivo de la línea celular U937-DC-SIGN infectado con el virus de Dengue. Se colocaron 100 μ L del sobrenadante diluido 1:5 a cada pozo. Además del sobrenadante infectado se utilizaron los sobrenadantes preinfectado y control, para observar su interacción con el sistema. Una vez montada la placa, se dejó interactuar por 1 hora a temperatura ambiente, en agitación ocasional. Posterior a esto, se realizaron 3 lavados con PBS 1X, con la finalidad de quitar los productos que no se unieron al anticuerpo (Sassolas y col., 2012). La esquematización del ensayo se presenta en la Figura 6.

Reconocimiento de la Proteína NS1 Mediante el Conjugado Nps Fe₃O₄@Si-Ab

Para determinar si la proteína NS1 se unió al anticuerpo ab42316 pegado a la placa y revelarlo, se vertieron 100 μ L del inmunoconjugado (Nps Fe₃O₄@Si-Ab) en cada pozo de prueba. Se incubó por 1 h a temperatura ambiente y agitación ocasional. Al finalizar el periodo de incubación se realizaron lavados con PBS 1X, con la finalidad de eliminar cualquier conjugado que no se hubiera unido a la proteína y evitar falsos positivos (Yen y col., 2015).

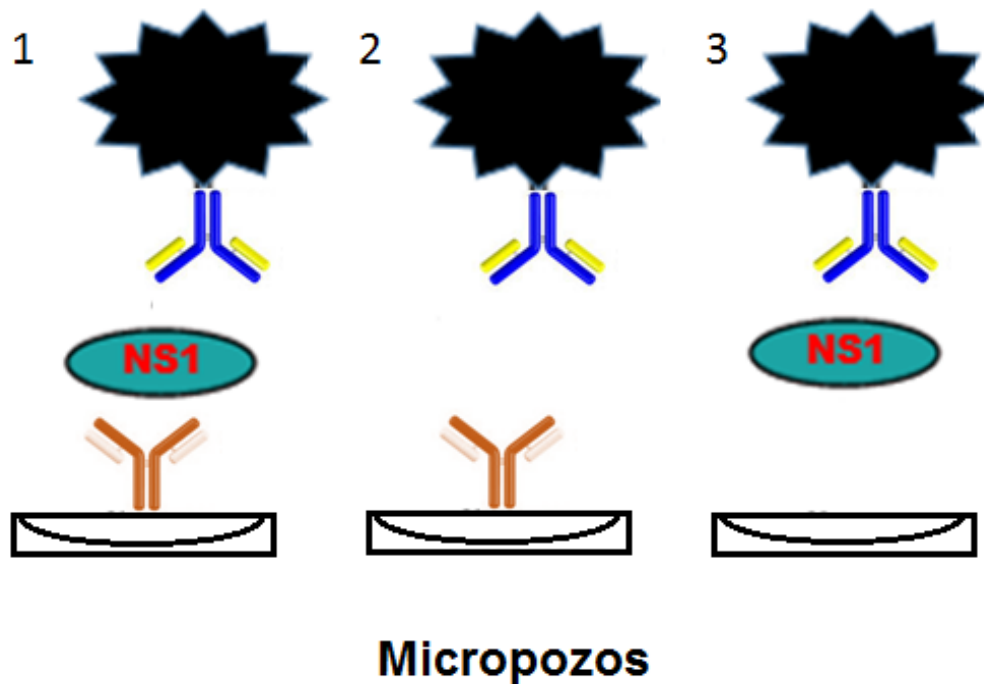


Figura 6. Esquema de formación de complejo de inmunodetección. (1) Representa la unión tipo sándwich entre Nps-Ab, la proteína NS1 y el anticuerpo inmovilizado en el micropozo; además se presentan los resultados negativos del método donde (2) el NS1 no sería reconocida por el complejo SPION; y (3) el caso donde no hay anticuerpo presente unida a la placa y la nanopartícula no puede unirse.

Revelado de la Placa

La placa se reveló mediante la técnica de azul de Prusia (llamada también tinción de Perls), la cual detecta iones Fe^{3+} en tejidos y soluciones. Para la reacción, se agregaron 100 μL del reactivo de Perls a cada pozo, se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se pudo observar un cambio de color a los 10 minutos. Además de este método cualitativo, se realizó una medición de su absorbancia a 450 nm de la placa, mediante un lector de microplaca Multiskan MCC/340, ThermoFisher Scientific (Ahmed y col., 2017; Dobretsov y col., 2015; Leekha y col., 2016). La tinción de Perls se basa en la interacción del ferrocianuro férrico (Reactivo de Perls) con los iones Fe^{3+} presentes en el inmunoconjugado y que provienen de las Nps de magnetita (Fe_3O_4), generando un cambio de color que se observa a simple vista.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

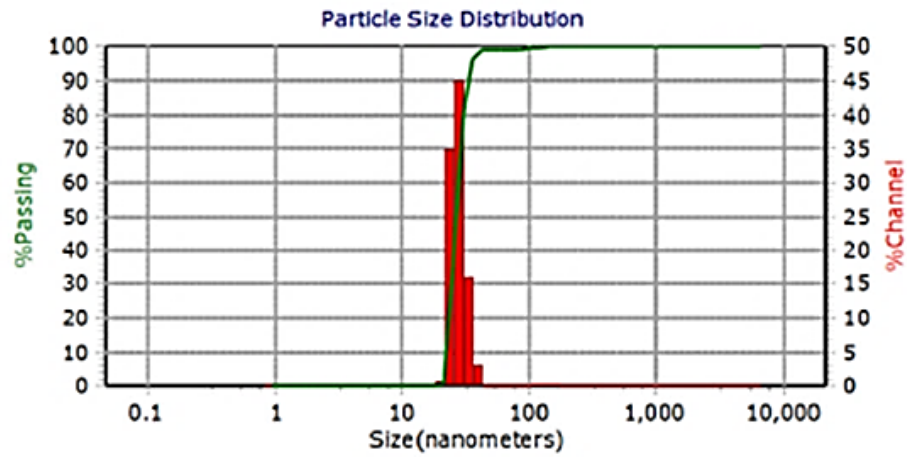
Caracterización de Nps Fe₃O₄

Tamaño

La determinación del tamaño de las Nps es de gran importancia cuando están planeadas para usos biomédicos, en particular cuando éstas serán recubiertas con grupos funcionales que permitirán su interacción con células, tejidos o componentes orgánicos. En nuestro estudio caracterizamos las Nps antes y después de funcionalizar. Para las Nps sin funcionalizar se determinó por DLS un rango de distribución de tamaño de 26.9 nm \pm 8, y una población monodispersa, y dentro del rango esperado para el estudio (Figura 7a).

En nuestro proyecto, las Nps posteriormente se funcionalizaron, mediante un aminosilano inmovilizado superficialmente para favorecer la unión con los anticuerpos (figura 4) y formar así el inmunoconjugado en la reacción final. Como parte de la caracterización, el estudio del DLS se hizo antes y después del proceso de silanización para conocer el crecimiento en cada parte del proceso. En la Figura 7b se observa que el tamaño final de las Nps fue de 52.7 nm \pm 27, con una población monodispersa, encontrándose aun dentro de los rangos requeridos para usos biomédicos, cumpliendo así con las características que buscábamos para nuestro estudio. Las Nps magnéticas con un diámetro de entre 1 y 100 nm han sido ampliamente utilizadas con fines biomédicos. Además, en este rango también se toma en cuenta que la propiedad de superficie-volumen es inversamente proporcional a su diámetro. En este sentido, cuanto menor sea su volumen, mayor será la superficie que éstas presenten en comparación al material macroscópico. Esto nos es útil para una mayor reactividad en su superficie y la unión de otras moléculas tanto orgánicas como inorgánicas (Hufschmid y col., 2016; Lim y col., 2013; Xie y col., 2016).

a)



b)

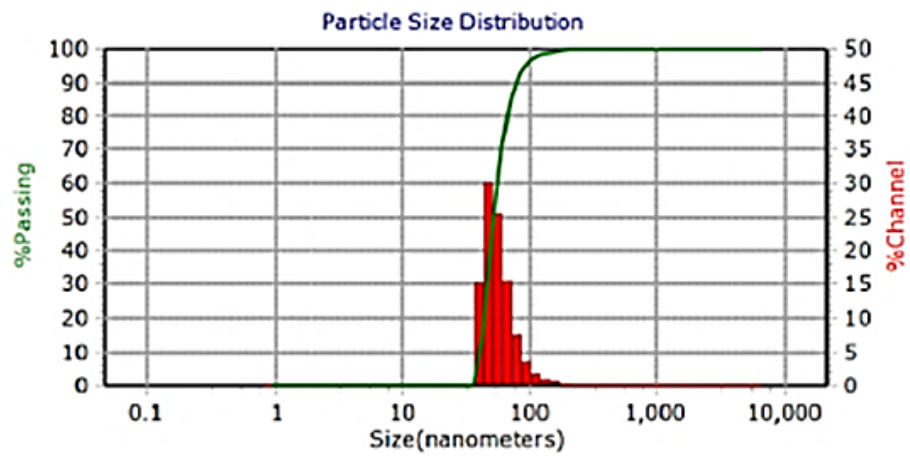


Figura 7. Gráficas de distribución de tamaño de partícula por DLS. a) Población monodispersa de Nps Fe_3O_4 , $26.9 \text{ nm} \pm 7$. b) Población monodispersa de Nps funcionalizadas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si}$, $52.7 \text{ nm} \pm 27$. Ambas Nps se encontraron dentro de los rangos recomendados para usos biomédicos.

Morfología

Con la finalidad de conocer la morfología de las Nps y a su vez corroborar el tamaño estimado de estas, se utilizó microscopía electrónica de transmisión y barrido (STEM). A diferencia de la microscopía de transmisión (TEM), el STEM tiene la capacidad de preservar la muestra, ya que detecta los electrones transmitidos, pero a través de un barrido en lugar de un haz fijo sobre la muestra, lo que evita su incineración. Este ensayo reveló que el material que sintetizamos está constituido principalmente por Nps esféricas de aproximadamente $15 \text{ nm} \pm 4$ (Figura 8). Este resultado estuvo en concordancia con los obtenidos para la distribución de tamaño de partícula en solución mediante el análisis de DLS. Stephen y colaboradores (2011), mencionan que las Nps magnéticas de tamaños menores de 20 nm, presentan una alta magnetización y remanencia igual a cero (superparamagnetismo), siendo esta una propiedad con gran potencial de uso y la cual buscábamos para nuestro estudio.

Otros estudios sugieren que las Nps pequeñas con una morfología esférica homogénea son más biocompatibles (Ghazanfari y col., 2016). Así mismo, hay informes que demuestran que la forma de las Nps puede afectar o beneficiar la interacción y la reactividad con otras moléculas con las que pueden unirse. En el caso de las Nps esféricas, tamaños reducidos promueven un mejor acoplamiento e interacción, así como, en Nps magnéticas con estas mismas características se ha observado que presentan momentos paramagnéticos (Bloemen y col., 2012; Lassenberger y col., 2017; Stephen y col., 2011). Aunque los mecanismos no son claros aun, se cree que están relacionados con la facilidad de reacción de los electrones en las Nps esféricas (Shah y col., 2015). Además, una de las propiedades más importantes de las Nps esféricas, es dada por una mejor capacidad de ser funcionalizadas en comparación de otras morfologías, debido al tipo de acoplamiento que presentan. Por lo tanto, para el propósito de nuestro estudio, la obtención de Nps esféricas de hierro a partir del método de preparación planteado fue conveniente.

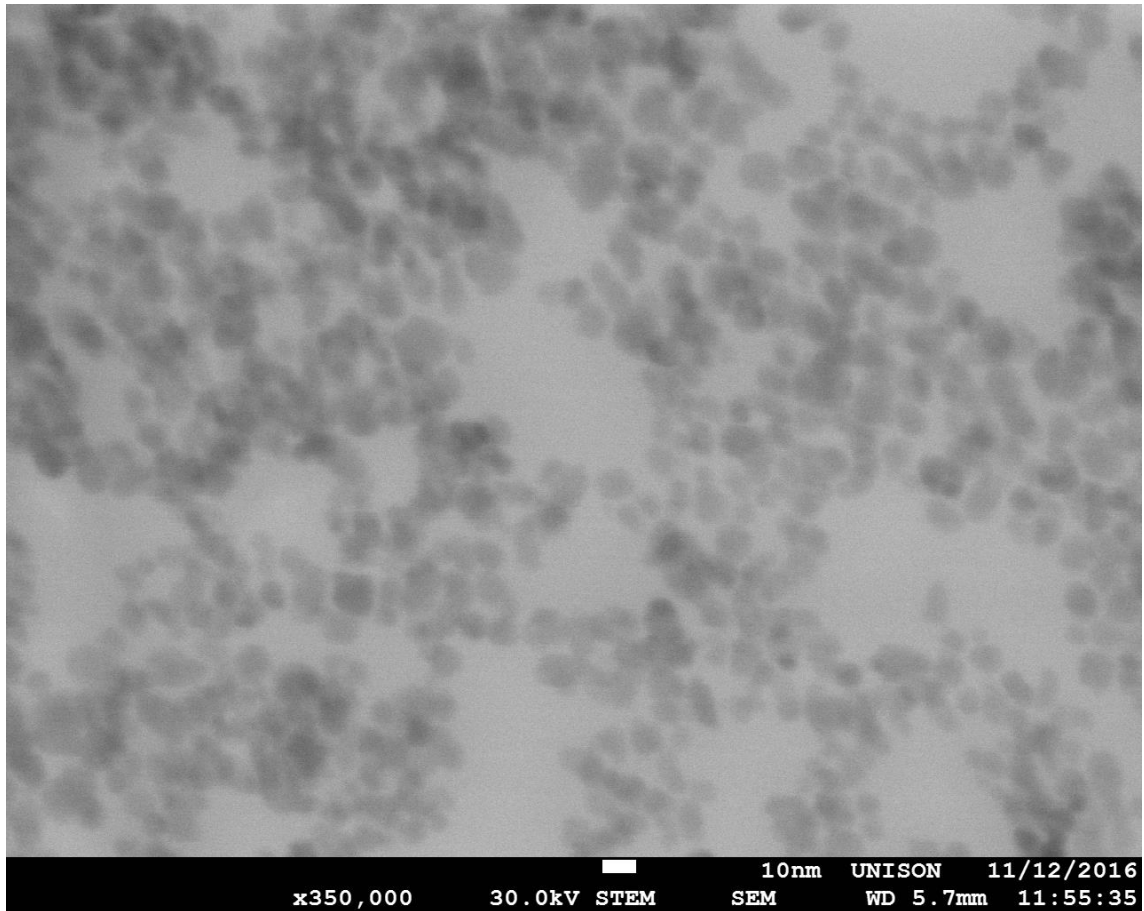


Figura 8. Microscopía STEM de Nps de Fe_3O_4 . Se observan nanopartículas esféricas de aproximadamente $15 \text{ nm} \pm 4$, mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido (STEM).

Composición

El análisis FT-IR se realizó para observar los grupos funcionales característicos del material, siendo el más característico la interacción de Fe-O a 580 cm^{-1} y sus interacciones con el agua. Asimismo, este análisis sirvió para corroborar la correcta silanización de las Nps. Trabajos anteriores han reportado la funcionalización de las Nps de hierro con reactivos del tipo de silanos para permitir la unión de otras moléculas, así como la modificación de la reactividad superficial. En este caso, lo hicimos para unirlos a anticuerpos antidengue. La inmovilización del grupo silano puede detectarse a través de la aparición de una vibración a 1100 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones Si-O-Fe, que son parte del recubrimiento con APTMS (Angulo-Molina y col., 2014; Mahdavi y col., 2013). Esta vibración estuvo presente en el espectro de las Nps como se muestra en la Figura 9.

La importancia de esta banda radica en que corrobora el recubrimiento de las Nps por grupos silano y, por tanto, la disponibilidad de terminaciones de tipo amina ($-\text{NH}_2$) en la superficie de la nanopartícula. La importancia del grupo NH_2 radica en que permite formar un enlace, tipo peptídico, con los grupos carboxilos ($-\text{COOH}$) presente en la fracción cristalizable (Fc) de los anticuerpos utilizados. Este enlace covalente ($-\text{CO}-\text{NH}-$) a pesar de ser un enlace sencillo, posee una serie de características que lo aproximan más a un doble enlace gracias a que el nitrógeno es menos electronegativo que el oxígeno. Por este motivo el enlace es rígido y no presenta giro, lo que provoca que los átomos implicados se sitúen en el mismo plano (Benítez y col., 2008). Se ha reportado, que los grupos silano, además de permitir la unión con anticuerpos, también pueden mejorar la estabilidad de las Nps, evitando la aglomeración (Li y col., 2014).

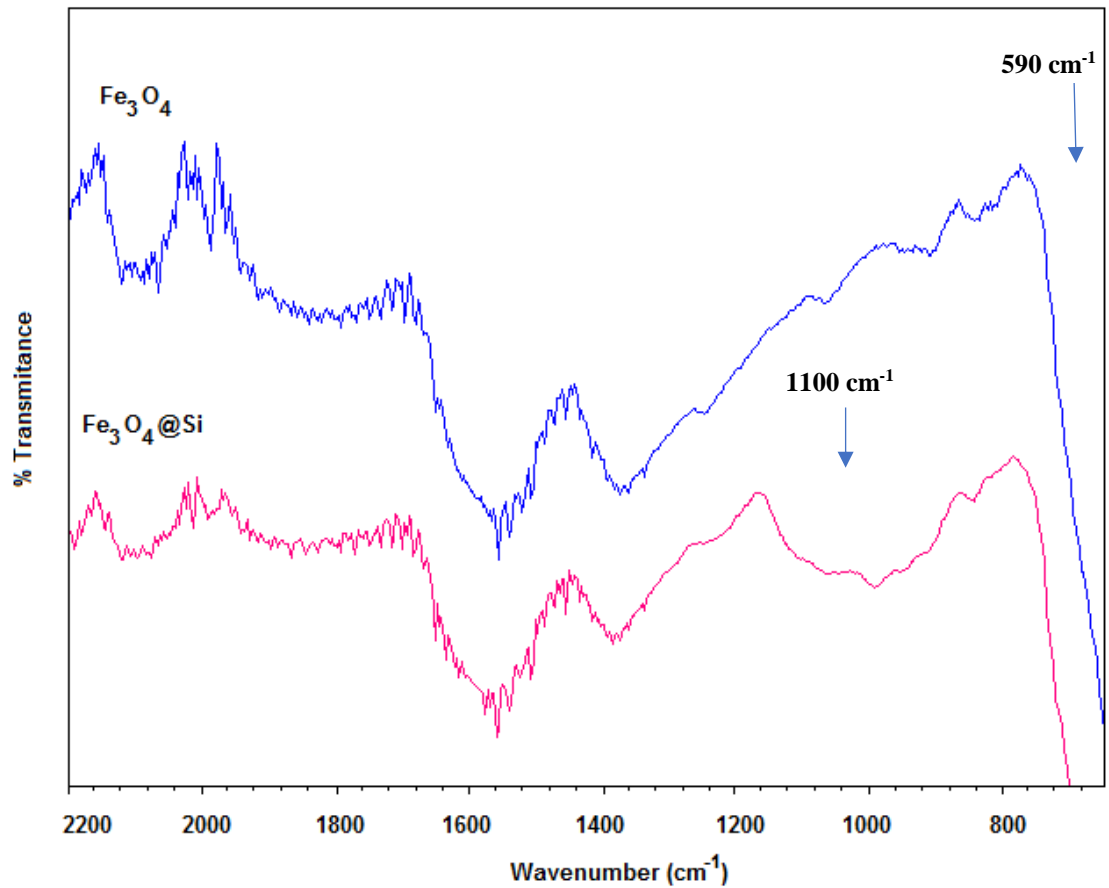


Figura 9. Espectro de infrarrojo que compara las Nps de Fe₃O₄ sin funcionalizar (línea superior) y Nps de magnetita funcionalizadas Fe₃O₄@Si (línea inferior). Se muestra la banda típica de este compuesto a 590 cm⁻¹, correspondiente a la tensión Fe-O en ambas muestras, así como la interacción a 1100 cm⁻¹ correspondiente a Si-O-Fe que forman parte del recubrimiento de la Fe₃O₄@Si.

Producción de Proteína NS1

Para la producción de proteína NS1 se utilizaron 3,000,000 de células U937.DC.SIGN resuspendidas en 1 mL de medio RPMI sin suero, infectado con 5 μ L de un inóculo del virus (DENV2), a una concentración de 6×10^8 UFP/mL, calculándose a 1 multiplicidad de infección (MOI). Después de seguir el procedimiento indicado en la sección de Metodología y en los Anexos, se obtuvieron 3 mL de sobrenadante donde está la proteína NS1, el cual fue conservado a 4 °C hasta su utilización. A pesar de que los estudios del virus del Dengue se basan en cultivos de la línea celular de mosco C6/36, nuestro grupo de investigación optó por la utilización de la línea celular U937.DC.SIGN. Esto debido a que esta línea son monocitos humanos, lo cual acercaría al trabajo a un entorno más similar al que buscamos utilizar, el cual es el suero de pacientes infectados. Basándonos en la medicina traslacional, buscamos el encaminar el conocimiento de las ciencias básicas para producir este método y así abarcar un nuevo enfoque hacia diagnósticos de la enfermedad (Becú-Villalobos, 2014).

Cuantificación de Proteína Total

Una vez realizado el proceso de producción, se cuantificó la proteína total en el sobrenadante infectado y sobrenadante control por el método de Bradford. La concentración de proteína total fue de 3,544.93 μ g/mL y 3,190.26 μ g/mL respectivamente (Anexo 4). Seguido a esto, por diferencia se obtuvo una concentración de 354.66 μ g/mL de proteína a favor en el sobrenadante infectado, como se muestra en la Tabla II.

Detección de la Proteína NS1 por Electroforesis SDS-PAGE

Con el fin de evidenciar la presencia de la proteína NS1 dentro del sobrenadante infectado de la línea celular U937.DC.SIGN, se procedió a realizar un corrimiento electroforético SDS-PAGE al 12 %, en condiciones reductoras, no desnaturalizantes (Anexo 5). En el cual se cargaron 10 μ L de sobrenadante infectado y sobrenadante control, correspondiente a 35 μ g y 31 μ g de proteína, respectivamente.

Tabla II. Cuantificación de proteínas totales en sobrenadantes de células U937.DC.SIGN.

Muestra	Concentración $\mu\text{g/mL}$
Sobrenadante Infectado	3544.933
Sobrenadante Control	3190.267
Diferencia*	354.667

* Producción total de proteína; sobrenadante infectado proviene del cultivo U937.DC.SIGN infectado con DENV2 por 24h a 1 MOI; Sobrenadante control fue obtenido de un cultivo similar, pero sin infección.

En la Figura 10, se muestra el perfil electroforético de los sobrenadantes de la línea celular, donde observa una serie de bandas similares en ambos carriles, a excepción de una banda de aproximadamente 90 kDa en el sobrenadante infectado. Esta banda, corresponde al peso reportado en trabajos previos para la proteína NS1 en su forma dimérica. La proteína NS1 tiene un peso aproximado de 48 kDa, pero en su forma dimérica tiene un peso estimado de 96 kDa. El dímero es la estructura típica de esta proteína, ya que es la forma más común en que es liberada de la célula al medio extracelular. La presencia de esta banda nos corroboró la presencia de NS1 en el sobrenadante infectado (Avirutnan y col., 2006; Flamand y col., 1999; Gutsche y col., 2011). Este fue el sobrenadante que se utilizó en todos los estudios posteriores.

Una vez obtenido el perfil electroforético, se realizó un análisis por densitometría para analizar el porcentaje de dicha banda y determinar la concentración estimada de proteína NS1 en el sobrenadante infectado. La banda de 91.6 kDa fue la que difirió entre las corridas, presentando una densidad de banda de 3.7 %. Teniendo en cuenta la cantidad de proteína total, se procedió a estimar la cantidad de proteína equivalente a esta banda, obteniendo una concentración de 131.16 $\mu\text{g/mL}$, la cual correspondería a la concentración de proteína NS1 presente en el sobrenadante de manera dimérica (Anexo 6). Los resultados del análisis densitométrico se presentan en la Tabla III.

Diseño de Nanoplateformas para la Detección de Proteínas NS1

Evaluación del Sistema

Los estudios preliminares para el diseño de la nanoplateforma utilizada en este trabajo iniciaron en el 2014 (Díaz-Gaxiola, 2016; Polesnak, 2014). Tomando en cuenta estos trabajos y para determinar la cantidad adecuada del anticuerpo antidengue para inmunoconjugarlo con las Nps, se utilizaron tres volúmenes del anticuerpo: 20, 40 y 60 μL de una dilución 1:30 del anticuerpo ab41616, concentración inicial de la solución stock 0.705 mg/mL (cálculos Anexo 7). Después de montar el ensayo descrito en la metodología

y revelar la reacción final con el reactivo Perls, se observó un cambio de color azul debido a que el inmunoconjugado fue capaz de interactuar con la proteína NS1 y quedó unido a la placa. Esta inmunodetección fue evidenciada con el ferrocianuro potásico del reactivo de Perls, el cual interactúa con el hierro de las Nps que se quedaron unidas al sistema al reconocer la proteína. En la reacción se generan depósitos de ferrocianuro férrico, siendo estos los causantes del cambio de color. Además, se observó que el cambio de color era proporcional a la cantidad de anticuerpo utilizada. Para fines de este estudio seleccionamos el volumen de 60 μ L de la solución de anticuerpo (diluido 1:30), al permitir la detección a simple vista (Figura 11a). Asimismo, en la segunda fila de la Figura 11a, no se observó ningún precipitado azul, lo que corrobora que este sistema no generó complejos con el anticuerpo irrelevante (anti-mouse, goat pAb to Ms IgG (HRP) ab97023 Lot:GR45780-7, abcam[®]), incluso cuando la proteína y las Nps estaban presentes.

Por otro lado, en la Figura 11b, se muestra el desarrollo del sistema, pero utilizando el sobrenadante de células no infectadas donde no existe la proteína NS1, en el cual no se observó ninguna reacción. Lo anterior demuestra que el conjugado Nps-anticuerpo del sistema no interactúa con la placa en ausencia de reconocimiento de la proteína específica, y confirma que el sistema no presentó falsos positivos en la realización del ensayo.

Además, se realizó una magnificación de los pozos (cámara ZEISS Axiocam IC objetivo 1 X), donde se observó la presencia de depósitos de ferrocianuro de férrico, los cuales fueron precipitados a partir de la inmunodetección de la proteína del virus, y así evidenciando los sitios donde fue detectada (figura 11c). También, se realizó el aumento de un pozo control, utilizando el sobrenadante de células U937.DC.SIGN no infectadas, donde no se observó la formación de precipitados (Figura 11d).

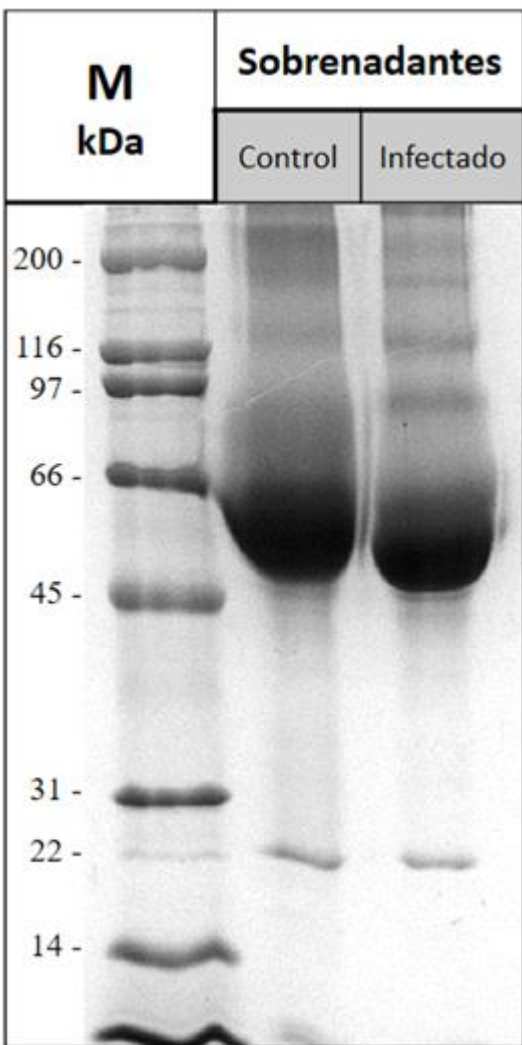


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida de sobrenadantes U937.DC.SIGN. Se muestra el perfil electroforético de los sobrenadantes, mostrándose en el carril 1 el marcador de masa molecular (M), y en los carriles 2 y 3 se presenta el sobrenadante control y sobrenadante infectado, respectivamente, siendo la banda de 91 kDa la de nuestro interés.

Tabla III. Análisis densitométrico de sobrenadantes de la línea celular U937.DC.SIGN.

No. Banda	kDa	SNC	SNI
		% de Banda	% de Banda
1	200	3.4	1.0
2	198	1.6	1.0
3	131.9	1.2	2.6
4	91.6	-	3.7
5	55.8	87.3	85.8
6	44.3	1.6	2.5
7	21.4	2.8	3.3
8	6.5	2.3	0.3

SNC: Sobrenadante Control; SNI: Sobrenadante Infectado.

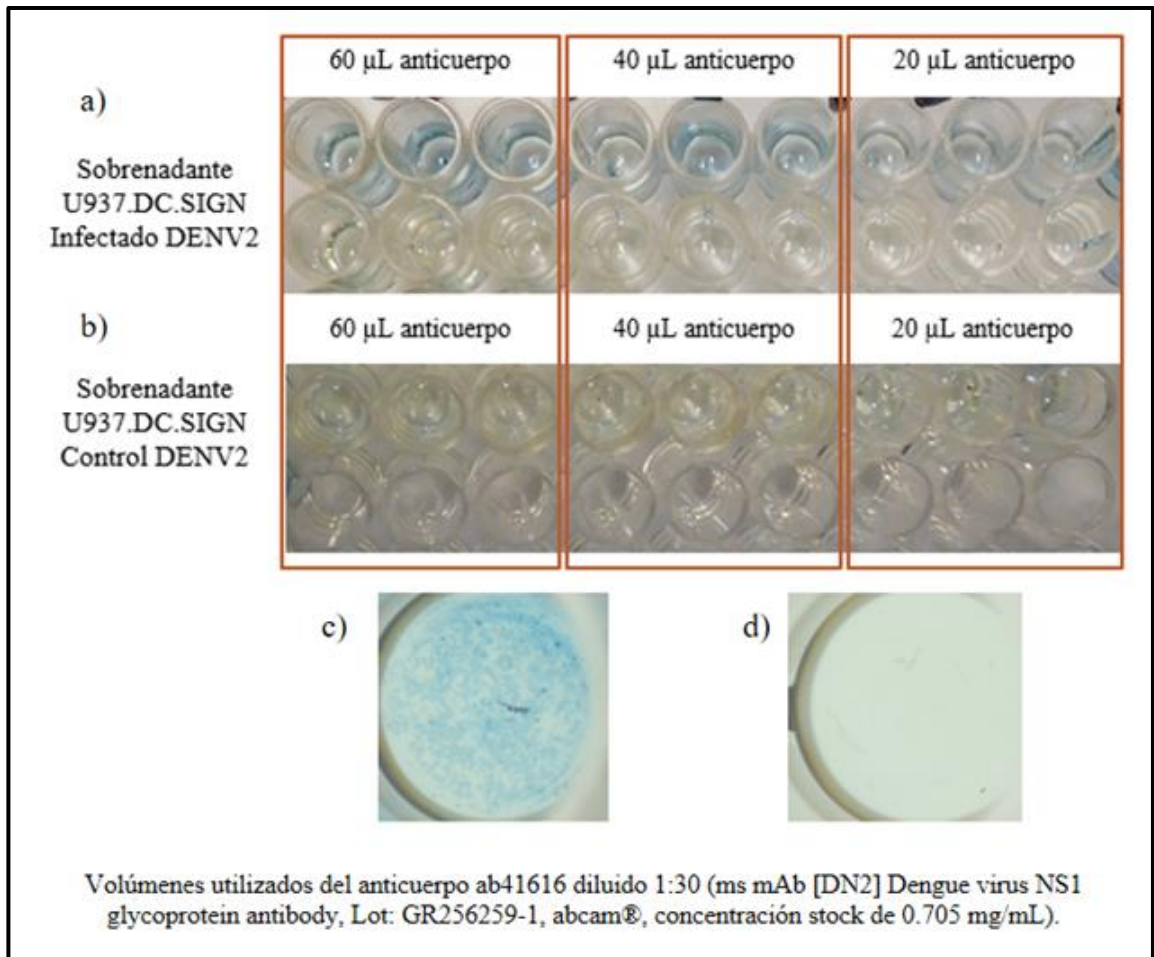


Figura 11. Evaluación del diseño del inmunoconjugado para la detección de proteína NS1. a) presenta los resultados de inmunodetección evidenciados por la reacción de Perls, por cambio de color. Así mismo, b) muestra la evaluación del conjugado en ausencia de la proteína. También se presenta la formación de los precipitados de ferrocianuro férrico evidenciando la reacción (c), y el sistema en ausencia de la proteína NS1 (d).

Reproducibilidad del Sistema

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el sistema, se procedió a evaluar la reproducibilidad del ensayo. Esto se realizó mediante tres ensayos, con muestras por triplicado, en el cual se utilizaron como controles el sobrenadante preinfección proveniente del cultivo U937.DC.SIGN, y sobrenadante control (No infectado) . En la Figura 12, la inmunodetección de la proteína NS1 del virus del Dengue se llevó a cabo de manera eficiente al utilizar los sobrenadantes infectados y haciendo las pruebas por triplicado. En todos los ensayos se pudo observar el cambio de color característico a simple vista. Mientras que en los ensayos donde se utilizaron los sobrenadantes preinfectado y control, no se presentó dicho cambio de color, corroborando que no se generaba ningún falso positivo en el sistema.

Así mismo, con el fin de desarrollar un método cuantitativo además del cualitativo descrito anteriormente (donde se observó el cambio de color a simple vista) se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm. Para ello se utilizó el equipo Multiskan MCC/340, ThermoFisher Scientific. Los datos obtenidos de estos ensayos son presentados en la Tabla IV. A partir de estos datos fue realizada una gráfica en función de su absorbancia, como se muestra en la Figura 12. En ella se observa que existe una marcada diferencia en los sobrenadantes infectados en comparación de ambos controles y sus valores son reproducibles. Además, en el sobrenadante infectado se observó una diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.0001$, mediante la prueba de Kruskal-Wallis, tanto sobre el sobrenadante control como el preinfectado (Tabla V).

Posteriormente, a partir de los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis se procedió a realizar un ensayo de comparaciones múltiples de Dunn (Tabla VI). Con este análisis se observó una diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.0001$, entre el sobrenadante infectado y el sobrenadante preinfectado. Así mismo, se determinó una diferencia estadística con una $P < 0.01$, entre los sobrenadantes infectados y control, demostrando nuevamente la capacidad de detección de la Proteína NS1. En cambio, cuando se realizó la comparación de las absorbancias entre sobrenadantes preinfectados y

sobrenadantes control, no se observó diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$). Este resultado era el esperado, ya que en ambos casos ninguno presenta la proteína NS1, debido a la falta de infección con el virus del Dengue.

Con estos resultados, es evidente que la nanoplataforma desarrollada en este proyecto permite detectar la proteína NS1 de manera cualitativa y cuantitativa, con un método colorimétrico. La lectura cualitativa, con la simple observación de un cambio de color azul, pueda apoyar el diagnóstico. El desarrollo de un sistema de detección con estas características pudiera ser de utilidad sobre todo en poblados pequeños y alejados, donde no se tiene acceso a equipo de laboratorio e incluso ni a los servicios básicos.

Adicionalmente el método fue fácil de realizar y no se requiere de condiciones especializadas para llevarse a cabo. Por otra parte, el uso de estas nanoplataformas resulta económico, ya que al calcular los costos, el precio por prueba resultó de \$18.18 pesos (Anexo 10), lo cual está muy por debajo del costo por prueba con el kit de Dengue Dúo donde también se detecta la proteína NS1 y que tiene un costo de \$925.00 pesos. En la Tabla VII se observa un comparativo más amplio de costos para otras pruebas diagnósticas para Dengue.

Debe considerarse que la introducción de este tipo de pruebas para la detección fácil, rápida y económica son de amplio interés. Ya que como se mencionó inicialmente, a pesar de que existen métodos exactos y sofisticados, éstos se mantienen restringidos a laboratorios de referencia, como lo son los laboratorios estatales y de los cuales solo existe uno por estado. Por lo cual la detección del virus, por lo menos en el caso del estado de Sonora, se ve restringido a las pruebas serológicas en la detección de Proteínas NS1 o anticuerpos IgG o IgM formados por el virus.

Además, este sistema que proponemos presenta dos modalidades de lectura, así que en casos donde no se cuenten con espectrofotómetros su capacidad de detección colorimétrica sería suficiente cuando no se tiene acceso a estos equipos. Un ejemplo son los pueblos o lugares de la sierra, donde los servicios de salud no son los óptimos o no se encuentran correctamente equipados por falta de recursos.

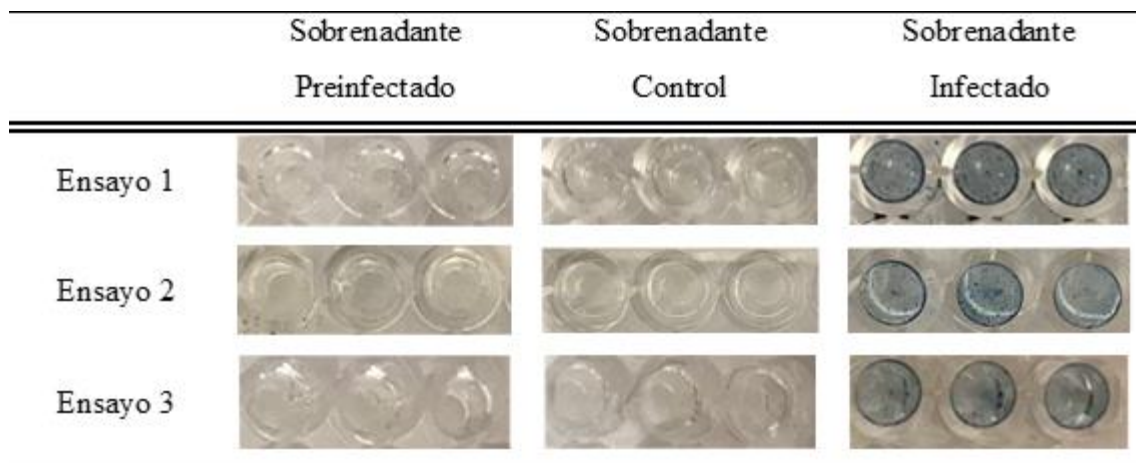


Figura 12. Evaluación cualitativa de la reproducibilidad del ensayo de inmunodetección de la proteína NS1. Se presentan los triplicados de los ensayos, donde se observa la inmunodetección de la proteína en todos los pozos del sobrenadante infectado. Así mismo, no se presentó ningún cambio en los pozos de sobrenadante preinfectado y control.

Tabla IV. Datos de absorbancias del ensayo de inmunodetección de la proteína NS1 en sobrenadantes de células U937.DC.SIGN.

	Ensayo 1			Ensayo 2			Ensayo 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Sobrenadante Preinfectado	0.068	0.070	0.067	0.068	0.070	0.065	0.063	0.069	0.065
Sobrenadante Control	0.070	0.070	0.070	0.073	0.071	0.069	0.071	0.072	0.073
Sobrenadante Infectado	0.128	0.134	0.122	0.123	0.170	0.140	0.158	0.142	0.133

Lecturas de absorbancias a una longitud de onda de 450 nm de los pozos del ensayo de inmunodetección asistidas por las nanoplateformas de Fe₃O₄.

Ensayo de Detección de la Proteína NS1

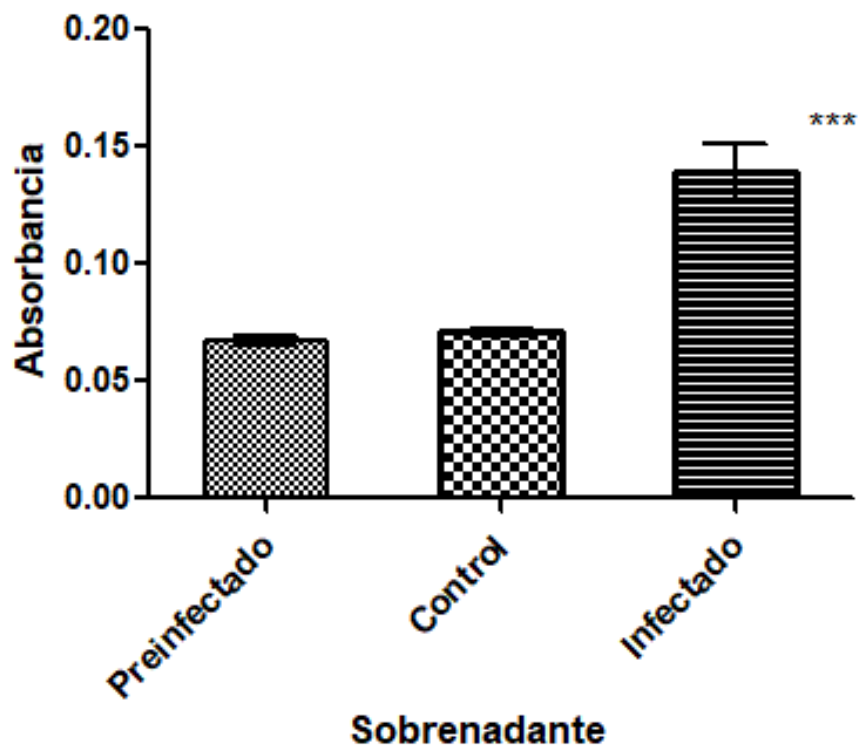


Figura 13. Ensayo de reproducibilidad del sistema inmunoconjugado. Absorbancias de los ensayos de detección de la proteína NS1, donde el sobrenadante infectado presenta una diferencia estadísticamente significativa sobre las demás con una $p < 0.001$, mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

Tabla V. Análisis estadístico de los ensayos de reproducibilidad de la inmunodetección de la proteína NS1.

Kruskal-Wallis test	
<hr/>	
Valor de P	< 0.0001
¿Valor de P exacto o aproximado?	Aproximación Gaussiana
Resumen de valor de P	***
Las medianas varían significativamente ($P < 0.05$)	Yes
Número de grupos	3
Estadística Kruskal-Wallis	21.84

Tabla VI. Análisis estadístico por prueba de comparación múltiple de Dunn.

Prueba de comparación múltiple de Dunn	Diferencia en la suma de rango	¿Es significativo? $P < 0.05$?	Resumen
Preinfectado vs Control	-7.778	No	N/A
Preinfectado vs Infectado	-17.39	Si	***
Control vs Infectado	-9.611	Si	*

N/A: no aplica; ***: $P < 0.0001$; *: $P < 0.01$.

Tabla VII. Costos de pruebas comerciales para el diagnóstico de Dengue.

Tipo de Prueba	Costo*
Sistema propuesto basado en Fe ₃ O ₄ .	\$18.18
Detección de anticuerpos IgG e IgM.	\$550.00
Detección de antígenos virales (proteína NS1).	\$640.00
Prueba Dengue Dúo (detección de Ag y Anticuerpos IgG e IgM).	\$925.00

*Costo promedio por prueba.

CONCLUSIONES

En este trabajo diseñamos, desarrollamos y evaluamos un sistema inmunoconjugado tipo ELISA de Nps metálicas capaz de detectar el virus del Dengue, a partir de la identificación colorimétrica cualitativa y cuantitativa de la proteína NS1. Lo anterior se comprobó evaluando diferentes condiciones de trabajo tanto en reactivos, consumibles, muestras y diseño de nanoplataformas e inmunoconjugados, eligiendo aquellas condiciones que fueron reproducibles y más económicas.

Es importante recalcar que la caracterización adecuada de las Nps fue indispensable para garantizar su reproducibilidad y estandarización del método. Otro punto a favor de este proyecto es que el método se podría utilizar en laboratorios clínicos de rutina, especialmente aquellos ubicados en regiones con una alta incidencia de Dengue o en aquellos donde no se cuenta con la infraestructura necesaria. Este sistema, además por su rapidez, puede ser útil durante los brotes repentinos del Dengue.

Si bien, existen técnicas con alta sensibilidad y especificidad, aun se requiere continuar con el desarrollo de técnicas más económicas, y de fácil uso, lo que junto con un diagnóstico temprano sigue siendo indispensable para el pronóstico de la enfermedad.

Concluimos que tenemos las bases de un método colorimétrico cualitativo y cuantitativo de inmunodetección para la infección por virus del Dengue. Se sugiere continuar con los estudios en sueros de pacientes infectados.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Bas C, Gómez-Cordero I. 2005. Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev Biomédica* 16: 113–137.
- Ahmed MSU, Salam A Bin, Yates C, Willian K, Jaynes J, Turner T, y col., 2017. Double-receptor-targeting multifunctional iron oxide nanoparticles drug delivery system for the treatment and imaging of prostate cancer. *Int J Nanomedicine* 12:6973–6984; doi:10.2147/IJN.S139011.
- Ahmed NH ussai., Broor S. 2014. Comparison of NS1 antigen detection ELISA, real time RT-PCR and virus isolation for rapid diagnosis of dengue infection in acute phase. *J Vector Borne Dis* 51: 194–199.
- Angulo-Molina A, Méndez-Rojas MÁ, Palacios-Hernández T, Contreras-López OE, Hirata-Flores GA, Flores-Alonso JC, y col., 2014. Magnetite nanoparticles functionalized with α -tocopheryl succinate (α -TOS) promote selective cervical cancer cell death. *J Nanoparticle Res* 16; doi:10.1007/s11051-014-2528-6.
- Arteaga-Cardona F, Gutiérrez-García E, Hidalgo-Tobón S, López-Vasquez C, Brito-Barrera YA, Flores-Tochihuitl J, y col., 2016a. Cell viability and MRI performance of highly efficient polyol-coated magnetic nanoparticles. *J Nanoparticle Res* 18:345; doi:10.1007/s11051-016-3646-0.
- Arteaga-Cardona F, Santillán-Urquiza E, de la-Presa P, Hidalgo-Tobón S, Umapada P, Horta-Fraijo P, y col., 2016b. Enhanced magnetic properties and MRI performance of bi-magnetic core-shell nanoparticles. *RSC Adv* 6:77558–77568; doi:10.1039/C6RA14265F.
- Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, y col., 2010. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med* 207:793–806; doi:10.1084/jem.20092545.

- Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, y col., 2006. Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. *J Infect Dis* 193:1078–1088; doi:10.1086/500949.
- Balmaseda A, Guzma MG, Hammond S, Robleto G, Flores C, Te Y, y col., 2003. Diagnosis of Dengue Virus Infection by Detection of Specific Immunoglobulin M IgM and IgA Antibodies in Serum and Saliva. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:317–322; doi:10.1128/CDLI.10.2.317.
- Becú-Villalobos D. 2014. Medicina traslacional, ¿moda o necesidad? *Med* 74: 170–172.
- Benítez R, Ibarz A, Pagan J. 2008. Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones Resumen. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam* 42:227–237; doi:1851-6114.
- Bhatt S, Gething P, Brady O, Messina J, Farlow A, Moyes C. 2012. The global distribution and burden of dengue. *NIH-PA Author Manuscr Nat* 496:504–507; doi:10.1038/nature12060.The.
- Bloemen M, Brullot W, Luong TT, Geukens N, Gils A, Verbiest T. 2012. Improved functionalization of oleic acid-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *J Nanoparticle Res* 14:1–10; doi:10.1007/s11051-012-1100-5.
- Brathwaite-Dick O, San Martín JL, Montoya RH, Del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. 2012. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 87:584–593; doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0770.
- Chan JFW, Yip CCY, Tsang JOL, Tee KM, Cai JP, Chik KKH, y col., 2016. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg Microbes Infect* 5:93; doi:10.1038/emi.2016.99.
- Cristea C, Tertis M, Galatus R. 2017. Magnetic Nanoparticles for Antibiotics Detection. *Nanomaterials* 7:119; doi:10.3390/nano7060119.

- Dantés HG, Farfán-Ale JA, Sarti E. 2014. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Mexico (2000–2011): A Systematic Literature Search and Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 8; doi:10.1371/journal.pntd.0003158.
- DGE. 2015. Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de dengue por laboratorio. *Inst Diagnóstico y Ref Epidemiológicos* 1–81.
- Díaz-Gaxiola A. 2016. Optimización de una nano-plataforma para un Kit de Diagnóstico contra Fiebre por Dengue. UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA.
- Dobretsov K, Stolyar S, Lopatin A. 2015. Magnetic nanoparticles: a new tool for antibiotic delivery to sinonasal tissues. Results of preliminary studies. *Acta Otorhinolaryngol Ital organo Uff della Soc Ital di Otorinolaringol e Chir Cerv-facc* 35: 97–102.
- Edeling MA, Diamond MS, Fremont DH. 2014. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. *Proc Natl Acad Sci* 111:4285–4290; doi:10.1073/pnas.1322036111.
- Elong Ngonu A, Chen HW, Tang WW, Joo Y, King K, Weiskopf D, y col., 2016. Protective Role of Cross-Reactive CD8 T Cells Against Dengue Virus Infection. *EBioMedicine* 13:284–293; doi:10.1016/j.ebiom.2016.10.006.
- Fallecker C, Caporossi A, Rechoum Y, Garzoni F, Larrat S, François O, y col., 2017. New insights into HCV replication in original cells from Aedes mosquitoes. *Virology* 14:1–11; doi:10.1186/s12985-017-0828-z.
- FECYT. 2009. *Nanociencia y nanotecnología: Entre la ciencia ficción del presente y la tecnología del futuro*. 1st ed. C.B. Llorente, E.C. Junquera, J.Á.M. Gago, and P.A.S. Domingo, eds. Madrid, España.
- Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. 2009. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host Microbe* 5:318–328; doi:10.1016/j.chom.2009.04.001.

- Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey F a, Deubel V. 1999. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 73: 6104–10.
- Ghazanfari MR, Kashefi M, Shams SF, Jaafari MR. 2016. Perspective of Fe₃O₄ Nanoparticles Role in Biomedical Applications. *Biochem Res Int* 2016:32; doi:10.1155/2016/7840161.
- Grande AH. 2007. NANOTECNOLOGÍA Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS: LA FÍSICA ACTUAL EN LUCHA CONTRA LA ENFERMEDAD. *Rev Acad Cienc Exact Fís Nat* 101:321–327; doi:http://dx.doi.org/10.14508/sdp.2014.6.12.129-140.
- Guabiraba R, Ryffel B. 2014. Dengue virus infection: Current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology* 141:143–156; doi:10.1111/imm.12188.
- Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, y col., 2011. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci* 108:8003–8008; doi:10.1073/pnas.1017338108.
- Guzmán M, Kourí G, Pelegrino J. 2001. Enfermedades virales emergentes. *Rev Cubana Med Trop* 53: 5–15.
- Halstead SB, Cohen SN. 2015. Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:281–291; doi:10.1128/MMBR.00009-15.
- He F. 2011. Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-Protocol* 1; doi:10.21769/BioProtoc.80.
- Hufschmid R, Arami H, Ferguson RM, Gonzales M, Brush LN, Browning ND, y col., 2016. Synthesis of phase-pure and monodisperse iron oxide nanoparticles by thermal decomposition. *Nanoscale* 7:11142–11154;

doi:10.1039/c5nr01651g.Synthesis.

Kantor IN. 2016. [Dengue, Zika and Chikungunya]. *Medicina (B Aires)* 1–5.

Khetarpal N, Khanna I. 2016. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *J Immunol Res* 2016; doi:10.1155/2016/6803098.

Kim SY, Li B, Linhardt RJ. 2017. Pathogenesis and inhibition of flaviviruses from a carbohydrate perspective. *Pharmaceuticals* 10:1–24; doi:10.3390/ph10020044.

Klomporn P, Panyasrivanit M, Wikan N, Smith DR. 2011. Dengue infection of monocytic cells activates ER stress pathways, but apoptosis is induced through both extrinsic and intrinsic pathways. *Virology* 409:189–197; doi:10.1016/j.virol.2010.10.010.

Kraus AA, Messer W, Haymore LB, De Silva AM. 2007. Comparison of plaque- and flow cytometry-based methods for measuring dengue virus neutralization. *J Clin Microbiol* 45:3777–3780; doi:10.1128/JCM.00827-07.

Kumar, Abbas, Fausto A. 2010. *Enfermedades infecciosas - Dengue*. 2da. Argentina.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685; doi:10.1038/227680a0.

Lassenberger A, Grünewald TA, Van Oostrum PDJ, Rennhofer H, Amenitsch H, Zirbs R, y col., 2017. Monodisperse Iron Oxide Nanoparticles by Thermal Decomposition: Elucidating Particle Formation by Second-Resolved in Situ Small-Angle X-ray Scattering. *Chem Mater* 29:4511–4522; doi:10.1021/acs.chemmater.7b01207.

Lechuga LM. 2010. Nanomedicina: ampliación de la nanotecnología en la salud. In: *Biotecnología Aplicada a la Salud Humana*. 98–112.

Leekha S, Nayar A, Bakshi P, Sharma A, Parhar S, Soni S. 2016. Estimation of iron overloads using oral exfoliative cytology in beta-thalassemia major patients.

Cytojournal 13:6; doi:10.4103/1742-6413.178993.

Li K, Shen M, Zheng L, Zhao J, Quan Q, Shi X, y col., 2014. Magnetic resonance imaging of glioma with novel APTS-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 9:1–11; doi:10.1186/1556-276X-9-304.

Lim J, Yeap SP, Che HX, Low SC. 2013. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res Lett* 8:1–14; doi:10.1186/1556-276X-8-381.

Lopez-Jimena B, Bekaert M, Bakheit M, Frischmann S, Patel P, Simon-Loriere E, y col., 2018. Development and validation of four one-step real-time RT-LAMP assays for specific detection of each dengue virus serotype. *PLoS Negl Trop Dis* 12:e0006381; doi:10.1371/journal.pntd.0006381.

Mahdavi M, Ahmad M Bin, Haron MJ, Namvar F, Nadi B, Ab Rahman MZ, y col., 2013. Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Molecules* 18:7533–7548; doi:10.3390/molecules18077533.

McMichael AJ, Woodruff RE, Kenneth HM, Pizer HF. 2008. Climate change and infectious diseases. *Soc Ecol Infect Dis* 9:378–407; doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70104-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70104-5).

Ministerio de Salud. 2013. *Técnicas De Laboratorio Para El Diagnóstico Y La Caracterización De Los Virus Del Dengue*. La Habana, Cuba.

Najioullah F, Viron F, Césaire R. 2014. Evaluation of four commercial real-time RT-PCR kits for the detection of dengue viruses in clinical samples. *Virol J* 11:4–8; doi:10.1186/1743-422X-11-164.

Oliveira ERA, Gonçalves AJS, Costa SM, Azevedo AS, Mantuano-Barradas M, Nogueira ACMA, y col., 2016. Aspects of T cell-mediated immunity induced in mice by a DNA vaccine based on the dengue-ns1 antigen after challenge by the

- intracerebral route. *PLoS One* 11:1–19; doi:10.1371/journal.pone.0163240.
- OMS. 2018. Dengue y Dengue Grave. 2018.
- Orna E, Tsaffir Z. 2010. Linearization of the Bradford Protein Assay. *J Vis Exp* 1–6; doi:10.3791/1918.
- Paixão ES, Teixeira MG, Rodrigues LC. 2017. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ Glob Heal* 2:e000530; doi:10.1136/bmjgh-2017-000530.
- Pal S, Dauner AL, Mitra I, Forshey BM, Garcia P, Morrison AC, y col., 2014. Evaluation of dengue ns1 antigen rapid tests and elisa kits using clinical samples. *PLoS One* 9; doi:10.1371/journal.pone.0113411.
- Park MS, Kim J Il, Park S, Lee I, Park M. 2016. Original Antigenic Sin Response to RNA Viruses and Antiviral Immunity. *Immune Netw* 16:261–270; doi:10.4110/in.2016.16.5.261.
- Patel B, Longo P, Miley MJ, Montoya M, Harris E, de Silva AM. 2017. Dissecting the human serum antibody response to secondary dengue virus infections. *PLoS Negl Trop Dis* 11:1–15; doi:10.1371/journal.pntd.0005554.
- Patterson J, Sammon M, Garg M. 2016. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West J Emerg Med* 17:671–679; doi:10.5811/westjem.2016.9.30904.
- Polesnak P. 2014. Immobilization of a NS1 dengue protein specific antibody on a magnetic (Fe_3O_4) nanoparticle for magnetic purification and immunological detection. UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA.
- Priyamvada L. 2016. B Cell Responses during Secondary Dengue Virus Infection Are. *J Virol* 90:5574–5585; doi:10.1128/JVI.03203-15.Editor.
- Qu S, Yang H, Ren D, Kan S, Zou G, Li D, y col., 1999. Magnetite Nanoparticles

- Prepared by Precipitation from Partially Reduced Ferric Chloride Aqueous Solutions. *J Colloid Interface Sci* 215:190–192; doi:10.1006/jcis.1999.6185.
- Ramimoghadam D, Bagheri S, Abd Hamid SB. 2014. Stable monodisperse nanomagnetic colloidal suspensions: An overview. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 133:388–411; doi:10.1016/j.colsurfb.2015.02.003.
- Rastogi M, Sharma N, Singh SK. 2016. Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. *Virology* 527:1–6; doi:10.1016/j.viro.1999.9656.
- Rothman AL, Ennis FA. 1999. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Virology* 257:1–6; doi:10.1016/j.viro.1999.9656.
- Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD. 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol Adv* 30:489–511; doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.
- Secretaria de Salud. 2017. Panorama Epidemiológico de Dengue , 2017. *Sem Epidemiol* 52 16: 2–4.
- Secundino NFC, Chaves BA, Orfano AS, Silveira KRD, Rodrigues NB, Campolina TB, y col., 2017. Zika virus transmission to mouse ear by mosquito bite: A laboratory model that replicates the natural transmission process. *Parasites and Vectors* 10:4–10; doi:10.1186/s13071-017-2286-2.
- Shah RR, Davis TP, Glover AL, Nikles DE, Brazel CS. 2015. Impact of magnetic field parameters and iron oxide nanoparticle properties on heat generation for use in magnetic hyperthermia Rhythm. *J Magn Magn Mater* 387:96–106; doi:10.1016/j.jmmm.2015.03.085.Impact.
- SSA S de S, DGE DG de E. 2017. Lineamientos para la vigilancia por laboratorio del dengue y otras arbovirosis. *Secr Salud, México* 2: 12–95.
- Stephen ZR, Kievit FM, Zhang M. 2011. Magnetite nanoparticles for medical MR imaging. *Mater Today* 14:330–338; doi:10.1016/S1369-7021(11)70163-8.

- Sucipto teguh H, Churrotin S, Setyawati H, Martak F, Mulyatno K cahyo, Amarullah IH, y col., 2018. A NEW COPPER (II)-IMIDAZOLE DERIVATIVE EFFECTIVELY INHIBITS REPLICATION OF DENV-2 IN VERO CELL. J Infect Dis 12:116–119; doi:<https://doi.org/10.2101/Ajid.12v1S.17>.
- Thiha A, Ibrahim F. 2015. A colorimetric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) detection platform for a point-of-care dengue detection system on a lab-on-compact-disc. Sensors (Switzerland) 15:11431–11441; doi:10.3390/s150511431.
- Torres-Galicia I, Cortés-Poza D, Becker I. 2014. Dengue en México: análisis de dos décadas I ntroducción. Gac Med Mex 150: 122–127.
- Tuiskunen-Bäck A, Lundkvist Å. 2013. Dengue viruses – an overview. Infect Ecol Epidemiol 3:19839; doi:10.3402/iee.v3i0.19839.
- Verma A. 2015. Article on Latest Trends in Nanomedicine. J Nanomedicine Res Artic Latest Trends Nanomedicine J Nanomed Res 2:1–5; doi:10.15406/jnmr.2015.02.00026.
- Wahala WMPB, de Silva AM. 2011. The human antibody response to dengue virus infection. Viruses 3:2374–2395; doi:10.3390/v3122374.
- Wang M, Yang F, Huang D, Huang Y, Zhang X, Wang C, y col., 2017. Anti-Idiotypic Antibodies Specific to prM Monoantibody Prevent Antibody Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. Front Cell Infect Microbiol 7:1–11; doi:10.3389/fcimb.2017.00157.
- WHO. 2018. Dengue Cambio Climatico y Salud.
- World Health Organization. 2012. *Handbook for clinical management of dengue*. 7th ed. WHO, ed. Switzerland.
- Xie Y, Liu D, Cai C, Chen X, Zhou Y, Wu L, y col., 2016. Size-dependent cytotoxicity of Fe₃O₄ nanoparticles induced by biphasic regulation of oxidative stress in

different human hepatoma cells. *Int J Nanomedicine* 11:3557–3570;
doi:10.2147/IJN.S105575.

Yen C-W, de Puig H, Tam J, Gómez-Márquez J, Bosch I, Hamad-Schifferli K, y col.,
2015. Multicolored Silver Nanoparticles for Multiplexed Disease Diagnostics:
Distinguishing Dengue, Yellow Fever, and Ebola Viruses. *Lab Chip* 15:1638–1641;
doi:10.1039/c000000x/Yen.

Yu X, Trase I, Ren M, Duval K, Guo X, Chen Z. 2016. Design of Nanoparticle-Based
Carriers for Targeted Drug Delivery. *J Nanomater* 1:1–26;
doi:10.1155/2016/1087250.Design.

Zeidler JD, Fernandes-Siqueira LO, Barbosa GM, Da Poian AT. 2017. Non-canonical
roles of dengue virus non-structural proteins. *Viruses* 9; doi:10.3390/v9030042.

Zhang Y, Zhang J. 2005. Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles
for improved intracellular uptake to breast cancer cells. *J Colloid Interface Sci*
283:352–357; doi:10.1016/j.jcis.2004.09.042.

APÉNDICE

APÉNDICE 1

Cultivo de la Línea Celular U937.DC.SIGN

Material

- Incubadora a 37 °C.
- Cajas de cultivo p25.
- Pipetas serológicas estériles de 10 mL.
- Sistema de filtración.
- Filtros de poro 0.22 µm.
- Campana de flujo laminar.

Medio RPMI

El medio RPMI fue desarrollado por Moore y colaboradores, en el Roswell Park Memorial Institute, de donde proviene el acrónimo, en Alabama, EE. UU. Esta es una mezcla de sales enriquecidas con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular. El medio ha sido utilizado para el cultivo de leucocitos humanos normales y neoplásicos, así como el crecimiento de linfocitos humanos frescos. Por esto, es destinado al cultivo de células humanas y otros animales.

Preparación. El medio en polvo es extremadamente higroscópico y debe ser protegido del medio ambiente. No se recomiendan preparaciones de concentraciones mayores a las especificadas, debido a la gran posibilidad de formación de precipitados.

1. Medir aproximadamente el 90 % del volumen a preparar de agua tridestilada.
2. Adicionar lentamente el polvo, agitando vigorosamente.
3. Una vez disuelto, agregar bicarbonato de sodio a una concentración de 5.6 % / L.

4. Adicionar los antibióticos (Penicilina 1 % o Ceftriaxona al 0.2 %).
5. Ajusta el pH a 7.2 – 7.4 con HCl 1N.
6. Aforar al volumen deseado y esterilizar por sistema de filtración.

Nota: El suero es adicionado hasta el momento de la generación del cultivo.

U937.DC.SIGN

Esta línea celular, es un linfocito humano que en cultivo tiende a crecer en suspensión. Proviene de tejido de derrame pleural, de una enfermedad de linfoma histiocítico, y es utilizada para estudiar la infección por Dengue virus, ya que este virus utiliza DC.SIGN como factor de unión. Fue desarrollada por la transfección de las células U937 con el gen de la proteína DC SIGN humana (células dendríticas de adhesión intercelular específicas de células no integrinas).

Procedimiento. Se colocan 10 mL de medio RPMI Suplementado con 10% de suero fetal bovino, en una caja de cultivo estéril de 25 m². Seguido, adicionar 0.5 mL de cultivo en confluencia de la línea celular. La transferencia se realiza en campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad.

APÉNDICE 2

Conteo Celular por Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer o hematocitómetro es utilizada en el área clínica para la cuenta de células sanguíneas, como eritrocitos, linfocitos y plaquetas. Sin embargo, puede ser utilizado para el conteo de otros tipos celulares, como en este caso, el cual fue utilizado para el estudio de la línea celular U937.DC.SIGN.

Equipo

- Cámara de Neubauer Bright Light Hematocytometer.
- Microscopio óptico.
- Azul de tripán.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Micropipeta y puntas estériles.

Procedimiento

1. Con ayuda de una micropipeta, tomar 10 μ L del cultivo celular a analizar y se agregan a un tubo eppendorf al cual anteriormente se le adiciono la misma cantidad del colorante azul de tripán, obteniendo una dilución final 1:2 (factor dilución).
2. Agitar el contenido del tubo eppendorf con una micropipeta, y se toman 10 μ L para ser analizados en cámara de Neubauer dejando que la suspensión celular fluya por debajo del cubreobjetos hasta llenar el área de la cuadrícula. Se debe de evitar que se derrame o entren burbujas en el área de conteo, si esto sucede, se debe de montar la cámara de nuevo.
3. Una vez montada la cámara, se deja reposar unos segundos permitiendo que las células se asienten y se observen en el mismo plano.
4. Iniciar el conteo de las células contenidas en los cuatro cuadrantes de las esquinas. El colorante azul de tripán es un colorante que penetra a las células muertas, es

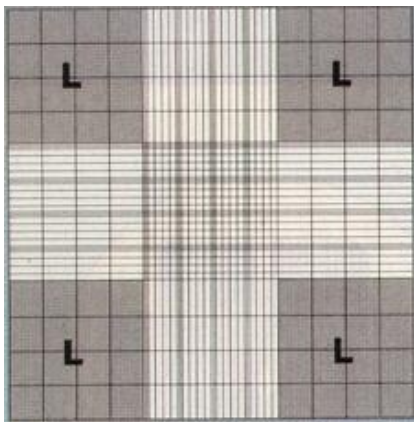
decir a las células no viables, tiñéndolas de color azul. Así, permitiendo distinguir entre células viables que no se encuentran teñidas.

5. El porcentaje de viabilidad se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Numero de células viables contadas} \times 100}{\text{Total de células contadas}}$$

6. La proliferación se evalúa con el uso de la siguiente formula:

$$\text{Proliferación celular} = \frac{\text{Numero de células contadas} \times \text{dilución} \times 10,000}{\text{Numero de cuadros contados}}$$

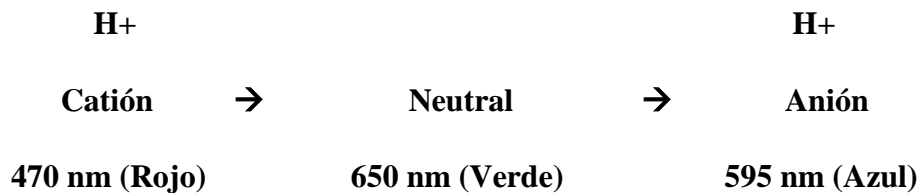


Cámara de Neubauer. El conteo celular se lleva a cabo en las áreas marcadas con “L”.

APÉNDICE 3

Protocolo Detección de Proteínas Totales por el Método de Bradford

Esta es un método por unión de colorantes, ya que es sabido que en condiciones adecuadas los grupos ácidos y básicos de las proteínas tienen la capacidad de interactuar con grupos orgánicos de determinados colorantes para generar precipitados con un color evidente. Para este ensayo, se utiliza el colorante Coomassie Brilliant Blue G250. El cual se fundamenta en la conversión de la forma del colorante, la cual presenta un color naranja, a una que presenta un color azul intenso cuando los grupos aniónicos del colorante interactúan con los grupos amino de las proteínas.



Materiales

- Lector de microplaca.
- Microplaca de 96 pozos.
- Reactivo de Bradford (Quick Start™, Bradford Protein Assay).
- Estándar de proteínas con concentración conocida (2.0 mg / mL BSA).
- Solución de PBS 1X.

Procedimiento

1. **Preparación de la curva estándar.** Se prepara a partir de una solución estándar de 2.0 mg / mL de BSA, diluciones a concentraciones de 1mg /mL, 500 µg / mL, 250 µg / mL, 125 µg / mL y 67.5 µg / mL.

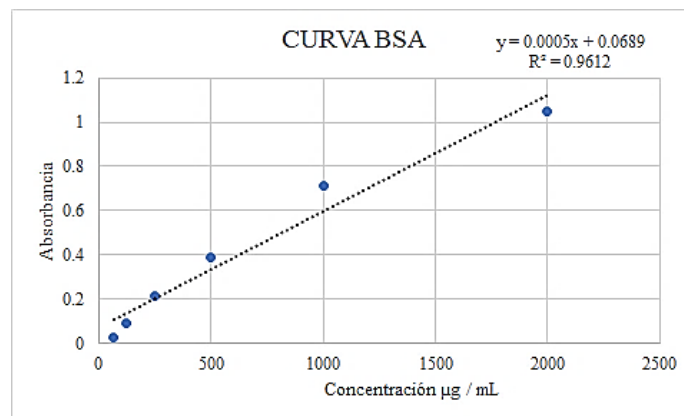
2. **Preparación de las muestras.** Se utiliza la muestra tal y como se tiene, además de realizar una serie de diluciones tales como 1:2, 1:4, 1:8, 1: 16 y 1:32, diluidas en PBS 1X.
3. **Montado.** Tanto de las diluciones del estándar como de las muestras, se utilizan 5 μL los cuales son adicionados en el pozo, para posteriormente agregar 250 μL del reactivo de Bradford y dejar incubar por 15 minutos.
4. **Detección.** Posterior a la incubación, se procede a realizar la lectura de la absorbancia mediante el lector de placa, a una longitud de onda de 595 nm. Una vez obtenidos los datos, se gráfica la absorbancia en función de mg de proteína, y se calcula la pendiente de la curva teniendo en cuenta solo los puntos que entran en el rango lineal. Seguido a esto, se grafican los datos de la muestra y ser comparadas contra el estándar.

APÉNDICE 4

Resultados de Cuantificación Proteínas Totales por el Método de Bradford

Se presentan los valores obtenidos de la cuantificación de proteínas totales en el sobrenadante de células U937.DC.SIGN infectadas y control. En el cual se utilizaron 5 μ L de sobrenadante y 250 μ L del reactivo de Bradford.

Curva BSA						
Conc.	2000	1000	500	250	125	67.5
Muestra 1	1.535	1.174	0.921	0.71	0.59	0.521
Muestra 2	1.52	1.215	0.896	0.725	0.583	0.521
Muestra 3	1.585	1.241	0.849	0.69	0.597	0.526
Promedio	1.547	1.210	0.889	0.708	0.590	0.523
Prom. - Blanco	1.050	0.713	0.392	0.212	0.093	0.026
Conc. estimada	1962.200	1288.867	646.200	285.533	48.867	-85.800



Sobrenadante Infectado					
Conc.	Sin Dilución	1:2	1:4	1:8	1:16
Muestra 1	1.478	1.323	0.997	0.807	0.608
Muestra 2	1.566	1.277	1.077	0.791	0.64
Muestra 3	1.557	1.303	1.075	0.815	0.621
Promedio	1.534	1.301	1.050	0.804	0.623
Prom - Blanco	1.037	0.804	0.553	0.308	0.126
Conc. Estimada µg/mL	1936.200	1470.867	968.200	477.533	114.867

Sobrenadante Control					
Conc.	Sin Dilución	01:02	01:04	01:08	01:16
Muestra 1	1.506	1.265	1.076	0.752	0.645
Muestra 2	1.543	1.294	1.066	0.742	0.615
Muestra 3	1.562	1.298	0.929	0.77	0.636
Promedio	1.537	1.286	1.024	0.755	0.632
Prom - Blanco	1.040	0.789	0.527	0.258	0.135
Conc. Estimada µg/mL	1942.867	1440.200	916.200	378.200	132.867

PBS	
Muestra 1	0.495
Muestra 2	0.504
Muestra 3	0.491
Promedio	0.497

Resumen	
Muestra	Conc. µg/mL
Sobrenadante Infectado	3544.933
Sobrenadante Control	3190.267
Diferencia*	354.667

* producción total de proteína

APÉNDICE 5

Electroforesis SDS-PAGE al 12 %

Materiales

- Marcador de peso molecular (Molecular Weight Standard Mixture, Recombinant).
- Cámara electroforética.
- Campana de extracción.
- Tubos cónicos de 50 mL.
- Tubos eppendorf.
- Micropipeta de volumen variable 100-1000 μL
- Micropipeta de volumen variable 2-20 μL

Gel Separador

Acrilamida 30 % / Bisacrilamida 0.8%.....	2.00 mL
Trizma-base pH 8.8.....	1.25 mL
Agua ultrapura.....	1.75 mL
Persulfato de amonio.....	17 μL
TEMED.....	3.3 μL

Gel Concentrador

Acrilamida 30 % / Bisacrilamida 0.8%.....	325 μL
Trizma-base pH 6.8.....	625 μL
Agua ultrapura.....	1.52 mL
Persulfato de amonio.....	12.5 μL

TEMED.....2.5 μ L

Solución de Corrida 5X

Glicina.....72.0 g

Trizma-base.....15.1 g

SDS.....5.0 g

Disolver en agua desionizada y aforar a 1L, diluir 1:5 para formar una solución 1X la cual se utilizará como solución de trabajo, ajustar el pH a 8.3 (solo en solución 1X), estas soluciones deben ser conservadas en refrigeración.

Buffer Muestra

Disolver 0.38 g de trizma-base en agua desionizada y ajustar el pH a 6.8, seguido añadir los siguientes reactivos en campana de extracción:

SDS.....1.0 g

Glicerol.....5.0 mL

2 mercaptoetanol.....0.5 mL

Azul de bromofenol.....0.5 mg

Aforar a 25 mL con agua desionizada y guardar a -20 °C.

Tinción de Coomasie

Solución de Coomasie.

Metanol.....50 % (V / V)

Azul de Coomasie brillante R-250.....0.05 % (P / V)

Ácido acético.....10 % (V / V)

Agua desionizada.....40 %

Solución desteñidora I.

Metanol.....50 % (V / V)

Ácido acético.....10 % (V / V)

Agua desionizada.....40 %

Solución desteñidora II.

Metanol.....5.0 % (V / V)

Ácido acético.....7.0 % (V / V)

Agua desionizada.....88 %

Puede almacenarse a temperatura ambiente hasta por un mes.

Procedimiento

1. Se prepara el gel separador en tubo cónico de 50 mL y colocando el TEMED en campana de extracción. La solución debe ser colocada de manera inmediata entre los vidrios de la cámara electroforética y esperar de 15 a 30 min hasta su polimerización.
2. Una vez que polimerizo el gel separador, se prepara el gel concentrador de igual manera en tubo cónico y se coloca sobre el gel separador, colocando el peine de 1.5 mm para esperar la polimerización.
3. Se monta la cámara electroforética, para posteriormente adicionar la solución de corrida y colocar 8 μ L de marcador de peso molecular al primer carril de cada gel.
4. Para los carriles siguientes, las muestras deben prepararse con buffer muestra, colocándose la misma cantidad que se puso de muestra (la cantidad de muestra debe estimar una cantidad de 10 μ g / mL de proteína). Cuando las muestras son

utilizadas en condiciones desnaturalizantes, estas deben colocarse ya incluyendo el buffer muestra en agua a 96 °C por 3 min.

5. Colocar las muestras procesadas en el carril correspondiente, el volumen final no debe de sobrepasar los 20 μ L.
6. Las condiciones de corrida deben ser a 120 volts, por aproximadamente hora y media o hasta que las muestras lleguen a la parte inferior del gel.
7. Una vez terminada la corrida, se retiran los vidrios desprendiendo cuidadosamente el gel y colocándose en la solución de Coomassie por no menos de 1 hora.
8. Para evidenciar el perfil, se coloca en la solución desteñidora I por un tiempo de 20 a 30 minutos.
9. Después es retirada y quitado el exceso para ser colocado en la solución desteñidora II, por unos 20 minutos o hasta que se pierda el color de fondo.
10. Colocar los geles en agua para su observación y conservación.
11. Utilizar fotodocumentador para el análisis del perfil, tales como numero de bandas y densidad de estas.

APÉNDICE 6

Cálculos para la Estimación de la Proteína NS1

Utilizando los resultados del análisis densitométrico y la cuantificación de proteínas se realizó una estimación de la proteína NS1, tomando como referencia el porcentaje de la banda de aproximadamente 90 kDa.

Cuantificación total de proteína del sobrenadante infectado: **3190.266 µg/mL**

Porcentaje de banda 90 kDa: **3.7 %**

Tomando en cuenta que 100 % de la densidad correspondería a la concentración total de proteína, se realizó el siguiente calculo:

$$100 \% \rightarrow 3190.266 \mu\text{g/mL}$$

$$3.7 \% \rightarrow X = \underline{\underline{118.03 \mu\text{g/mL}}}$$

Esta fue la concentración utilizada para los posteriores estudios.

APÉNDICE 7

Cálculos para la Utilización de los Anticuerpos

Para la realización del acoplamiento del anticuerpo ab41616 (Ms MAb to Dengue virus NS1 glycoprotein [DN3] abcam®: Concentración stock comercial 0.705 mg/mL) a las Nps se utilizaron 3 concentraciones. Los cálculos fueron las siguientes:

Concentración del anticuerpo: 0.705 mg/mL ← Concentración solución stock.

Dilución inicial: 1:30.

$$0.705 \text{ mg/mL} * 30 = 0.0235 \text{ mg/mL} \leftarrow \text{Concentración de trabajo.}$$

Para el anticuerpo ab41623 (ms mAb [DN2] Dengue Virus NS1 glycoprotein antibody Lot: GR280343-1, abcam®, Concentración stock comercial 1.2 mg/mL). Los cálculos fueron las siguientes:

Concentración del anticuerpo: 1.2 mg/mL ← Concentración solución stock.

Dilución inicial: 1:30.

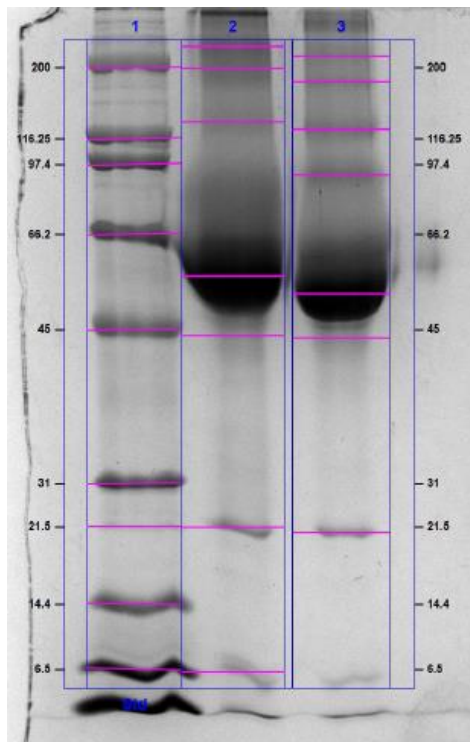
$$1.2 \text{ mg/mL} * 30 = 0.04 \text{ mg/mL} \leftarrow \text{Concentración de trabajo.}$$

APÉNDICE 8

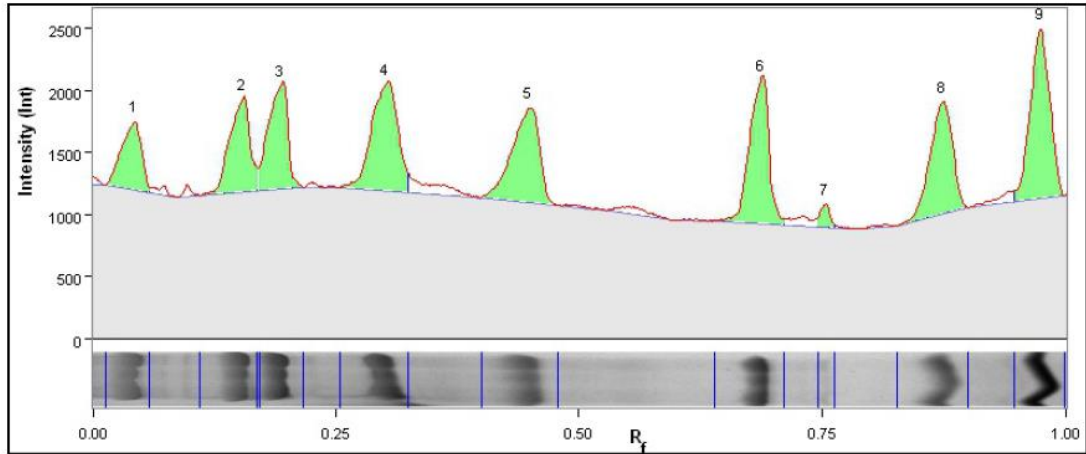
Resultados de Análisis Densitométrico

Información:

Imager Gel Doc™ XR+
Exposure Time (sec) 0.087 (Auto - Intense Bands)
Dark Type Referenced
Ref. Bkgd. Time (sec) 20
Flat Field Applied (White)
Serial Number 721BR10181
Software Version 5.0
Application Coomassie Blue
Excitation Source White Trans illumination
Emission Filter Standard Filter

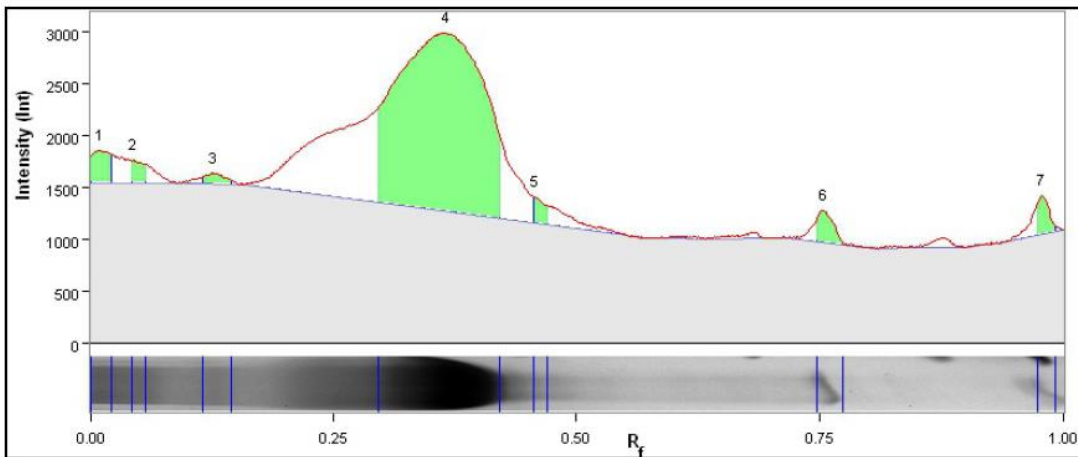


Marcador de Peso Molecular



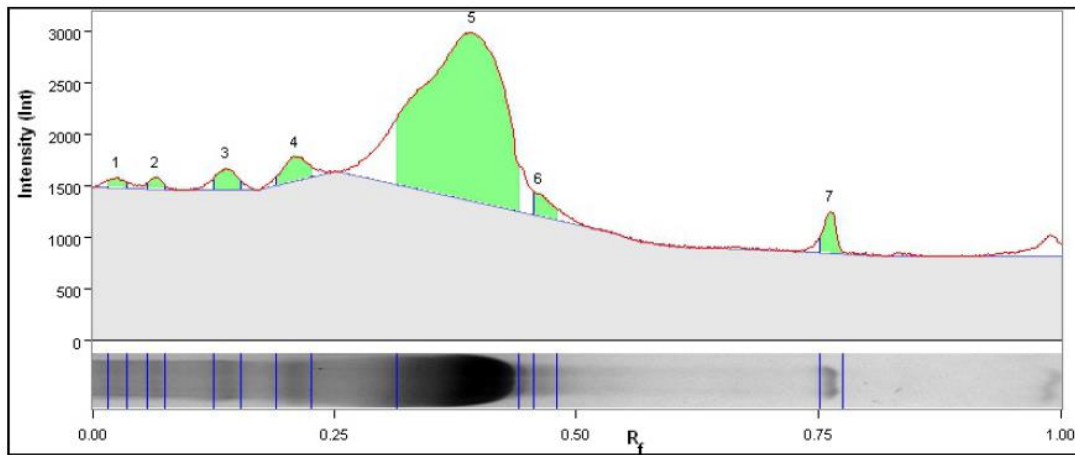
Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1	Myosin	200.0	0.043	1,364,434	N/A	N/A	6.9	6.4
2	b-Galactosidase	116.2	0.153	1,927,294	N/A	N/A	9.8	9.0
3	Phosphorylase b	97.4	0.193	2,057,094	N/A	N/A	10.4	9.7
4	BSA	66.2	0.301	2,878,374	N/A	N/A	14.6	13.5
5	Ovalbumin	45.0	0.448	2,605,086	N/A	N/A	13.2	12.2
6	Carbonic anhydrase	31.0	0.686	2,843,446	N/A	N/A	14.4	13.4
7		21.5	0.752	233,286	N/A	N/A	1.2	1.1
8	Trypsin inhibitor	14.4	0.872	2,533,106	N/A	N/A	12.8	11.9
9	Lysozyme	6.5	0.973	3,304,000	N/A	N/A	16.7	15.5

Sobrenadante Control



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		200.0	0.011	734,784	N/A	N/A	3.4	2.3
2		198.8	0.044	340,560	N/A	N/A	1.6	1.0
3		131.9	0.128	254,646	N/A	N/A	1.2	0.8
4		55.8	0.366	19,099,095	N/A	N/A	87.3	58.6
5		44.3	0.458	340,044	N/A	N/A	1.6	1.0
6		21.4	0.753	605,397	N/A	N/A	2.8	1.9
7		6.5	0.978	494,199	N/A	N/A	2.3	1.5

Sobrenadante Infectado



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		200.0	0.026	175,644	N/A	N/A	1.0	0.8
2		179.4	0.065	177,489	N/A	N/A	1.0	0.8
3		125.0	0.139	475,641	N/A	N/A	2.6	2.2
4		91.6	0.210	674,286	N/A	N/A	3.7	3.1
5		52.0	0.393	15,515,220	N/A	N/A	85.8	71.0
6		44.1	0.461	460,881	N/A	N/A	2.5	2.1
7		20.8	0.762	604,176	N/A	N/A	3.3	2.8

APÉNDICE 9

Análisis Estadístico de los Ensayos de Reproducibilidad de la Inmunodetección de la Proteína NS1.

Debido a que los datos eran tres grupos independientes (sobrenadantes preinfectados, control e infectado), con datos no paramétricos (sesgo (-0.437/0.856) y curtosis (1.975/2.614)), se procedió a utilizar la prueba de Kruskal-Wallis.

Preinfectado	Control	Infectado
0.068	0.070	0.128
0.070	0.070	0.134
0.067	0.070	0.122
0.068	0.073	0.123
0.070	0.071	0.170
0.065	0.069	0.140
0.063	0.071	0.158
0.069	0.072	0.142
0.065	0.073	0.133

	Preinfectado	Control	Infectado
Número de valores	9	9	9
Mínimo	0.0630	0.0690	0.1220
Percentil 25%	0.0650	0.0700	0.1255
Mediana	0.0680	0.0710	0.1340
Percentil 75%	0.0695	0.0725	0.1500
Máximo	0.0700	0.0730	0.1700
Media	0.06722	0.0710	0.1389
Desviación estándar	0.002438	0.001414	0.01604
Error estándar	0.0008127	0.0004714	0.005347
Inferior 95% CI	0.06535	0.06991	0.1266
Superior 95% CI	0.06910	0.07209	0.1512

Kruskal-Wallis test

Valor de P	< 0.0001
¿Valor de P exacto o aproximado?	Aproximación Gaussiana
Resumen de valor de P	***
Las medianas varían significativamente (P < 0.05)	Yes
Número de grupos	3
Estadística Kruskal-Wallis	21.84

Prueba de comparación múltiple de Dunn	Diferencia en la suma de rango	¿Es significativo? P < 0.05?	Resumen
Preinfectado vs Control	-7.778	No	N/A
Preinfectado vs Infectado	-17.39	Si	***
Control vs Infectado	-9.611	Si	*

*N/A: no aplica

APÉNDICE 10

Costos del Sistema Inmunoconjugado.

Reactivo	Presentación g o mL	Costo total	Utilizado g o mL	Costo unitario	Costo por prueba
Iron(III) chloride hexahydrate	1,000	\$2,879.00	1.233	\$3.55	\$0.12
Iron(II) chloride tetrahydrate	1,000	\$3,905.00	0.426	\$1.66	\$0.06
Sodium citrate tribasic dihydrate	1,000	\$1,125.00	0.5	\$0.56	\$0.02
Ammonium hydroxide solution	2,500	\$1,660.00	2	\$1.33	\$0.04
(3-Aminopropyl) trimethoxysilane	500	\$4,675.00	0.035	\$0.33	\$0.01
Toluene	2,000	\$1,791.00	15	\$13.43	\$0.45
ab41616 Monoclonal Antibody	1	\$7,407.45	0.002	\$14.81	\$1.48
ab41623 Monoclonal Antibody	1	\$7,956.15	0.02	\$159.12	\$15.91
Kit de tinción de Perls	800	\$735.00	2	\$1.84	\$0.09
			Costo por pozo		\$18.18

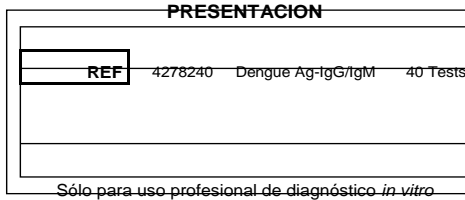
APENDICE 11



LINEAR Chemicals, S.L.

Dengue Ag-IgG/IgM cassette

prolongados. Evitar múltiples ciclos de congelación-descongelación. Antes del ensayo, atemperar las muestras a temperatura ambiente lentamente y mezclar suavemente. Las muestras que contengan partículas visibles deben aclararse por centrifugación antes del ensayo. No utilizar muestras que con lipemia, hemólisis grave o turbidez con el fin de evitar interferencias en la interpretación de los resultados.



Dengue Ag-IgG/IgM

Prueba rápida para la detección y diferenciación simultánea de anticuerpos del virus del dengue IgG e IgM y del antígeno del dengue NS1 (DEN 1,2,3,4) en suero, plasma o sangre total humana.

ONE STEP

FUNDAMENTO

LINEAR Dengue Ag-IgG/IgM es un método de cribado y ayuda en el diagnóstico de la infección por el virus del Dengue. Cualquier uso o interpretación del resultado dependerá del resto de los resultados clínicos y del criterio profesional. El resultado debe ser confirmado por un método alternativo.

Dengue Ag-IgG / IgM es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral que contiene dos tiras de prueba (lado izquierdo: Dengue IgG / IgM; lado derecho: Prueba de dengue Ag). **Dengue IgG/IgM**, : 1) una almohadilla color burdeos, que contiene antígenos La tira consiste en: del virus del dengue recombinantes conjugados con oro coloidal y un anticuerpo control conjugado con oro coloidal, 2) una membrana de nitrocelulosa que contiene dos líneas de ensayo (líneas G y M) y una línea control (línea C). La línea G está pre-recubierta con anticuerpos para la detección de IgG, la línea M está pre-recubierta con un anticuerpo control. **Dengue Ag**, 1) una almohadilla de color burdeos que contiene anticuerpos para la detección de IgM, y la línea C está pre-recubierta con un anticuerpo control. **Dengue Ag**, 1) una almohadilla de color burdeos que contiene anticuerpos contra el antígeno de Dengue NS1 conjugados con oro coloidal (conjugados de Ac) y un anticuerpo control conjugado con oro coloidal, 2) una membrana de nitrocelulosa que contiene la línea de prueba (línea T) y la de control (línea C). La línea T está pre-recubierta con anticuerpos contra el antígeno NS1, y la línea C está pre-recubierta con un anticuerpo control. Los del virus del dengue, anticuerpos frente a NS1 reconocen los antígenos de los cuatro serotipos. Al adicionar la muestra al pocillo de muestra (S), esta migra por acción capilar. Si el anti-dengue IgG o IgM, está presente en la muestra, se unirá con los conjugados Dengue Ag. El inmunocomplejo es capturado por el reactivo recubierto en la línea G o M, apareciendo un color burdeos en la misma, indicando un resultado positivo a IgG o IgM anti-virus del dengue. Un resultado positivo para IgM e IgG es indicativo de una infección primaria o secundaria temprana agudas.

Si el antígeno NS1 del dengue está presente en la muestra se une con los recubierta por los anticuerpos dengue NS1 antígeno formando una línea T conjugados de Ac. El inmunocomplejo es capturado en la membrana pre- de color rojo burdeos, indicando un resultado positivo a Ag de dengue que sugiere la existencia de una infección primaria o secundaria agudas.

La ausencia de las líneas G, M y T indica un resultado negativo. Cada tira contiene un control interno (línea C), la cual muestra una coloración rojo burdeos por la formación de inmunocomplejos de anticuerpos control en la parte izquierda y derecha del panel, independientemente del color en las demás líneas. Si esta línea no se colorea, el resultado de la prueba no es válido y la muestra debe ser analizada de nuevo con otro dispositivo.

COMPOSICIÓN DE LOS REACTIVOS

REF 4278240 40 Dengue Ag test device

4040 Tubos capilares 5 µL (para Dengue IgG/IgM test) Goteros de plástico (para Dengue Ag test)

Diluyente de muestra 5 mL. **ALMACENAMIENTO Y**

ESTABILIDAD

Conservar a 2-30°C. El dispositivo de ensayo es estable hasta la fecha de caducidad impresa en el sobre, siempre que se mantenga en el sobre bien sellado hasta su uso. **NO CONGELAR**. No usar una vez superada la fecha de caducidad.

RECOLECCIÓN Y PREPARACION DE MUESTRAS

Suero (EDTA, citrato o heparina) o plasma no hemolizado. Ensayar las muestras tan pronto como sea posible después de su recolección. Si no se ensayan inmediatamente, conservar entre 2°C y 8°C. Estable 5 días a 2-8°C o congelar a -20°C para almacenamiento

QUALITY SYSTEM
CERTIFIED ISO 9001
ISO 13485



LINEAR CHEMICALS S.L. Joaquim Costa 18 2ª planta. 08390 Montgat, Barcelona, SPAIN Telf. (+34) 934 694 990 Fax. (+34) 934 693 435. website www.linear.es



EQUIPO ADICIONAL

Cronómetro.

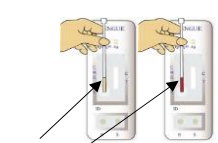
TECNICA

Atemperar, a temperatura ambiente (20-30°C) el dispositivo, la muestra y/o controles antes de su uso.

Sacar el dispositivo de la bolsa sellada, y colocarlo sobre una superficie limpia y plana. Usarlo lo antes posible. Rotular el dispositivo con la identificación del paciente.

1. **Detección del Dengue Ag**

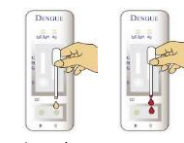
Llenar el tubo capilar con la muestra Be sure to label the device with specimen's ID number. Llenar el gotero de plástico con la muestra sin exceder la línea de muestra como se indica en la imagen. Con el tubo capilar en posición vertical, dispensar la muestra (5 µL) en el centro del pocillo de muestra (S) comprobar que no haya burbujas. Inmediatamente después agregar 3 gotas (aprox. 90-120 µL) de diluyente de muestra en el pocillo de buffer (B) con la botella en posición vertical



Línea de muestra
5 µL de muestra al pocillo (S)



3 gotas de diluyente de muestra al pocillo (B)



1 gota de suero/plasma al pocillo (S)
2 gotas de sangre total al pocillo (S)



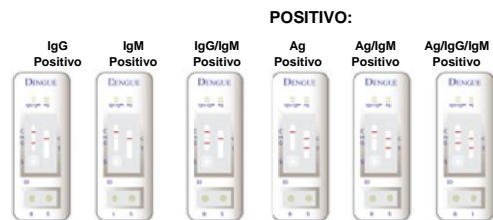
1 gota de diluyente al pocillo (S)

3. Poner en marcha el cronometro.
4. Leer los resultados a los 20-25 minutos. Los resultados positivos pueden ser visibles a partir del 1 minuto. Los resultados negativos deben ser confirmados al final de los 25 minutos.

Sin embargo, cualquier interpretación de los resultados fuera de los 25 min debe ser considerada inválida y la prueba debe repetirse. Después de interpretar los resultados, desechar el dispositivo según las normas locales.

NEGATIVO: Si solo se colorea la línea C. Sin color en las líneas G, M o T, indica que ni los anticuerpos anti-Dengue ni el antígeno NS1 del virus del Dengue están presentes. El resultado es Negativo o No-

INVALIDO: Si la línea C no se colorea, la prueba es inválida, independientemente de que se colorea las demás líneas G, M o T. Repetir la prueba con un nuevo cassette.



Las muestras con resultados positivos deben ser confirmadas con métodos alternativos y junto con la sintomatología clínica antes de hacer una determinación diagnóstica.

CONTROL DE CALIDAD

La prueba incluye un control de calidad interno. Cuando la prueba se realiza correctamente aparece una línea roja en el área de control (C). Esta línea confirma que se ha utilizado el volumen suficiente de muestra y que se siguieron los pasos de procedimiento correctamente.

Los Controles no están incluidos en el kit. Las Buenas Prácticas de Laboratorio recomiendan el uso de controles externos, positivos y negativos, para asegurar el funcionamiento adecuado de la prueba

SIGNIFICADO CLINICO

El virus del dengue, es un virus ARN monocatenario positivo, posee cuatro serotipos (DEN1, 2, 3, 4). Los virus se transmiten por mosquitos de la familia *Stegomyia*, principalmente el *Aedes aegypti*, y *Aedes albopictus*. Hoy, más de 2.5 billones de personas que viven en áreas tropicales de Asia, África, Australia, y América están en riesgo de infectarse por Dengue. Se estima que 100 millones de casos de fiebre del dengue y 250,000 casos de dengue hemorrágico se producen anualmente en el mundo¹⁻³.

El método más común para el diagnóstico de la infección por el virus del dengue es la detección serológica. La IgM anti-dengue comienza a aparecer 3 días después de la exposición inicial y permanece aproximadamente 30-60 días. Los niveles de IgG anti-virus dengue se elevan aproximadamente a los 7 días, alcanza el máximo a las 2-3 semanas y persiste durante toda la vida⁴⁻⁶. La detección de antígenos, como el Dengue NS1, liberados durante la replicación del virus en el paciente infectado, muestra resultados muy prometedores. Permite el diagnóstico desde el primer día después de la aparición de fiebre hasta el día 9, una vez que la fase clínica de la enfermedad termina, lo que permite un diagnóstico y tratamiento tempranos⁷.

CARACTERISTICAS DIAGNOSTICAS

Desempeño clínico. se ensayaron muestras de pacientes susceptibles con Dengue Ag-IgG/IgM y un EIA comercial. Los resultados se incluyen en la siguiente tabla:

IgM Test: resultados de 387 muestras:

IgM EIA Test	Positivo	Negativo	Total
Positivo	121	5	126
Negativo	7	254	261

Dengue Ag-IgG/IgM cassette

Total	128	259	387
Sensibilidad Relativa:	96.0%	Especificidad Relativa:	97.3%
Concordancia:	96.9%		

IgG Test: resultados de 441 muestras:

IgG EIA Test	Positivo	Negativo	Total
Positivo	153	7	160
Negativo	11	270	281

Dengue Ag-IgG/IgM cassette

Total	164	277	441
Sensibilidad Relativa:	95.6%	Especificidad Relativa:	96.1%
Concordancia:	95.9%		

Ag Test: resultados de 438 muestras:

Dengue Ag EIA	Positivo	Negativo	Total
Positivo	135	5	140
Negativo	12	286	298

Dengue Ag-IgG/IgM cassette

Total	147	291	438
Sensibilidad Relativa:	96.4%	Especificidad Relativa:	96.0%
Concordancia:	96.1%		

Reactividad cruzada: Se ensayaron muestras con enfermedades infecciosas para determinar la reactividad cruzada, de acuerdo con el procedimiento estándar. Los resultados demostraron que no presenta reacción cruzada con las siguientes infecciones:

Muestra	Nº de muestras	IgM	IgG	Ag
Suero positivo a HBsAg	10	-	-	-
Suero positivo a HAV	10	-	-	-
Suero positivo a HCV	10	-	-	-