



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Estudio de las interacciones químicas presentes en el tratamiento
de muestras clínicas para el desarrollo y validación de un método
para la detección del SARS-CoV-2”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

P R E S E N T A

Dalia Stephanie Aguirre Maldonado

**Directora de Tesis:
Tatiana Fiordeliso Coll**



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Terminología	1
Introducción	2
SARS-CoV-2 y COVID-19	2
Estructura y mecanismo de patogenicidad del SARS-CoV-2	3
Imagen 1. Estructuras del genoma de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.	4
Imagen 2. Mecanismo celular de patogenicidad del SARS-CoV-2.	6
Pruebas de detección para SARS-CoV-2	7
Antecedentes	10
Los ácidos nucleicos y sus enlaces.	10
Imagen 3. Estructura de los pares de bases de Watson y Crick.	11
Fundamento de las reacciones químicas orgánicas	12
Biosensores	14
Biosensor para detección de ácidos nucleicos	15
Biosensor para detección de SARS-CoV-2 y diagnóstico de COVID-19	16
Tratamiento general de muestras	18
Imagen 4. Plan de trabajo e implementación de la prueba de hibridación en hospitales.	20
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
Metodología	22
Toma e inactivación de muestras	22
Extracción y purificación de RNA total	24
1.1. Planificación (Ejemplo)	26
Cuadro 1. Ejemplo de cuadro de planificación con base en el número de pruebas.	26
1.2. Esquema de Trabajo (Ejemplo)	26
Cuadro 2. Ejemplo de cuadro de preparación de disoluciones de ssDNA-biotinilado con base en el número de pruebas.	27

Cuadro 3. Ejemplo de cuadro de preparación de disoluciones de cDNA-fluorescente con base en el número de pruebas.	27
Cuadro 4. Ejemplo de cuadros de preparación de disoluciones de RNA-sintético con base en el número de pruebas.	27
Cuadro 5. Ejemplo del esquema de preparación de la reacción de detección.	28
1.3. Preparación preliminar	28
1.4. Lavados Pre-Funcionalización Buffer de Lavado 1X (BL1X)	28
1.5. Lavados Pre-Funcionalización con disolución A (Sol. A)	28
1.6. Lavados Pre-Funcionalización con disolución B (Sol. B)	29
1.7. Incubación de Funcionalización	29
1.8. Lavados post-funcionalización.	29
1.9. Lavados post-funcionalización y siembra de perlas magnéticas.	29
Etapa 2. Reacción de competencia: RNA sintético/muestra del paciente vs cDNA-fluorescente	30
2.1. Preparación de placa de competencia	30
Etapa 3. Reacción de detección: Perlas magnéticas funcionalizadas vs competencia	31
3.1. Reacción de perlas magnéticas funcionalizadas con reacción de competencia y detección.	31
3.2. Lavados de reacción de detección	31
Medición de fluorescencia y captura de imágenes	31
Análisis de datos	33
Resultados	33
Efecto del MTV + TRIzol™ en la detección de pruebas clínicas	34
Figura 1. Efecto del MTV + TRIzol™ en la detección de curvas de RNA sintético.	35
Figura 2. Efecto del volumen de muestra (TRIzol™ + medio de transporte viral) en la detección de muestras clínicas.	37
Propiedades generales y efecto del TRIzol™ en la detección de RNA sintético	38
Figura 3. Estudio espectrofotométrico de la interacción entre el MTV y el TRIzol™ con base en las longitudes de onda de los genes N y E.	40
Figura 4. Efecto de la presencia de TRIzol™ en la detección de curvas de RNA sintético.	41
Efecto del calentamiento previo a la competencia en la detección de pruebas clínicas en presencia y ausencia de MTV+TRIzol™	42
Figura 5. Efecto del calentamiento del TRIzol™ en la detección del genoma del SARS-CoV-2 en muestras clínicas.	42

Figura 6. Efecto de la presencia de TRIzol™ en la detección del genoma del SARS-CoV-2 en muestras clínicas.	44
Efectos del RNA Shield™ en la detección de RNA sintético y viral	45
Figura 7. Efecto del volumen DNA/RNA Shield™ en la detección del genoma del SARS-CoV-2 en muestras clínicas.	46
Figura 8. Efecto de la presencia de RNA Shield™ contra la de TRIzol™ en la detección de muestras clínicas.	48
Propiedades generales del RNA Shield™ y su efecto en la detección	49
Figura 9. Estudio espectrofotométrico de la interacción entre el medio de transporte viral y el RNA Shield™ con base en las longitudes de onda de los genes N y E.	50
Efecto del RNA Shield™ en el procesamiento de muestras clínicas	51
Figura 10. Efecto de la presencia de DNA/RNA Shield™ contra la ausencia del mismo en la detección de muestras clínicas.	52
Interferencias en las pruebas clínicas utilizando RNA purificado	53
Figura 11. Interferencia de RNA humano y determinación de la carga viral detectable.	54
Resumen de interferencias en la prueba	54
Sensibilidad del biosensor	55
Cuadro 6. Matriz de cálculo de sensibilidad del biosensor con base en la RT-qPCR realizada en el IMSS.	55
Cuadro 7. Matriz de cálculo de sensibilidad del biosensor con base en la RT-qPCR realizada en el InDRE.	55
Análisis de resultados y discusión	56
Efecto del MTV + TRIzol™ en la detección de pruebas clínicas	56
Imagen 5. Estructura química del rojo de fenol.	57
Imagen 6. Estructura química del tiocianato de guanidinio en su forma disociada.	59
Propiedades generales y efecto del TRIzol™ en la detección de RNA sintético	61
Imagen 7. Estructura química de los fluorocromos acoplados a los cDNA-fluorescentes.	63
Imagen 8. Mecanismo de acción para la formación de 2-aminobenzotiazoles a partir de anilinas.	64
Efecto del calentamiento previo a la competencia en la detección de pruebas clínicas en presencia y ausencia de MTV+TRIzol™	65
Imagen 9. Reacciones que interfieren en la reacción de detección.	66
Efectos del RNA Shield™ en la detección de RNA sintético y viral	68
Propiedades generales del RNA Shield™ y su efecto en la detección	69

Efecto del RNA Shield™ en el procesamiento de muestras clínicas	70
Interferencias en las muestras clínicas con RNA purificado	71
Sensibilidad del biosensor	72
Propuesta de formulación	73
Imagen 10. Estructura química de detergentes.	74
Conclusiones	75
Bibliografía	77
Anexos	83
Anexo 1. Complemento de la metodología.	83
Disoluciones	83
Cuadro 8. Datos generales de oligonucleótidos utilizados en la prueba para el gen E.	83
Cuadro 9. Datos generales de oligonucleótidos utilizados en la prueba para el gen N.	83
Materiales y reactivos	84
Equipos	84
Anexo 2. Medición de fluorescencia con el software Gen 5.0™ y el equipo Cytation5™	85
Anexo 3. Estimación de la equivalencia de pmol a copias virales (CV) del genoma de SARS-CoV-2.	88
Anexo 4. Análisis de estabilidad de funcionalización y ejemplo visual de la detección.	89
Figura Complementaria 1. Pruebas de estabilidad de la funcionalización.	89
Anexo 5. Cálculo de pendientes para la comparación de curvas con concentración variable de cDNA-fluorescente y RNA Shield™.	90
Cuadro 10. Análisis de regresión lineal simple de los datos ajustados al blanco de la figura 7A.	90
Anexo 6. Cálculo de pendientes y de coeficientes de correlación para la comparación de curvas con volumen variable de RNA Shield™.	90
Cuadro 11. Análisis de regresión lineal simple de los datos ajustados al blanco de la figura 7B.	90
Anexo 7. Estudio espectrofotométrico de RNA Shield™, Sol. B y N-Fluo.	91
Figura complementaria 2. Análisis espectrofotométrico de las disoluciones presentes en la detección de N-Fluo.	91
Anexo 8. Cálculo de la concentración de guanidinio presente en la reacción de competencia.	91
Anexo 9. Diagrama resumen de tesis.	92

Terminología

cDNA: Cadena de DNA sintetizada artificialmente y que es complementaria a una secuencia de RNA o DNA (Hastings, 2001).

Copias virales: Sinónimo de carga viral, habla de la cantidad de virus a lo que equivale la carga genética que se mide.

Sensibilidad: Nivel de concordancia entre los resultados positivos y negativos de un método de detección contra su estándar.

Concentraciones:

M: Concentración Molar, equivalente a mol de soluto por cada litro de disolución. (mol/L)

%: Expresión de porcentaje, puede representar un porcentaje masa/masa (g soluto /100 g disolvente), masa/volumen (g soluto /100 mL disolvente), o volumen/volumen (mL soluto /100 mL disolvente).

Introducción

SARS-CoV-2 y COVID-19

En diciembre de 2019 en Wuhan, China, se registraron cuadros clínicos de “neumonías atípicas” que más adelante se identificaron como una enfermedad infecciosa denominada COVID-19 (por sus siglas en inglés *Coronavirus Disease* y su origen en el año 2019), cuyo agente causante se encontró al Coronavirus 2 a quien se le denominó síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2). En la actualidad, el brote se ha caracterizado por ser una pandemia, que se ha propagado en 188 países de todo el mundo, con más de 148 millones de casos confirmados (a 09:00 h del 28 de abril de 2021) y con una tasa de recuperación del ~97.6% y de mortalidad del ~2.4% de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, WHO por sus siglas en inglés “*World Health Organization*”); considerándose una emergencia de salud pública de importancia internacional (WHO Coronavirus (COVID-19), 2021).

En México se han presentado más de 900 mil casos, con una tasa de recuperación del ~90.7% y de mortalidad del ~9.3%, constituyéndose como un evento histórico de suma importancia para la salud pública en diversos campos (WHO Coronavirus (COVID-19), 2021). La pandemia ha representado un desafío científico y social muy importante especialmente en lo que se refiere a establecer cercos sanitarios que nos permitan reducir de manera eficiente la propagación mundial del SARS-CoV-2. Los gobiernos se han visto obligados a tomar medidas de aislamiento y prevención de contagios, deteniendo las actividades no esenciales y limitando las esenciales, afectando así la economía mundial.

Una de las principales causas de la dificultad de establecer cercos sanitarios efectivos, es que existe un alto índice de pacientes asintomáticos, lo que retrasa la detección y tratamiento de los enfermos. Sin contar con que, dado que dichas medidas de contención tienen repercusiones importantes en la salud mental y emocional de la

población, las personas con síntomas leves o nulos encuentran difícil permanecer aislados (Jayamohan et al., 2020; Mathuria et al., 2020; Weissleder et al., 2020).

Durante la pandemia, la comunidad científica ha trabajado sin descanso para conocer más sobre la enfermedad y la respuesta fisiológica, psicológica y social de los seres humanos a esta infección. Uno de los primeros avances importantes fue la genotipificación y descripción del SARS-CoV-2, posteriormente y aún en ello, la comprensión del mecanismo de patogenicidad.

Estructura y mecanismo de patogenicidad del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 pertenece a la familia de los coronavirus (CoV). La secuenciación de genes de los CoV y los estudios de su zoonosis (cuando enfermedades infecciosas pasan de animales a humanos) hasta ahora han permitido reconocer cuatro géneros, Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus y Deltacoronavirus. Los CoV Alfa y Beta se originan en los murciélagos e infectan únicamente a los mamíferos, mientras que los CoV Gamma y Delta infectan principalmente a las aves (Barik, 2021).

En particular, siete de estos virus están relacionados con la enfermedad humana, denominada coronavirus humano (HCoV). Cuatro HCoV (los Alfa CoV HCoV-229E y HCoV-NL63 y los betacoronavirus HCoV-HKU1 y HCoV-OC43) suelen causar infecciones leves y autolimitadas de las vías respiratorias con altas tasas de morbilidad. Los otros tres HCoV categóricamente dañinos son el SARS-CoV, el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y el SARS-CoV-2. El SARS-CoV ya no circula en humanos. El MERS-CoV persiste en humanos en Oriente Medio, mientras que el SARS-CoV-2 sigue haciendo estragos en humanos en todo el mundo y ha causado un impacto perjudicial en la salud y sociedad mundial (Rezaei, 2021).

El SARS-CoV-2 es un virus de RNA que contiene aproximadamente de 27 a 32 kb de RNA monocatenario de sentido positivo (+ssRNA). Los beta CoVs tienen al menos seis marcos abiertos de lectura (ORF) y muchos otros genes accesorios. El número, la ubicación y la identidad de los ORFs son variables entre los diversos géneros y virus.

En el extremo 5' terminal, dos tercios del genoma consta de dos ORF; ORF1 y ORF2. Estos ORF codifican para dos poliproteínas, Pp1a y Pp1ab, y se escinden adicionalmente en 11 y 16 proteínas, respectivamente. En el extremo 3' terminal se encuentran los genes que codifican para diversas proteínas estructurales, como la nucleocápside (*N*), la proteína de membrana (*M*), la proteína de la envoltura (*E*) y la proteína espiga (*S*), que a su vez son esenciales para el mecanismo viral de patogenicidad (Barik, 2021; Jayamohan et al., 2020; Mathuria et al., 2020).

A través de la secuenciación del genoma viral del SARS-CoV-2 se ha revelado información importante con la que se identificaron las variaciones genómicas que diferencian al SARS-CoV-2 de otros CoVs. El SARS-CoV-2 posee un 80% de similitud con el SARS-CoV en su secuencia genómica, porcentaje que disminuye al compararlo con otros CoV (Rezaei, 2021). La identificación de dichas variaciones, ha permitido el desarrollo de cebadores y sondas utilizados para la detección específica del SARS-CoV-2, causante de la pandemia actual (Barik, 2021; Jayamohan et al., 2020; Mathuria et al., 2020).

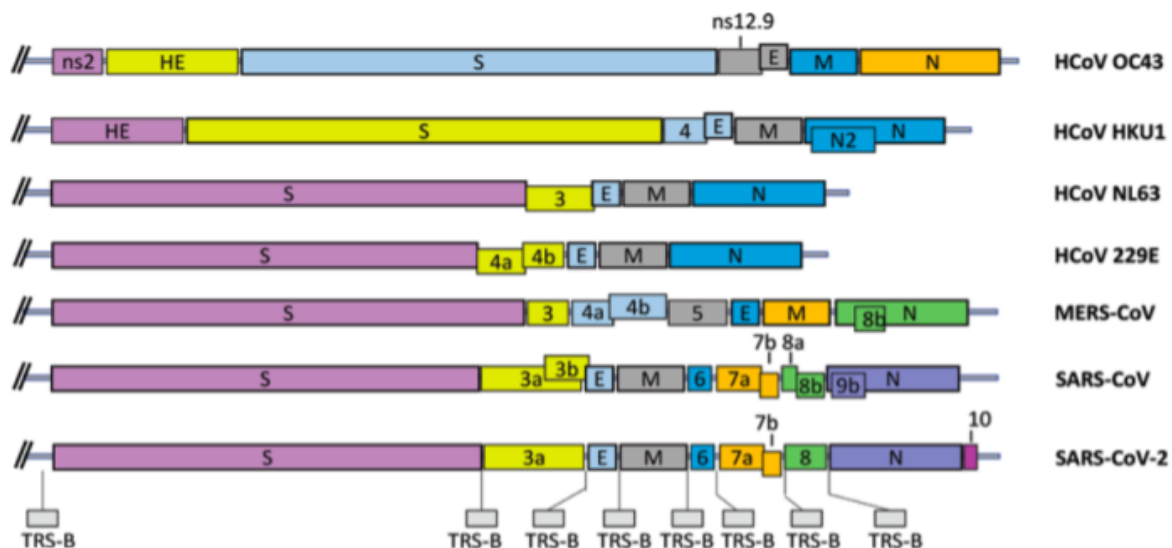


Imagen 1. Estructuras del genoma de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.

Se colocan otros genes de los siete coronavirus humanos, que son OC43 (NC_006213.1), HKU1 (NC_006577.2), NL63 (NC_005831.2), 229E (NC_002645.1), MERS-CoV (NC_019843.3), SARS-CoV (NC_004718.3) y SARS-CoV-2 (NC_045512.2). Todos los CoV contienen los genes estructurales *S*, *E*, *M* y *N*, codifican las proteínas estructurales espiga, envoltura, membrana y nucleocápside, respectivamente. Los genes accesorios son exclusivos de los distintos CoV (Rezaei 2021, Yan et al. 2020).

Los mecanismos moleculares que conducen a la infección viral de los tejidos humanos durante la enfermedad COVID-19 son ahora ampliamente conocidos. No obstante, la investigación sobre las propiedades específicas del virus o del hospedador que impulsan la patogénesis de la enfermedad tisular, aún está en progreso (Kumar et al., 2020). La entrada del SARS-CoV-2 en las células humanas está mediada por un receptor en la superficie de la membrana celular llamado enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE2), que se une al dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína espiga (S) del SARS-CoV-2. Después de la unión a ACE2, se produce la escisión de la proteína S por las proteasas similares a la serina proteasa 2 transmembranal (TMPRSS2), la catepsina B o L (CTS-B o L) o la furina; éstos se consideran los pasos esenciales para ejercer un efecto de fusión e infección por virus en la membrana de la célula huésped (Mathuria et al., 2020). La unión específica de la proteína S al receptor ACE2, confiere una particularidad a la célula hospedadora que ha sido motivo de estudio como uno de los principales blancos terapéuticos (Yan et al., 2020).

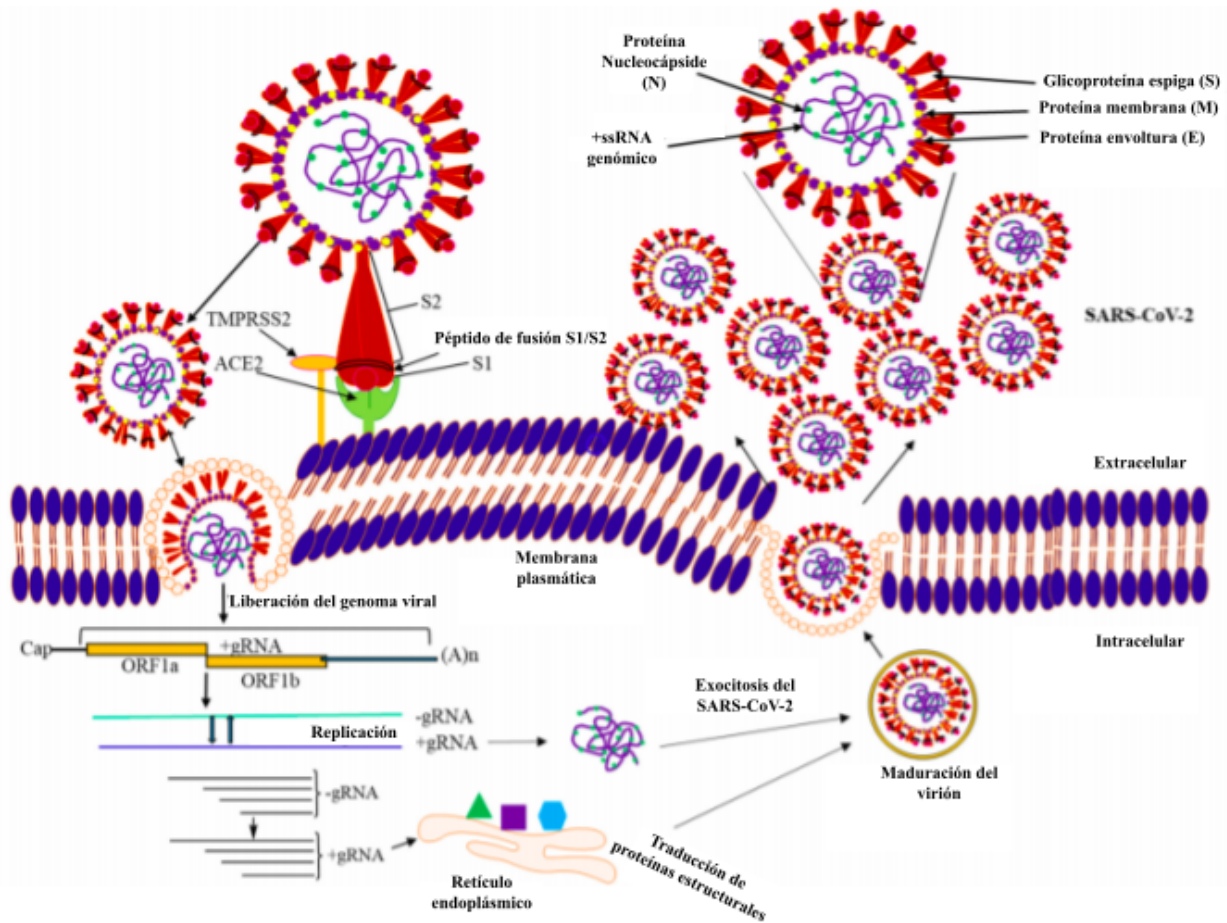


Imagen 2. Mecanismo celular de patogenicidad del SARS-CoV-2.

El SARS-CoV-2 comienza uniéndose con su proteína S (RBD/S1) al receptor de la célula huésped ACE2, produciendo un cambio conformacional en la subunidad S2 y facilitando así su fusión con la membrana plasmática. Inmediatamente después de la liberación del +ssRNA, la traducción conduce a la formación de las poliproteínas no estructurales Pp1a y Pp1ab, que se someten a un corte proteolítico y eventualmente, se ensamblan con una replicasa funcional. La replicasa conduce a la formación de un intermedio de sentido negativo, que finalmente se replica para formar múltiples copias de RNA genómico (gRNA), así como un conjunto anidado de mRNAs subgenómicos (sgRNA) por transcripción discontinua. Estos sgRNA se traducen en varias proteínas estructurales y accesorias, que se ensamblan como virión en el compartimento intermedio ubicado entre el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (ERGIC), para finalmente salir de la célula por exocitosis. Traducido a partir de (Yadav et al., 2021).

Los mecanismos de virulencia específicos del SARS-CoV-2 le permiten escapar de la detección por parte de las células inmunológicas del hospedero, o bien manipular las respuestas inmunitarias del mismo. Esto incluye el retraso de la respuesta mediada por interferones (INF) y de la producción eficiente de anticuerpos neutralizantes (que

previenen la infección), además del secuestro de la maquinaria de la célula huésped para favorecer la replicación viral (Mathuria et al., 2020).

Pruebas de detección para SARS-CoV-2

Uno de los principales problemas de esta pandemia, es que los síntomas asociados al COVID-19 en los inicios del desarrollo de la enfermedad son muy similares a otras enfermedades respiratorias y que, adicionalmente no existían métodos diagnósticos desarrollados. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (reacción en cadena de la polimerasa o PCR) se encuentran entre las herramientas más utilizadas en el panorama actual de pruebas de diagnóstico de COVID-19 (Jayamohan et al., 2020).

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) se considera el estándar de oro para la detección temprana de infecciones por virus respiratorios en la fase aguda de la enfermedad como en el SARS-CoV-1 y MERS; el SARS-CoV-2 no es diferente en ese sentido.

La RT-qPCR esencialmente comprende cuatro etapas: la lisis del SARS-CoV-2 en la muestra, la purificación del RNA viral, la transcripción inversa al DNA complementario (cDNA), la amplificación de regiones específicas de dicho cDNA y, por último, la detección óptica del cDNA amplificado. Dicha amplificación se expresa en unidades de ciclos de cuantificación (CT), que indica el número de ciclo en el que una curva de amplificación de PCR cumple un criterio matemático predefinido, tomando como referente la amplificación exponencial del DNA (Jayamohan et al., 2020).

Para la implementación de esta prueba en la detección de SARS-CoV-2 y diagnóstico de COVID-19 se han realizado numerosos ensayos, que permiten identificar uno o más genes específicos del virus. Un estudio de la Universidad de Washington informó que el gen E y los conjuntos de cebadores/sondas del gen N2 tienen una mayor sensibilidad para el ensayo de detección del SARS-CoV-2. Sin embargo, otros autores han estudiado y afirmado que el gen Orf1 también presenta resultados sensibles y específicos (Corman et al., 2020).

A pesar de ser el estándar de oro, se han encontrado vulnerabilidades en los aspectos preanalíticos y analíticos del ensayo. Los aspectos analíticos incluyen las variaciones atribuidas a la carga viral o al momento de la toma de muestra en relación con la progresión de la enfermedad. Se ha demostrado que la probabilidad de obtener falsos negativos mediante RT-PCR (a partir de hisopados nasofaríngeos u orofaríngeos) disminuye desde el día de la infección (100%) hasta la aparición de los síntomas (38%). Los falsos negativos más bajos se observan si las muestras se toman a los 3 días después del inicio de los síntomas antes de aumentar de nuevo hacia el final del desarrollo de la infección a los 12 días (Mathuria et al., 2020).

De particular relevancia ha sido la identificación del mejor sitio en el tracto respiratorio para probar la presencia de material genético viral. En este y muchos casos, la recolección de muestras apropiadas es crucial para la detección de la mayoría de los casos infectados de COVID-19. En estudios más recientes, se encontró que comparando el resultado de la RT-qPCR con cultivos virales, se obtiene un 92.6% de resultados positivos concordantes en pacientes sintomáticos (que presentan síntomas) y 78.6% en asintomáticos (que no presentan síntomas) (Comber et al., 2020; Jayamohan et al., 2020; Prince-Guerra, 2021).

Si bien dichas pruebas resultan confiables y se han establecido como el estándar de oro, requieren de equipos sofisticados y kits costosos, además de la experiencia de las personas que realizan la prueba. Esto representa una limitante en la cantidad de pruebas que se pueden realizar y su precisión general, principalmente en zonas marginadas del país, en particular cuando se consideran las pruebas masivas.

Con el fin de atacar dicha problemática, se han desarrollado pruebas rápidas para la detección de los antígenos presentes en la membrana y la cápside del SARS-CoV-2. Considerando que poco después de la aparición de los síntomas de COVID-19, tanto el RNA como las proteínas virales (antígenos), especialmente la proteína espiga, pueden detectarse en las muestras nasofaríngeas (Augustine et al., 2020).

Estas pruebas brindan un resultado 15-30 min después de colocar la muestra, tienen un menor costo y no requieren que un profesional en el área las realice (Prince-Guerra, 2021). La prueba consiste en la entrega de un kit que contiene un hisopo para la toma de un exudado nasofaríngeo, una disolución amortiguadora en la que se coloca dicho hisopo y el cartucho en el que se coloca y eluye la muestra. Estas pruebas de flujo lateral se basan en la inmunocromatografía y muestran la presencia del antígeno del SARS-CoV-2 mediante una línea coloreada (Schildgen et al., 2021).

No obstante, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés "*Food and Drug Administration*") en los E.E.U.U. únicamente ha aprobado el uso de las pruebas rápidas en pacientes sintomáticos. Esto se debe a que se realizaron diversos estudios comparando los resultados de dichas pruebas rápidas con la RT-qPCR. Se encontró un 64.2% de resultados positivos concordantes en pacientes sintomáticos y del 35.8% en pacientes asintomáticos, mientras que para ambos casos se encontró un 100% de resultados negativos concordantes (Prince-Guerra, 2021).

Los bajos porcentajes en la concordancia de resultados positivos resultan ser una desventaja importante para el uso de las pruebas rápidas de antígenos. Si bien son pruebas que te entregan un resultado en corto tiempo y de bajo costo, no tienen una confiabilidad cercana a la del estándar de oro en pacientes asintomáticos o con síntomas leves, lo que limita el rastreo de potenciales focos de infección. Su interpretación debe manejarse con sumo cuidado y un diagnóstico certero debe establecerse con base en los cuadros clínicos de cada paciente, auxiliados por un médico.

Antecedentes

Los ácidos nucleicos y sus enlaces.

Los biosensores de RNA tienen como fundamento una serie de procesos bioquímicos. Un proceso bioquímico es aquel que involucra las reacciones o interacciones químicas que ocurren comúnmente en un organismo biológico.

Los ácidos nucleicos son un tipo importante de macromoléculas presentes en todas las células y virus. Las funciones de los ácidos nucleicos tienen que ver con el almacenamiento y la expresión de información genética. El ácido desoxirribonucleico (DNA) codifica la información que la célula necesita para fabricar proteínas. Un tipo de ácido nucleico relacionado con él, llamado ácido ribonucleico (RNA) presenta diversas formas moleculares (mRNA, tRNA, miRNA, rRNA, entre otras) y participa en la síntesis de las proteínas.

Tanto el DNA como el RNA están formados por nucleótidos. Estas estructuras están conformadas por un azúcar ribosa (RNA) o desoxirribosa (DNA), una base nitrogenada y grupos funcionales fosfato (PO_4^{3-}).

Dentro de la estructura nucleotídica se encuentran numerosos enlaces covalentes. Estos enlaces se caracterizan por ser interacciones fuertes en las que dos átomos comparten los electrones de su nivel energético u orbital más externo. Gracias a ello se alcanza el llamado “octeto” que es el nivel máximo de estabilidad en una molécula.

Los ácidos nucleicos monocatenarios (de una sola cadena; cDNA, ssDNA, RNA) se reconocen entre sí de forma antiparalela y de acuerdo a la teoría de complementariedad de bases. Esta consiste en que la base adenina (A) se apareja con la base timina (T) en caso de ser DNA o uracilo (U) en caso de ser RNA; y la base guanina (G) con la base citosina (C) (Karp et al., 2015).

Dicha complementariedad se da debido a la estructura química de las bases nitrogenadas. Están conformadas principalmente por anillos aromáticos heterocíclicos. Las bases púricas (A y G) contienen un penta y un hexa heterociclo unidos para formar un anillo de nombre purina. Por lo que a dichas bases también se les denomina purinas.

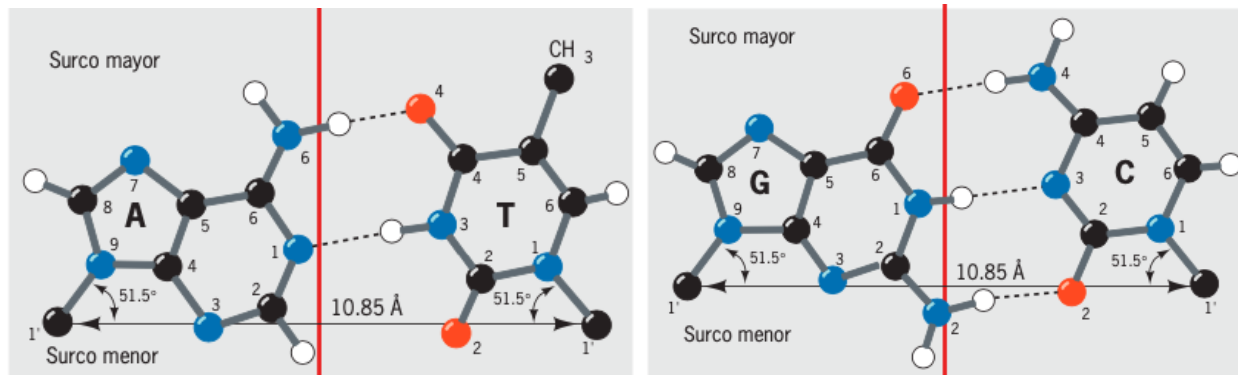


Imagen 3. Estructura de los pares de bases de Watson y Crick.

El modelo original mostraba tanto el par A-T como el G-C con dos enlaces de hidrógeno; el tercer enlace de hidrógeno en el par G-C fue identificado después por Linus Pauling. Las esferas negras representan al átomo de carbono, las azules al nitrógeno, las rojas al oxígeno y las blancas al hidrógeno. La línea punteada representa el enlace o puente de hidrógeno. (Karp et al., 2015)

Por otro lado, las bases pirimidínicas (T, U y C) contienen un solo anillo heterocíclico de seis elementos llamado pirimidina, razón por la cual también se les denomina pirimidinas (Chang & Goldsby, 2015).

Tanto la purina como la pirimidina contienen átomos de nitrógeno en su estructura. El nitrógeno es un átomo altamente electronegativo, es decir, tiene una alta capacidad de atraer electrones. Además, estas estructuras contienen numerosos átomos de hidrógeno que permiten la formación de puentes de hidrógeno.

Los puentes o enlaces de hidrógeno son un tipo de enlace débil que se forma entre dos átomos (un donador y un aceptor de hidrógeno) altamente electronegativos y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a uno de los dos átomos mencionados.

De acuerdo a la estructura química de las bases, se forman dos (A=T/U) o tres (G≡C) enlaces de hidrógeno. El alto número de estos enlaces permite la estabilidad y especificidad del reconocimiento y unión de las moléculas monocatenarias de ácidos

nucleicos, a lo que se le denomina hibridación. Dichos enlaces además están acompañados de otras interacciones débiles como las electrostáticas y otras fuerzas de Van der Waals que aumentan la estabilidad en la molécula.

Las fuerzas electrostáticas son aquellas que se forman entre dos átomos o moléculas cargadas. Los ácidos nucleicos tienden a ionizarse donando un ion hidrógeno (H^+) presente en sus grupos fosfato. Esta característica les confiere cargas negativas que pueden interaccionar con cargas positivas presentes en su entorno.

Finalmente, el nombre *ácido nucleico* se relaciona con la definición de Arrhenius de un ácido, que consiste en una especie donadora de cationes hidrógeno (H^+). Al disociarse, los cationes H^+ entran en un equilibrio químico con las moléculas de agua que rodean a la molécula donadora, formando enlaces covalentes de coordinación con la misma para obtener cationes hidronio (H_3O^+). En los enlaces covalentes de coordinación sólo un átomo es el donador del par de electrones necesario para unir a los dos átomos. Si existen dos o más de estos enlaces en una molécula, se habla de un complejo o compuesto de coordinación.

Un compuesto de coordinación o complejo es el resultado de la interacción de un átomo central y una o varias bases de Lewis (donadoras de electrones) llamadas ligandos. El átomo central es generalmente un metal que tiene espacios vacíos en su orbital más externo, mientras que el ligando es una especie con pares de electrones libres en el mismo.

Fundamento de las reacciones químicas orgánicas

El carbono es un elemento abundante en las macromoléculas biológicas. En los ácidos nucleicos tiene un papel importante en la estructura base de los azúcares, al igual que de las bases nitrogenadas. A diferencia de la mayoría de los otros elementos, el carbono forma enlaces fuertes con otros átomos de carbono y con una amplia variedad de elementos (H, O, N, P, S, etc.).

Se pueden generar cadenas y anillos de átomos de carbono para formar una variedad

infinita de moléculas, y es esta diversidad de compuestos del carbono la que representa la base de la vida en la Tierra (Simek & Wade, 2009).

Los seres vivos están formados principalmente de compuestos orgánicos complejos, los cuales se ocupan de sus funciones estructurales, químicas o genéticas. El término “orgánico” significa literalmente “derivado de los organismos vivos”. Dicho término se ha ido adaptando con el tiempo, hasta considerar como “orgánicos” a todos aquellos compuestos derivados de cadenas de carbono.

Los compuestos orgánicos pueden sufrir una innumerable cantidad de reacciones (sustitución, eliminación, óxido-reducción, entre otras). Para comprender a profundidad una reacción es necesario conocer su mecanismo; es decir, una descripción detallada de los pasos que siguen los reactivos para formar los productos. Para saber qué tan bien una reacción ocurre hacia la formación de los productos, se estudia su termodinámica. La termodinámica habla de los intercambios de energía de la reacción en un equilibrio químico entre los reactivos y la formación de productos. Las cantidades de reactivos y productos presentes en el equilibrio dependen de sus estabilidades relativas.

Aun cuando dicho equilibrio puede tender hacia la formación de un producto, es posible que la reacción no se lleve a cabo a una rapidez útil. Para utilizar una reacción en un periodo de tiempo real, se estudia su cinética. Esta es la variación de la rapidez de la reacción bajo diferentes condiciones y concentraciones de reactivos. Comprender la cinética de una reacción ayuda a proponer mecanismos de reacción consistentes con el comportamiento que se observa (Simek & Wade, 2009).

La cinética de una reacción puede verse afectada por factores como la temperatura, la presión, la concentración de reactivos, entre otros. Las concentraciones de los reactivos y productos en el equilibrio están determinadas por la constante de equilibrio de la reacción (K_{eq}).

El que ocurra o no una reacción química depende de la reactividad de los grupos

funcionales presentes en los reactivos. Estos a su vez dependen de la composición elemental de dichas moléculas y de la estabilidad de sus radicales libres. La formación de radicales libres e intermediarios reactivos (carbocationes, carbaniones, entre otros) es el paso de iniciación para que ocurra una reacción entre moléculas orgánicas.

Seguido de esto, se encuentran los pasos de propagación. Son aquellos pasos de una reacción en cadena que se repiten una y otra vez para formar el producto. Finalmente ocurren los pasos de terminación, pasos en los que se consume el reactivo intermediario sin que se genere otro y la reacción llega al equilibrio.

El fundamento del método experimental estudiado en esta tesis es el uso de macromoléculas orgánicas (cDNA, ssDNA, fluorocromos, entre otras). De acuerdo a su composición química, dichas moléculas pueden sufrir cambios en su estructura debido a la presencia de reactivos que favorecen ciertas reacciones químicas.

Biosensores

Los biosensores son dispositivos analíticos que incorporan un material biológico y están asociados o integrados en un transductor fisicoquímico o microsistema de transducción. El transductor puede ser óptico, electroquímico, termométrico, piezoeléctrico, magnético o micromecánico.

A partir de dicho concepto, surgió en 2015 un proyecto con el equipo de investigación de la Dra. Catalina Stern Fogach en la Facultad de Ciencias (FC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), conformado por la Dra. Tatiana Fiordelisio, el Dr. Mathieu Hautefeuille y alumnos de doctorado, quienes desarrollaron la invención denominada *Dispositivo para la detección y medición de biomoléculas usando como muestra un fluido corporal*. Este dispositivo puede detectar biomoléculas en una muestra de fluido corporal utilizando la combinación de dos métodos. Uno de ellos consiste en un método óptico que permite la inmunodetección, empleando anticuerpos específicos para la detección de moléculas como insulina, hemoglobina glicosilada, estradiol, testosterona, prolactina, somatotropina, tirotropina, entre otras. El segundo,

es un método electroquímico para detectar moléculas como glucosa, colesterol, creatinina, ácido úrico, triglicéridos, entre otras.

Las dos grandes ventajas de este dispositivo son que se pueden detectar de manera simultánea distintos analitos, que es portátil, de fácil uso y con la posibilidad de miniaturización (adaptación en chip).

Biosensor para detección de ácidos nucleicos

Más adelante y con esta misma idea, en el Laboratorio de Neuroendocrinología Comparada dirigido por la Dra. Tatiana Fiordeliso en la FC de la UNAM, surgió la *prueba de hibridación de competencia para la detección de ácidos nucleicos empleando microperlas magnéticas* (biosensor de ácidos nucleicos). Posteriormente, el laboratorio se incorporó al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT), adoptando a su vez, el Sistema de Gestión de Calidad con base en la ISO 9001.

Para los biosensores de ácidos nucleicos se utilizan partículas o perlas magnéticas acopladas a estreptavidina, una proteína particular que reconoce a otra llamada biotina que se acopla a la cadena de cDNA a utilizar (ssDNA-biotinilado). El reconocimiento de la estreptavidina de la Dynabead™ (perla magnética) y la biotina de los ssDNA-biotinilados, es una de las interacciones biológicas no covalentes más fuertes conocidas, con una constante de disociación (K_d) de $\sim 10^{-14}$ M. (Corman et al., 2020; Luong & Vashist, 2020) De acuerdo a estudios de acoplamiento molecular, esta unión está mediada por numerosos puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, interacciones formadas principalmente entre los residuos de triptófano y fenilalanina de cada proteína (Stayton et al., 1999).

Las partículas magnéticas, inventadas en Noruega, son el estándar de oro para la captura, aislamiento y manejo de moléculas biotiniladas (acopladas a biotina). Han sido utilizadas en laboratorios de todo el mundo durante más de 20 años y a su vez, son atractivas para una amplia variedad de aplicaciones, tales como inmunoensayos,

aislamiento y purificación de ácidos nucleicos, proteínas y/u organelos celulares, entre otras. Tanto el tamaño de la molécula biotinilada como el procedimiento de biotinilación afectan su capacidad de unión, que depende además del impedimento estérico, de la interacción de carga perla-molécula y de las interacciones intermoleculares.

Biosensor para detección de SARS-CoV-2 y diagnóstico de COVID-19

Debido a la pandemia, se centraron los esfuerzos en el desarrollo y estandarización de un biosensor para diagnóstico de COVID-19. Esto se realizó con base en la detección del genoma del SARS-CoV-2, particularmente de los genes blanco que se utilizan para su detección a través de la RT-qPCR. El biosensor de ácidos nucleicos, consiste esencialmente en 3 etapas:

- 1) Funcionalización.** Proceso en el que las perlas magnéticas (Dynabeads™ M-270 Estreptavidina) son cubiertas con una molécula de biotina que está unida a una secuencia sintética similar a la del analito que se requiera detectar (ssDNA-biotinilado). Para este particular caso, la secuencia es similar a la de los genes *N* y *E* presentes en el SARS-CoV-2.
- 2) Reacción de competencia.** Los analitos a medir (RNA sintético o RNA viral presente en muestras de pacientes COVID-19) reaccionan por hibridación con secuencias complementarias marcadas como elementos de detección (ácido nucleico marcado fluorescentemente o cDNA-fluorescente), dejando libre una cantidad inversa a la concentración de la molécula a detectar.
- 3) Reacción de detección.** Posterior a la competencia, las perlas magnéticas funcionalizadas reaccionan por hibridación con los elementos de detección libres y se procede a la medición de la marca emitida en las partículas magnéticas a través de un lector de fluorescencia.

En el desarrollo de este método experimental, están involucradas una serie de interacciones físicas, bioquímicas y químicas que se encuentran interrelacionadas. Un ejemplo de las primeras son las que se presentan en la etapa de funcionalización. Las

perlas magnéticas están hechas de partículas de óxido de hierro recubiertas de polímeros con diámetros que van desde 35 nm hasta 4.5 μm . Exhiben una cualidad única llamada superparamagnetismo en presencia de un campo magnético externo, es decir, que son susceptibles a un campo magnético externo, pero no presentan propiedades magnéticas entre ellas.

Algunas de las interacciones del segundo tipo (bioquímicas), se presentan en cada paso de la metodología experimental. En la unión de la estreptavidina acoplada a la perla magnética con la biotina del ssDNA-biotinilado, ocurre una interacción bioquímica de reconocimiento. Dicho reconocimiento se encuentra abundantemente en la naturaleza, entre la biotina y la avidina. En la bacteria *Streptomyces avidinii* se ha encontrado un homólogo de la avidina que se une de manera similar a la biotina, la estreptavidina. Asimismo, el reconocimiento de las hebras de ssDNA-cDNA-RNA es un proceso bioquímico que se ha adaptado para lograr un objetivo específico.

Finalmente, las interacciones químicas están presentes en las dos interacciones anteriores. La aleación de la que están hechas las perlas magnéticas es consecuencia de un proceso químico que le confiere dichas características. La unión biotina-estreptavidina se da debido a la formación de enlaces químicos entre ellas. El reconocimiento entre las hebras de ssDNA-cDNA-RNA se da con la formación de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre las bases nitrogenadas presentes en los ácidos nucleicos.

En la segunda etapa del método (competencia) se utilizan cDNAs acoplados a un fluorocromo o fluoróforo (cDNA-fluorescente), es decir, un componente que le confiere fluorescencia a dichos cDNAs. En esta etapa ocurre la primera hibridación, que corresponde a la del RNA viral (en caso de encontrarse en la muestra) con el cDNA-fluorescente. En dicha hibridación, idealmente el RNA reconoce a su secuencia complementaria y se unen las bases nitrogenadas de cada ácido nucleico formando puentes de hidrógeno.

El fenómeno de fluorescencia es un tipo de luminiscencia debido a estados electrónicamente excitados. Estos estados se dan cuando los electrones en niveles basales de energía son excitados por una longitud de onda determinada, absorbiendo dicha energía y subiendo su nivel energético. Al regresar los electrones a su nivel energético basal, pierden energía debido a las vibraciones moleculares y finalmente liberan la energía absorbida en forma de luz a una longitud de onda menor, a lo que se denomina emisión, dando así la fluorescencia.

Para determinar de manera específica el espectro de emisión del analito, es necesario determinar su longitud de onda de absorción o absorbancia. La absorbancia es la relación logarítmica de la luz resultante después de incidir en una sustancia. En otras palabras, es un parámetro con el que se mide la cantidad de luz perdida debido a su choque con las sustancias presentes en una disolución (Eichler et al., 2018).

El mayor índice de fluorescencia se da en moléculas que contienen grupos funcionales aromáticos. No obstante, los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces conjugados también pueden presentarla (Sanderson et al., 2014).

Tratamiento general de muestras

Las muestras clínicas a tratar, se obtienen a partir de un exudado faríngeo. El hisopo se coloca en un medio de transporte viral (MTV) con el fin de conservar la muestra íntegra durante el transporte del sitio de la toma de muestra hasta el laboratorio clínico. Los componentes del MTV pueden variar de un fabricante a otro, sin embargo, de forma general contiene:

- Disoluciones salinas isotónicas enriquecidas con proteínas (albúmina de suero bovino) y aminoácidos (L-cisteína, ácido L-glutámico),
- Buffer (HEPES) e indicador (Rojo fenol) de pH para amortiguar y detectar los posibles cambios de pH respectivamente.

- Antibióticos (vancomicina, colistina, estreptomina, penicilina, etc.) y antifúngicos (anfotericina B) para inhibir la proliferación de bacterias y levaduras competidoras.
- Crioprotectores (sacarosa) que facilitan la conservación de los virus en caso de congelar las muestras para un almacenamiento prolongado.

Para realizar las pruebas de forma segura, se inactiva la muestra con una disolución de inactivación. De igual manera, sus componentes pueden variar de un fabricante a otro, no obstante, de forma general contienen:

- Detergentes o agentes reductores (β -mercaptoetanol), para lisar la membrana plasmática de las células hospedadoras.
- Disolventes orgánicos (fenol, cloroformo), para el aislamiento de moléculas con base en sus propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas.
- Sales amortiguadoras de pH (EDTA, fosfatos y/o sulfatos).
- Otras sustancias químicas desnaturizantes de proteínas, lípidos, entre otras moléculas contaminantes del RNA.

Los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés "*Centers for Disease Control and Prevention*") en los E.E.U.U. han estandarizado un protocolo de preparación y una formulación de MTV para cultivo u otros medios de detección viral con su respectivo control de calidad (Mathuria et al., 2020).

En la etapa final del método experimental (detección) ocurre una última hibridación, que se da entre el cDNA-fluorescente que no se unió al RNA viral y el cDNA unido a la perla magnética funcionalizada, donde se da un reconocimiento entre ácidos nucleicos similar a la etapa de competencia.

De manera comercial, se pretende adaptar la técnica a un kit, con el fin de entregar al consumidor una placa de ELISA con las perlas magnéticas funcionalizadas y una placa

de PCR con los cDNA-fluorescentes, de forma que el analista únicamente coloque la muestra del paciente en dicha placa de PCR para la reacción de competencia y posteriormente realice la detección en la placa de ELISA.

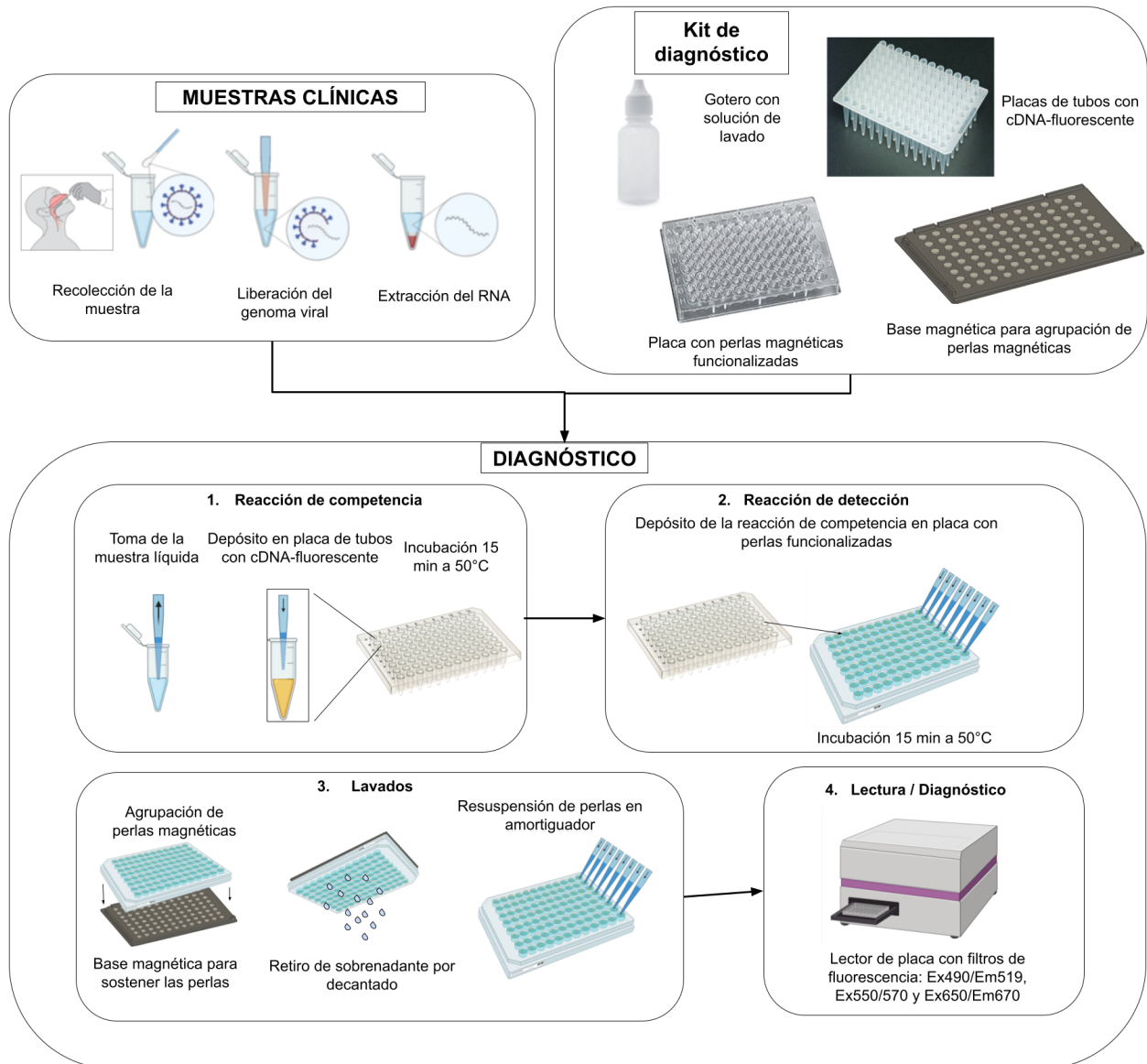


Imagen 4. Plan de trabajo e implementación de la prueba de hibridación en hospitales.

Hipótesis

Si la base del biosensor de ácidos nucleicos es su hibridación y detección por fluorescencia, entonces cualquier alteración sobre estos dos procesos tendrá como consecuencia un resultado erróneo.

Para el tratamiento de muestras clínicas se utilizan diferentes sustancias químicas con propiedades caotrópicas y de degradación de lípidos, con el fin de inactivar el virus y conservar su material genético. Algunas de estas sustancias pueden interactuar con los componentes de la prueba y por lo tanto, con sus procesos base.

El medio de transporte viral (MTV) puede tener un amplio espectro de fluorescencia debido a la presencia del rojo de fenol en su formulación.

El tiocianato de guanidinio contenido en el TRIzol™ puede formar heterociclos al reaccionar con los fluoróforos utilizados. Además, puede unirse como ligando a un átomo metálico central para formar un compuesto de coordinación que puede interferir en la hibridación de los ácidos nucleicos de la prueba.

El RNA humano obtenido al tomar la muestra, puede interferir por impedimento estérico en la hibridación de los ácidos nucleicos de la prueba con el RNA viral a detectar.

Objetivo general

Estudiar el efecto de las interacciones químicas que se establecen entre las sustancias presentes en el tratamiento de muestras de pacientes COVID-19 y los componentes de la *prueba de hibridación de competencia para la detección de ácidos nucleicos empleando microperlas magnéticas*, con el fin de establecer una condición específica como parte de la estandarización y validación de la misma.

Objetivos particulares

- Describir los componentes de las disoluciones utilizadas en el tratamiento de muestras de pacientes a diagnosticar para COVID-19.
- Describir las interacciones químicas que se establecen entre las muestras tratadas y los componentes de la prueba.
- Determinar si existe una variación de los resultados entre las disoluciones con base en las interacciones químicas presentes.
- Identificar los puntos críticos en los que las disoluciones utilizadas pueden producir reacciones químicas no deseadas con los componentes de la prueba, que a su vez puedan cambiar el resultado de esta.
- Proponer el uso (y modo de uso) de una disolución específica que cumpla con los requisitos de la prueba y permita obtener un resultado correcto.

Metodología

Con el fin de identificar los puntos críticos en los que las soluciones donde se toman las muestras pueden afectar los resultados del biosensor para COVID-19, se realizaron pruebas clínicas. Dichas pruebas se diseñaron con base en el protocolo estandarizado de la *prueba de hibridación de competencia para la detección de ácidos nucleicos empleando microperlas magnéticas*.

Se definieron los siguientes conceptos:

Lavar: Agregar la disolución de lavado, reposar 1 min y retirar inmediatamente.

Agrupar perlas magnéticas (en tubo): Colocar los tubos sobre la gradilla de imanes durante al menos 60s.

Agitar vigorosamente: Agitar con vórtex o similar, a una velocidad determinada.

Agitar suavemente: Agitar con Hulamixer a una programación determinada.

Técnica de agitación de placa: Dar golpes laterales suaves a la placa hasta dispersar las perlas magnéticas y colocar a 300/500 rpm en un agitador orbital.

Agrupar perlas magnéticas (en placa): Colocar la placa sobre la base magnética, dejando actuar al imán durante al menos 60s antes de retirar el sobrenadante por decantación.

Toma e inactivación de muestras

Las muestras de pacientes COVID-19 se adquirieron por medio de una colaboración con instituciones autorizadas para su toma y manejo, participando el InDRE, el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), la Unidad de Medicina Familiar/UMAA (UMF) No. 198 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) Unidad Coacalco, Estado de México. Igualmente se colaboró con los hospitales San José y Zambrano Hellion pertenecientes a la fundación TecSalud en la ciudad de Monterrey, Nuevo León para la estandarización y validación del método.

Las muestras se tomaron por medio de exudados naso y/u orofaríngeos. El hisopo con el exudado se colocó y mezcló en el medio de transporte viral, posteriormente se tomó una alícuota del medio de transporte viral (MTV) y se mezcló en una proporción 1:1 con la disolución de inactivación (TRizol™ o DNA/RNA Shield™).

Específicamente, se añadieron 250 µL de disolución de inactivación a tubos para microcentrífuga de 1.5 mL debidamente identificados. Se agitó la muestra en el medio de transporte viral por inversión y se transfirió el volumen suficiente al tubo con disolución de inactivación hasta llegar a la marca de 0.5 mL. Se homogeneizó y almacenó la muestra a 4 °C. En caso de almacenarse por un tiempo prolongado, se realizó en ultracongelación a -70 °C.

Cuando las muestras se encuentran en el medio de transporte viral, el virus SARS-CoV-2 se encuentra activo, por lo que se manejaron de acuerdo al protocolo de seguridad especificado por la Secretaría de Salud.

En las pruebas para esta tesis, se utilizaron como disoluciones de inactivación el TRizol™ producido por la empresa Thermo Fisher Scientific™ y el DNA/RNA Shield™ producido por la empresa Zymo Research™. Estas disoluciones se utilizan

constantemente para el aislamiento, purificación y estudio de DNA y RNA en diferentes metodologías, tales como la PCR y sus respectivas variantes (RT-PCR, qPCR, RT-qPCR).

Con el fin de evaluar la variabilidad en el resultado de la prueba en presencia y ausencia de MTV + disoluciones de inactivación, se realizó la purificación del RNA presente en las muestras clínicas.

Antes de la etapa de reacción de competencia, se realizó el tratamiento de muestras, con base en la prueba RT-qPCR validada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE), sustentado en el protocolo de Berlín.

Extracción y purificación de RNA total

El procedimiento de purificación cambia en función de la disolución de inactivación que se utilice, para el TRIzol™ fue el siguiente:

1. Se agregaron 200 μ L de cloroformo por cada mL de TRIzol™ utilizado, se agitó vigorosamente durante 15 s.
2. Se incubó 5 min a T.A. Se centrifugó a 3500 rpm/4 °C/5 min.
3. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo. Se le agregaron 500 μ L de isopropanol por cada mL de TRIzol™ utilizado, se mezcló suavemente y se incubó a T.A./10 min. Una vez más se centrifugó a condiciones similares y se descartó el sobrenadante.
4. El material sedimentado (pellet) resultante se lavó con 1 mL de EtOH en agua DEPC, se centrifugó a 3500 rpm/4 °C/5 min y se descartó el sobrenadante.
5. El pellet se dejó secar a T.A./20 min.
6. Cada pellet se resuspendió en un volumen determinado de agua inyectable o agua DEPC. Todas las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Para el DNA/RNA Shield™ se utilizó el kit comercial de Zymo Research™ Quick-RNA™ Viral Kit, Cat. No. R1035 y se siguieron las instrucciones de acuerdo al fabricante. Dichas instrucciones esencialmente consisten en el procedimiento siguiente:

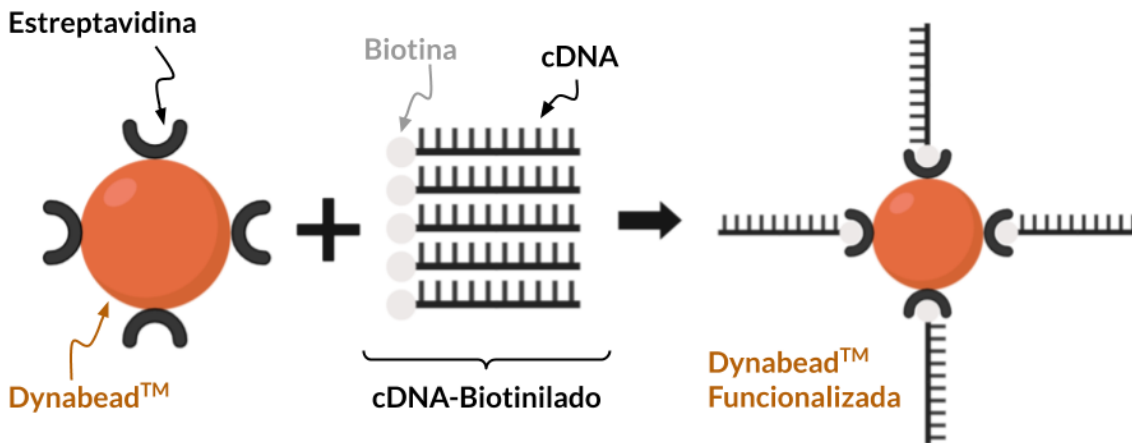
1. Se transfirieron 400 μ L del Viral RNA Buffer a los tubos para microcentrífuga correspondientes con etiquetado sencillo en tapa.
2. Se transfirieron 200 μ L de la muestra tratada al tubo eppendorf que contiene los 400 μ L del Viral RNA Buffer. Se agitó vigorosamente durante 10 s.
3. Se transfirió el total del volumen de muestra (600 μ L) a la Zymo-Spin™ Columna que se encuentra sobre un tubo colector.
4. Se centrifugó la Zymo-Spin™ Columna con su tubo colector durante 2 min a 14,000 rpm.
5. Se colocó la Zymo-Spin™ Columna en un tubo colector nuevo y se desechó tanto el filtrado como el primer tubo colector.
6. Se agregaron 500 μ L del Viral Wash Buffer a la columna y se centrifugó durante 30 s a 14,000 rpm, se desechó el líquido del tubo colector y la columna se colocó nuevamente en él. Se repitió una vez este paso.
7. Se agregaron 500 μ L de EtOH grado biología molecular a la columna y se centrifugó durante 1 min a 14,000 rpm para asegurar la remoción completa del EtOH. Se desechó el tubo colector.
8. Se transfirió cuidadosamente la columna a un tubo para microcentrífuga nuevo.
9. Se agregaron 40 μ L de agua inyectable a la columna y se centrifugó durante 1 min a 14,000 rpm.

Una vez tratadas las muestras, se prosiguió a las etapas de competencia y detección.

El método de detección desarrollado para la *hibridación de competencia para la detección de ácidos nucleicos empleando microperlas magnéticas* (trabajo inédito), se compone de tres fases: funcionalización, competencia y detección. Dado que el interés de esta tesis es evaluar el efecto de las soluciones empleadas para la toma de muestra, el método de hibridación se desarrolla de manera general.

La etapa de funcionalización se encuentra estandarizada con base en las recomendaciones del manual de las Dynabeads™ M-270 Estreptavidina.

Etapa 1: Reacción de funcionalización: Perlas magnéticas vs RNA-biotinilado



1.1. Planificación (Ejemplo)

Cuadro 1. Ejemplo de cuadro de planificación con base en el número de pruebas.

Nombre del Experimento	Control 1 - Muestras TRIzol
Número de Placas a Preparar	3
Unidades de funcionalización por placa	94
Unidades de funcionalización netas	282
Número de genes a detectar	2
Número de tubos necesarios por gen	E: 3, N: 3
Volumen de Dynabeads/Tubo	170 µL
BL2X	510 µL
Volumen de disolución de funcionalización/Tubo	510 µL
Volumen de resuspensión de Sol. B	510 µL
Volumen de Sol. B en el reservorio	9,148 µL
Volumen de sembrado en cada pozo	50 µL

1.2. Esquema de Trabajo (Ejemplo)

En el esquema de trabajo se presenta el modo de preparación de las disoluciones estándar de ssDNA-biotinilado, cDNA-fluorescente y RNA sintético; el número y orden de pozos de la placa de ELISA que se utilizarán, así como el registro y número de pacientes; y el volumen de cada disolución a agregar en la placa de PCR de 96 tubos para la competencia (placa de competencia).

Cuadro 2. Ejemplo de cuadro de preparación de disoluciones de ssDNA-biotinilado con base en el número de pruebas.

Px4_A1_PERSONAL_EXUDADOS_SHIELD					
RÓTULO	pmol/10uL	ssDNA N-Biot (μL) IDT	ssDNA N-Biot (μL) IDT	H2O DEPC INACT (μL)	Volumen final (μL)
3.3-EB	3.3	2.5		899.0	901.5
3.3-NB	3.3		2.5	952.0	954.5

Cuadro 3. Ejemplo de cuadro de preparación de disoluciones de cDNA-fluorescente con base en el número de pruebas.

Px4_A1_PERSONAL_EXUDADOS_SHIELD					
RÓTULO	pmol/10uL	cDNA Fluorescente	cDNA Stock (μL)	Sol. B (μL)	Volumen final (μL)
E-FLUO	2.0	1.7		992.8	994.5
N-FLUO	2.0		2.0	998.0	1000.0

Cuadro 4. Ejemplo de cuadros de preparación de disoluciones de RNA-sintético con base en el número de pruebas.

Px4_A1_PERSONAL_EXUDADOS_SHIELD							
Tipo de SpC	Rótulo	pmol/10uL	RNA Sintético			Solución B (μL)	Volumen final (μL)
			RNA E (μL)	Sol. 3 E (μL)	Sol. 1 E (μL)		
RNA Sintético	3 E	3.0	0.5			196.2	196.7
	1 E	1.0		90.0		180.0	270.0
	0.5 E	0.5			135.0	135.0	270.0

Px4_A1_PERSONAL_EXUDADOS_SHIELD							
Tipo de SpC	RÓTULO	pmol/10uL	RNA Sintético			Solución B (μL)	Volumen final (μL)
			RNA N (μL) IDT	Sol. 3 N (μL)	Sol. 1 N (μL)		
RNA Sintético	3 N	3.0	0.5			222.8	223.3
	1 N	1.0		90.0		180.0	270.0
	0.5 N	0.5			135.0	135.0	270.0

Cuadro 5. Ejemplo del esquema de preparación de la reacción de detección.

		PLACA 1									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	NEG	1-EN	1-EN'	9-EN	9-EN'	17-EN	17-EN'	25-EN	25-EN'	NEG	
B	NEG	2-EN	2-EN'	10-EN	10-EN'	18-EN	18-EN'	26-EN	26-EN'	NEG	
C	Curva_0.1pmol	3-EN	3-EN'	11-EN	11-EN'	19-EN	19-EN'	27-EN	27-EN'	Curva_0.1pmol'	
D	Curva_0.5pmol	4-EN	4-EN'	12-EN	12-EN'	20-EN	20-EN'	28-EN	28-EN'	Curva_0.5pmol'	
E	Curva_1pmol	5-EN	5-EN'	13-EN	13-EN'	21-EN	21-EN'	29-EN	29-EN'	Curva_1pmol'	
F	Curva_3pmol	6-EN	6-EN'	14-EN	14-EN'	22-EN	22-EN'	30-EN	30-EN'	Curva_3pmol'	
G	POS	7-EN	7-EN'	15-EN	15-EN'	23-EN	23-EN'	31-EN	31-EN'	POS'	
H	BLANCO	8-EN	8-EN'	16-EN	16-EN'	24-EN	24-EN'	32-EN	32-EN'	BLANCO	

1.3. Preparación preliminar

Se realizó un lavado con B4-BSA 0.01% de las columnas del reservorio a utilizar para el sembrado de Dynabeads™ (perlas magnéticas) funcionalizadas, así como de la placa de ELISA. Se colocó el volumen de disolución B en el mismo reservorio indicado en el cuadro de planificación para cada experimento. Se prepararon las disoluciones de funcionalización según el esquema de trabajo para dicho fin.

1.4. Lavados Pre-Funcionalización Buffer de Lavado 1X (BL1X)

Se agitó vigorosamente el frasco de perlas magnéticas durante 30 s. Se tomó el volumen indicado en el cuadro de planificación. Se agruparon las perlas magnéticas con imanes y se descartó el sobrenadante de la disolución comercial de resuspensión. Se adicionaron 500 µL de Buffer de Lavado 1X (BL1X) y se agitó vigorosamente durante 30 s. Se agruparon las perlas magnéticas con imanes, se retiró y descartó el sobrenadante por completo. Se repitió a partir del BL1X dos veces más (total de 3 lavados).

1.5. Lavados Pre-Funcionalización con disolución A (Sol. A)

Se adicionaron 500 µL de Sol. A, se resuspendió y agitó suavemente durante 2 min. Se agruparon las perlas magnéticas con imanes, retiró y descartó el sobrenadante por completo. Se repitió una vez este paso (total de 2 lavados).

1.6. Lavados Pre-Funcionalización con disolución B (Sol. B)

Se adicionaron 500 μ L de Sol. B y se agitó vigorosamente durante 30 s. Se agruparon las perlas magnéticas con imanes, se retiró y descartó el sobrenadante.

1.7. Incubación de Funcionalización

Se añadió Buffer de lavados 2X (BL2X), indicado en el cuadro de planificación, se agitó vigorosamente durante 30 s. Se añadió el volumen indicado de disolución de funcionalización a los tubos con perlas magnéticas. Se agitó vigorosamente durante 30 s y se incubó en agitación suave durante 15 min a temperatura ambiente (T.A.).

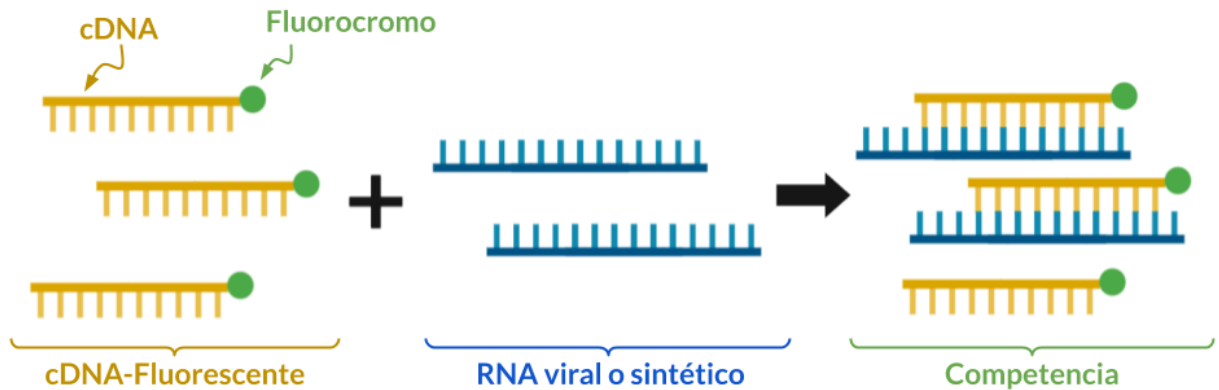
1.8. Lavados post-funcionalización.

Al culminar el tiempo de incubación de funcionalización, se agruparon las perlas magnéticas con imanes, se retiró y descartó el sobrenadante. Se añadieron 500 μ L de BL1X y se agitó vigorosamente durante 5 s. Se agruparon las perlas magnéticas con imanes, se retiró y descartó el sobrenadante. Se repitió dos veces este paso (total de 3 lavados). Se añadió el volumen de disolución B de resuspensión indicado en el cuadro de planificación y se agitó vigorosamente durante 30 s.

1.9. Lavados post-funcionalización y siembra de perlas magnéticas.

Se transfirió el contenido del tubo a la columna correspondiente del reservorio de siembra. Se sembraron las perlas magnéticas con el robot pipeteador en la placa de ELISA, exceptuando el blanco. Se agruparon las perlas magnéticas con imanes, se retiró y descartó el sobrenadante. Se añadieron 50 μ L de Sol B a cada pozo y se agitó suavemente durante 30 s.

Etapa 2. Reacción de competencia: RNA sintético/muestra del paciente vs cDNA-fluorescente

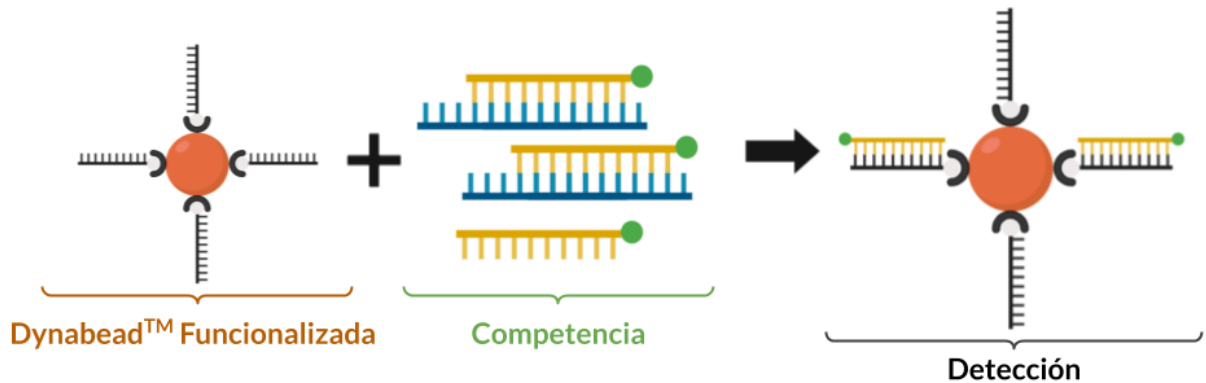


2.1. Preparación de placa de competencia

Se prepararon las disoluciones estándar de cDNA-fluorescente y RNA sintético (competencia) correspondientes. Se colocó el volumen indicado de cada disolución de cDNA-fluorescente en una columna del reservorio (disolución de cDNA). Se sembró en la placa de competencia la disolución de cDNA según el esquema de trabajo, utilizando el robot pipeteador. Se selló la placa de competencia con acetato adhesivo para placas de PCR, y se protegió de la incidencia de la luz con papel aluminio. Se añadió el volumen indicado de las disoluciones de RNA sintético de cada punto de la curva a los tubos correspondientes según el esquema de trabajo. Se agitaron las muestras y se transfirió el volumen indicado. Se sellaron los tubos con el acetato, se calentaron a 90 °C/3 min y se incubó a 50 °C/15 min en agitación.

Para ciertos experimentos se omitió el calentamiento a 90 °C del punto 2.1 del procedimiento. Esto debido a que el objetivo social de la prueba es que llegue a zonas marginadas del país, donde a su vez se requiera la menor cantidad posible de recursos. El calentamiento a temperaturas altas implica la necesidad de un equipo que lo permita y de materiales termoestables de alto costo.

Etapa 3. Reacción de detección: Perlas magnéticas funcionalizadas vs competencia



3.1. Reacción de perlas magnéticas funcionalizadas con reacción de competencia y detección.

Se dejó enfriar la competencia a T.A. durante 5 min. Se transfirió en su totalidad el contenido de los tubos a los pozos que correspondan según el esquema trabajo. Se realizó la técnica de agitación de la placa, se tapó y cubrió con papel aluminio. Se incubó a 50 °C/15 min en agitación.

3.2. Lavados de reacción de detección

Se agruparon las perlas magnéticas con imanes y se retiró el sobrenadante por decantación. Se añadieron 50/100 µL de BL1X a cada pozo y se realizó la técnica de agitación de placa. Se repitió una vez más. Se tapó la placa y se cubrió con papel aluminio. Finalmente se llevó al lector de placa (Cytation5™, Synergy™, Fluoroskan™ y/o Microscopio Confocal). Al terminar, se almacenaron las placas a 4 °C.

Medición de fluorescencia y captura de imágenes

Se estandarizaron los programas de lectura de fluorescencia en cada equipo, en función de las longitudes de onda de absorción y emisión de los fluorocromos acoplados al cDNA para cada gen (Véase Anexo 2). Se utilizaron los

cDNA-fluorescentes proporcionados por las empresas IDT™ y T4Oligo™, que acoplan los fluorocromos Alexa Fluor™ 488 y FAM™ 488 para el gen N respectivamente; Alexa Fluor™ 647 y Quasar™ 670 para el gen E respectivamente.

La captura de imágenes se realizó con el microscopio confocal, servicio que brinda la Unidad de Imagenología Cuantitativa (UnICua) en la Facultad de Ciencias, UNAM y con el Cytation5™ con la función de microscopía de epifluorescencia del programa Gen 5.0™. Dicha captura se basa en la emisión de una energía luminiscente predeterminada para la detección de los fluorocromos utilizados. Se utilizó la misma configuración (ganancia, exposición, ISO, entre otras) en los experimentos relacionados para una correcta comparación y análisis. En ambos equipos se utilizaron los filtros adecuados para la detección de la fluorescencia a longitudes de onda de 480-490 nm y 640-670 nm.

La presencia de numerosas sustancias tanto en el medio de transporte viral como en la disolución de inactivación pueden tener interferencias importantes en las reacciones de competencia y detección. Debido a ello se realizaron distintos experimentos, con el número de perlas magnéticas, de ssDNA-biotinilado y cDNA-fluorescente como variable independiente. En cambio, las variables dependientes fueron el tipo de disolución de inactivación y condiciones específicas de experimentación durante las etapas de competencia y detección.

Cada prueba clínica y experimento control se realizó por triplicado. Se realizaron curvas de referencia o control con RNA sintético similar al del virus en función de las variables a evaluar. En dichas curvas se incluye un control negativo (NEG) equivalente a la ausencia de RNA viral y por lo tanto, el punto más fluorescente de la curva.

Se agregaron entre una y dos curvas con el fin de detectar posibles errores aleatorios y/o sistemáticos, además de asegurar la confiabilidad de los resultados y de ser posible, cuantificar la carga viral presente en la muestra.

El trabajo experimental con RNA se realizó con sumo cuidado debido a la inestabilidad de éste y a la abundante presencia en el ambiente y en el cuerpo del usuario de enzimas que lo degradan (RNAsas). Además, los medios de inactivación contienen sustancias altamente tóxicas para el usuario, por lo que tanto para el manejo de RNA como de las muestras clínicas, es indispensable portar un Equipo de Protección Personal (EPP) adecuado, limpiar las áreas constantemente con Etanol 70% (EtOH 70%) y trabajar en una campana de flujo laminar.

Análisis de datos

Los siguientes análisis se realizaron con el software Sheets™ de Google™:

- Normalización de datos brutos respecto al control negativo
- Normalización de datos brutos respecto al número de perlas magnéticas

Los siguientes análisis se realizaron con el software de Graphpad™ Prism8/9™, licencia: GPS-1622103-TLQA-10AC6

- Análisis estadísticos de t de student y ANOVA.
- Regresión lineal de 4 parámetros
- Gráficas de datos

La cuantificación de perlas magnéticas para la normalización se realizó con un programa de segmentación semiautomática (González Villa, 2017).

Los cálculos de eficiencia del método se realizaron con base en una matriz de cálculo reportada (Vizcaíno-Salazar, 2017).

Resultados

Esta etapa del proyecto ayudó a definir las condiciones óptimas de la toma y procesamiento de muestras al inicio del mismo. Las soluciones empleadas, debían cumplir con la característica de inactivar el virus y mantener en buenas condiciones el RNA. Adicionalmente, se esperaba encontrar un medio que permitiera realizar la

prueba sin necesidad de purificación, evitando con ello al máximo el uso de equipos y reactivos.

Efecto del MTV + TRIzol™ en la detección de pruebas clínicas

Inicialmente se probaron muestras clínicas proporcionadas en MTV por el INER y el InDRE, las cuales fueron inactivadas con TRIzol™. En las gráficas se representa el promedio de las curvas de referencia con la cantidad de RNA sintético representada en copias virales (CV) y las muestras clínicas representadas en el número de registro de paciente (Px) al momento de la toma de muestra. Se estimó una equivalencia en pmol de RNA sintético a CV, basada en una curva de referencia con la cantidad de genoma viral como variable independiente contra resultado de RT-qPCR en CT como variable dependiente. Entonces, se estimó que 6×10^4 CV \equiv 0.1 pmol (Anexo 3).

Se emplearon diferentes volúmenes de muestra para encontrar el volumen óptimo para una detección adecuada. Se encontró que al utilizar 5 μ L de muestra (2.5 μ L de TRIzol™ + 2.5 μ L de MTV), la fluorescencia correspondiente al fluoróforo del gen N aumenta significativamente (Fig. 1A) ya que, se observa que los resultados de los pacientes se encuentran por arriba del control negativo (NEG) que teóricamente debe ser el punto más fluorescente. Existe además una discrepancia en los resultados para uno y otro gen, donde el gen E indica que todas las muestras resultaron positivas y dentro de la curva de referencia (Fig. 1B). Por ello, no es posible considerarlo un resultado confiable.

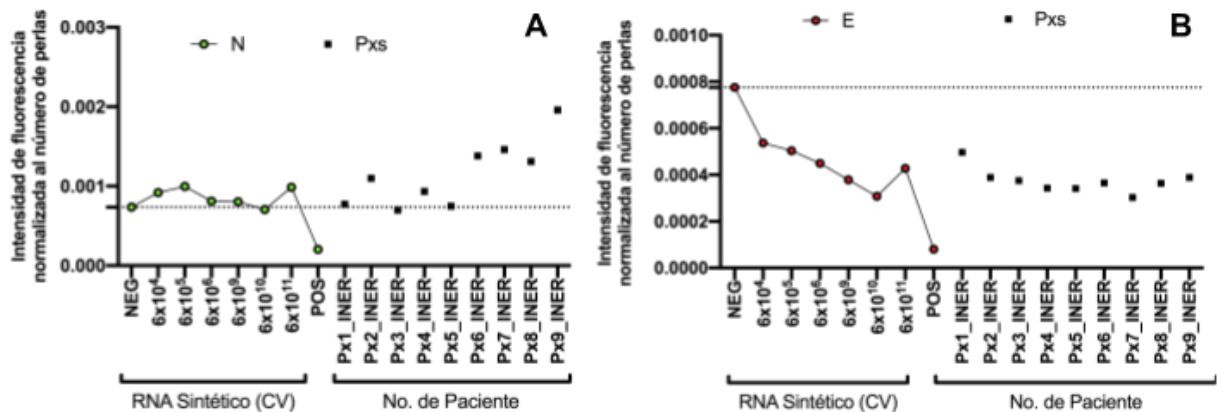


Figura 1. Efecto del MTV + TRIZOL™ en la detección de curvas de RNA sintético.

A) Curva de referencia (círculos) y pruebas de muestras clínicas proporcionadas por el INER (cuadros) con el gen N (verde) y su respectivo control positivo (POS) y negativo (NEG). **B)** Curva de referencia (círculos) y pruebas de muestras clínicas proporcionadas por el INER (cuadros) con el gen E (rojo) y su respectivo control positivo (POS) y negativo (NEG).

El comportamiento mencionado, se atribuyó a la baja concentración de muestra, por lo que se optó por agregar volúmenes mayores, con el fin de encontrar un reconocimiento igualmente mayor en caso de presentarse el RNA viral (Fig. 2).

Al aumentar el volumen de la muestra a 10 μ L (5 μ L de TRIZOL™ + 5 μ L de MTV) se esperaba observar con mayor claridad la tendencia encontrada inicialmente, es decir, observar una separación clara entre positivo y negativo, principalmente de las muestras cercanas al límite. No obstante, la tendencia se perdió al realizar dicho cambio tanto para el gen N como para el gen E (Fig. 2A, 2B).

Se observó una disminución de la fluorescencia en ambos genes al aumentar el volumen a 10 μ L. Dicha disminución de fluorescencia se observó mayoritariamente en el gen E (rojo, Fig. 2C). Además, se observó un aumento en la fluorescencia del fondo, lo que interfiere con la correcta medición de la fluorescencia de las perlas magnéticas, así como su cuantificación por segmentación semiautomática. Esto puede observarse en las imágenes de los Px_18 y 10_InDRE, donde la fluorescencia del gen E llega al

punto de ser indetectable. Por otro lado, la alta fluorescencia observada para el gen N puede deberse a la fluorescencia del fondo, más que a una alta captación del cDNA-fluorescente por parte de las perlas funcionalizadas.

Finalmente se aumentó el volumen a 30 μL (15 μL de TRIzolTM + 15 μL de MTV), que es proporcionalmente lo que equivaldría a la cantidad de muestra que se emplea en el RT-PCR. Esto resultó en la formación de cúmulos o aglomeraciones de perlas magnéticas que al parecer no reaccionaron con el cDNA-fluorescente, dado que la fluorescencia no superó al control (Fig. 2C).

Durante el procedimiento experimental en las tres condiciones presentadas, se observaron alteraciones en la agrupación y movimiento de las perlas magnéticas por efecto de los imanes de manera inversamente proporcional al volumen de muestra agregado. Es decir, al aumentar el volumen de muestra, disminuyó la eficiencia de la agrupación por efecto de los imanes. Además, se observó una adherencia anormal de las perlas magnéticas en las paredes del pozo que las contenía, imposibilitando su interacción con el cDNA-fluorescente en la detección y su correcto agrupamiento en los lavados.

Con el fin de estudiar la posibilidad de que el TRIzolTM estuviera afectando la unión estreptavidina-biotina, se realizaron ensayos de estabilidad (Anexo 4). Donde se encontró que después de cierto tiempo, se pierde la integridad de la perla magnética funcionalizada. Sin embargo, estos resultados no podrían ser concluyentes dado que puede deberse al efecto de las DNAsas presentes en el ambiente y no a una baja estabilidad de la unión estreptavidina-biotina.

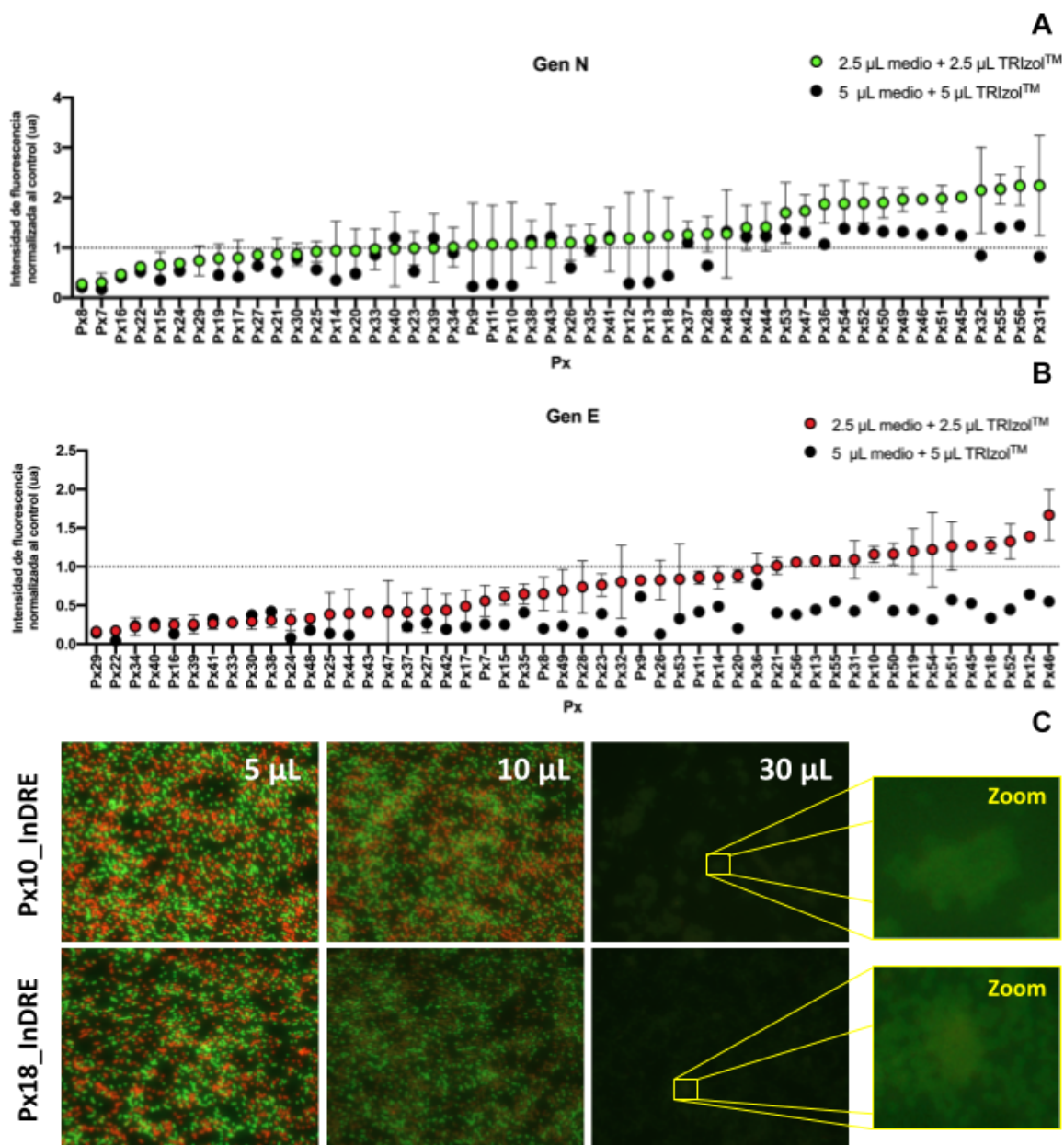


Figura 2. Efecto del volumen de muestra (TRIZOL™ + medio de transporte viral) en la detección de muestras clínicas.

A) Intensidad de fluorescencia resultante de pruebas de muestras clínicas con el gen N, utilizando 5 µL (verde) y 10 µL (negro) de muestra (±SD) **B)** Intensidad de fluorescencia resultante de las pruebas de muestras clínicas con el gen E, utilizando 5 µL (rojo) y 10 µL (negro) de muestra (±SD) **C)** Fotografías de la fluorescencia de las perlas magnéticas detectadas para ambos genes en función del volumen de muestra (proporción 1:1) para los pacientes 10 (Px10) y 18 (Px18), muestras proporcionadas por el InDRE. Se presenta un acercamiento (zoom) de los cúmulos de perlas magnéticas resultantes del uso de 30 µL de muestra. Fotografías capturadas con el Cytation5™.

Propiedades generales y efecto del TRIzol™ en la detección de RNA sintético

Con el fin de comprender a profundidad el efecto en la fluorescencia de las disoluciones utilizadas para el transporte e inactivación del virus. Se realizó un estudio espectrofotométrico empleando el equipo Cytation5™ y simulando las condiciones de las muestras clínicas. Al mezclar el TRIzol™ con el MTV se observó la formación de un sólido blanco. Dicha mezcla presentó una absorbancia exacerbada, que se atribuye a la presencia del precipitado.

Se realizó un barrido de absorbancia para identificar la longitud de onda de absorción de cada disolución y mezclas utilizando la Sol. B como blanco (BCO) debido a que es el que se usa como disolvente al diluir los cDNA-fluorescentes (Fig. 3A). Se encontró que tanto el MTV como el TRIzol™ presentan los picos de absorbancia más altos entre 450 y 600 nm. En el mismo rango se encuentra la absorción de los fluorocromos Alexa Fluor™ 488 y FAM™ 488 para la detección del gen N.

Una vez determinada la longitud de onda de absorción de las sustancias, se realizó una excitación en longitudes de onda cercanas (>450 nm) y se realizó un barrido de emisión de 500 a 700 nm (Fig. 3B).

Se encontró que el MTV presenta la curva de emisión con mayor fluorescencia en longitudes de onda cercanas a las de emisión del fluorocromo del gen N. La mezcla del MTV con TRIzol™ presenta aproximadamente una tercera parte de la fluorescencia del MTV solo. El TRIzol™ por su parte no presenta una emisión de fluorescencia significativa.

Finalmente, se corroboró la emisión de las disoluciones en los canales de excitación-emisión y configuraciones de medición de los genes N y E. Dicha configuración se realizó considerando parámetros como la ganancia, la altura a la que se realiza la medición, la longitud de onda de emisión-excitación reportadas por el fabricante de la sonda fluorescente, entre otros y en función de los resultados de

pruebas previas. En el canal del gen N (excitación: 484/20 nm, emisión: 530/25 nm) se observa una vez más que el MTV presenta la mayor fluorescencia. A partir de un análisis de t de student, se encontró un aumento significativo en la fluorescencia del TRIZOL™ + MTV en comparación con el TRIZOL™ por sí solo (Fig. 3C). En el caso del canal para el gen E (excitación: 640/20 nm, emisión: 681/20 nm), únicamente se encontró un aumento significativo en la variación de los resultados para el TRIZOL™ + MTV comparando contra el TRIZOL™ (Fig. 3D).

Al observar que el TRIZOL™ produjo interferencias en el resultado de las pruebas, se realizaron controles para identificar el punto de la metodología en el que ocurren y con ello, modificar el procedimiento experimental para obtener un resultado confiable. De acuerdo a la reactividad de las sustancias que contiene el TRIZOL™ hay una mayor probabilidad de que alguna de estas tenga un efecto en la prueba de hibridación, de manera independiente de la presencia de MTV, por lo que la prueba se realizó únicamente con TRIZOL™. Para ello, se realizaron curvas control de RNA sintético con y sin TRIZOL™, variando la marca comercial de origen (IDT™, T4Oligo™) de los cDNA-fluorescentes. En este caso, el fluorocromo acoplado al cDNA cambia en función de su marca de origen, por lo que es posible realizar una comparación analítica entre ellos (Fig. 4). Los cDNA-fluorescentes de la marca IDT™ están acoplados a los fluorocromos Alexa Fluor™ con longitudes de onda de emisión de 488 nm y 647 nm para los genes N y E respectivamente. Los cDNA-fluorescentes de la marca T4Oligo™ están acoplados a los fluorocromos FAM™ con longitud de onda de emisión de 488 nm y Quasar™ con longitud de onda de emisión de 670 nm para los genes N y E respectivamente.

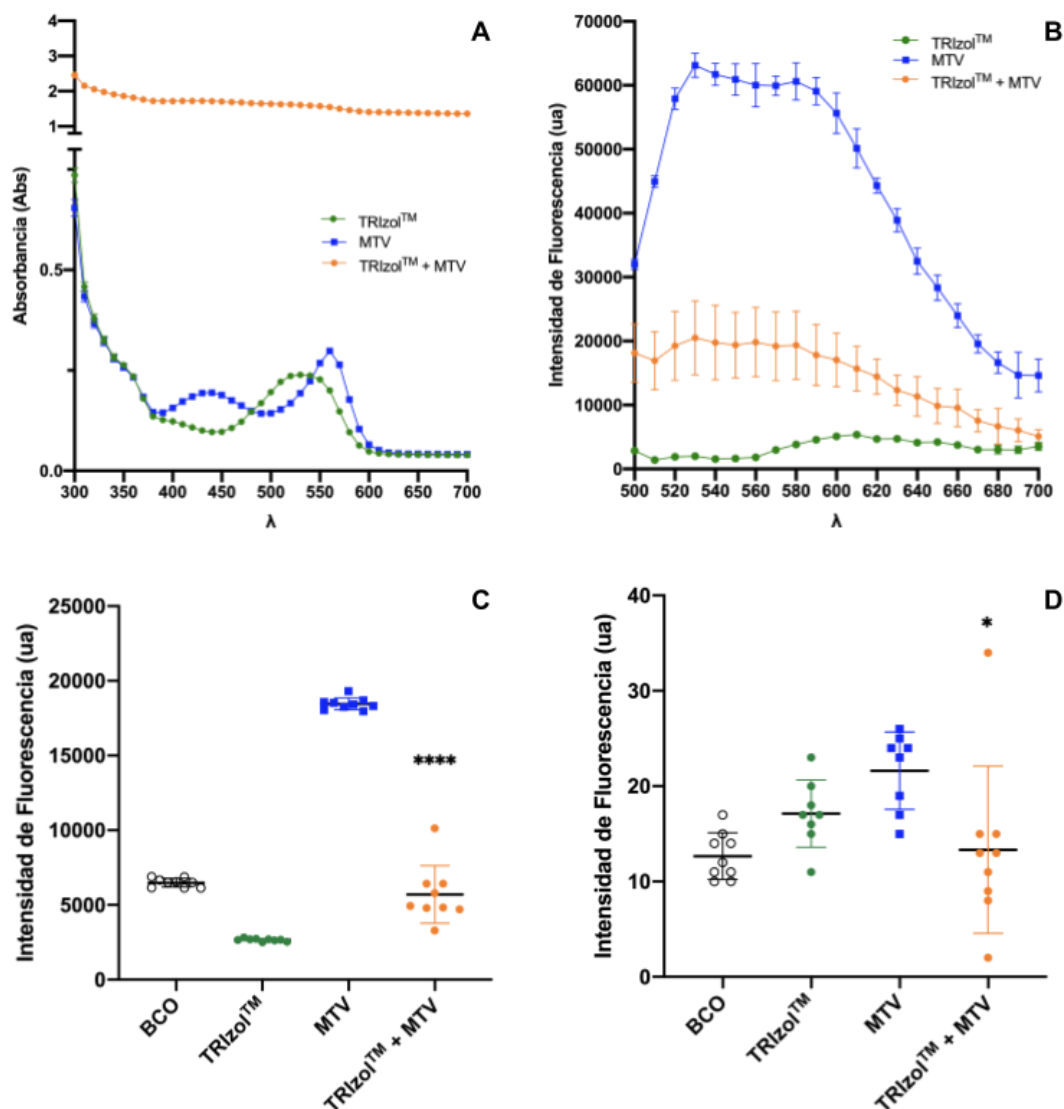


Figura 3. Estudio espectrofotométrico de la interacción entre el MTV y el TRizol™ con base en las longitudes de onda de los genes N y E.

A) Barrido de absorbancia (Abs) con longitudes de onda (λ) crecientes para 100 μ L de cada sustancia; TRizol™ (círculos, verde), medio de transporte viral (MTV, cuadros, azul) y la mezcla en proporción 1:1 de TRizol™ con MTV (círculos, naranja). **B)** Barrido de emisión de fluorescencia (unidades arbitrarias, ua) con longitudes de onda (λ) crecientes y excitación en 450 nm para 50 μ L de cada sustancia. **C)** Medición de la fluorescencia en el canal de medición del gen N (488 nm) con 100 μ L de cada sustancia. El análisis estadístico t de student (IC=95%; n=9, \pm SD) muestra diferencias significativas entre las medias de los puntos de TRizol™+MTV respecto a los puntos de TRizol™ (**** P <0.001). **D)** Medición de la fluorescencia en el canal de medición del gen E (670 nm) con 100 μ L de cada sustancia. El análisis estadístico F de Fisher (IC=95%; n=9, \pm SD) muestra diferencias significativas entre las varianzas de los puntos de TRizol™ respecto a los puntos de TRizol™+MTV (* P <0.01).

En las curvas control con RNA sintético (Fig. 4A y 4B), se encontró que los cDNA-fluorescentes del gen N acoplados al Alexa Fluor™ 488, son más susceptibles a cambios en función de la presencia de TRIZOL™ en la muestra, aumentando significativamente la fluorescencia detectada al finalizar la prueba. El análisis estadístico t de student (IC=95%; n=3, ± SD) muestra diferencias significativas entre los puntos del fluorocromo de IDT™ en presencia de TRIZOL™ respecto a los puntos en ausencia de este (*P<0.01), incluyendo al control negativo.

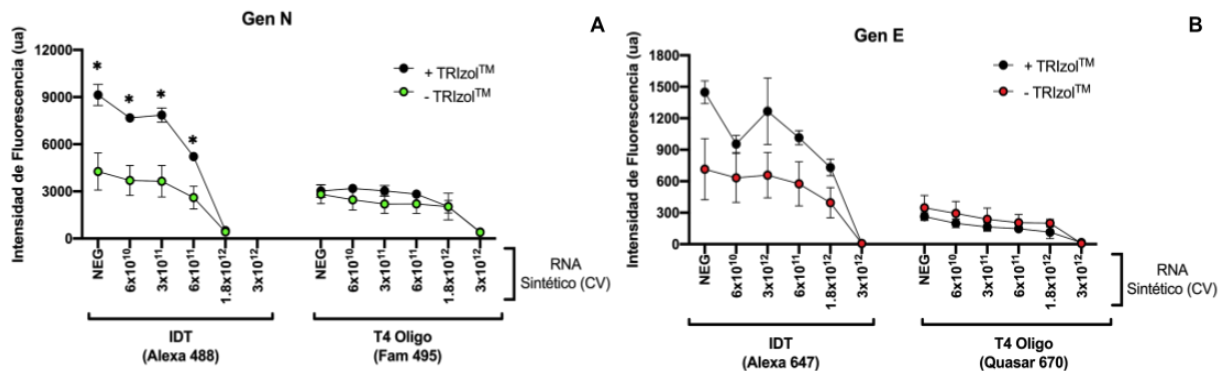


Figura 4. Efecto de la presencia de TRIZOL™ en la detección de curvas de RNA sintético.

A) Curvas control del gen N en ausencia (verde) y presencia (negro) de TRIZOL™, probando los cDNA de IDT™ acoplados al fluorocromo Alexa 488 (izquierda) y los cDNA de T4Oligo™ acoplados al fluorocromo FAM 495 (derecha). **B)** Curvas control del gen E (±SD) en ausencia (rojo) y presencia (negro) de TRIZOL™, probando los cDNA de IDT™ acoplados al fluorocromo Alexa 647 (izquierda) y los cDNA de T4Oligo™ acoplados al fluorocromo Quasar 670 (derecha).

Por el contrario, el TRIZOL™ no afecta significativamente la fluorescencia de los cDNA fluorescentes acoplados al Alexa Fluor™ 647 para el gen E. De la misma forma, dicha disolución de inactivación no afecta significativamente a los fluorocromos de la marca T4Oligo™ tanto para el gen N como para el gen E.

Los fluorocromos de IDT™ presentan de forma general una fluorescencia y estabilidad mayor al realizar la medición en el espectrofotómetro, es decir, la intensidad de fluorescencia persiste por un mayor tiempo bajo la excitación constante de la luz. Los resultados del análisis con y sin TRIZOL™ sugieren que, se puede estar modificando la

estructura química de los fluorocromos en los grupos funcionales responsables de la fluorescencia de las moléculas.

Efecto del calentamiento previo a la competencia en la detección de pruebas clínicas en presencia y ausencia de MTV+TRIZOL™

Con la finalidad de linealizar las secuencias nucleicas y que la hibridación se realizará con mayor eficiencia, las muestras fueron calentadas a 90 °C. Dados los resultados obtenidos utilizando el TRIZOL™, se consideró que dichas modificaciones químicas pueden atribuirse parcialmente a este calentamiento en el paso 2.1 del procedimiento experimental. Por ello, se realizaron pruebas omitiendo dicho paso y realizando únicamente el calentamiento a 50 °C que es la temperatura óptima para hibridar ambas secuencias génicas.

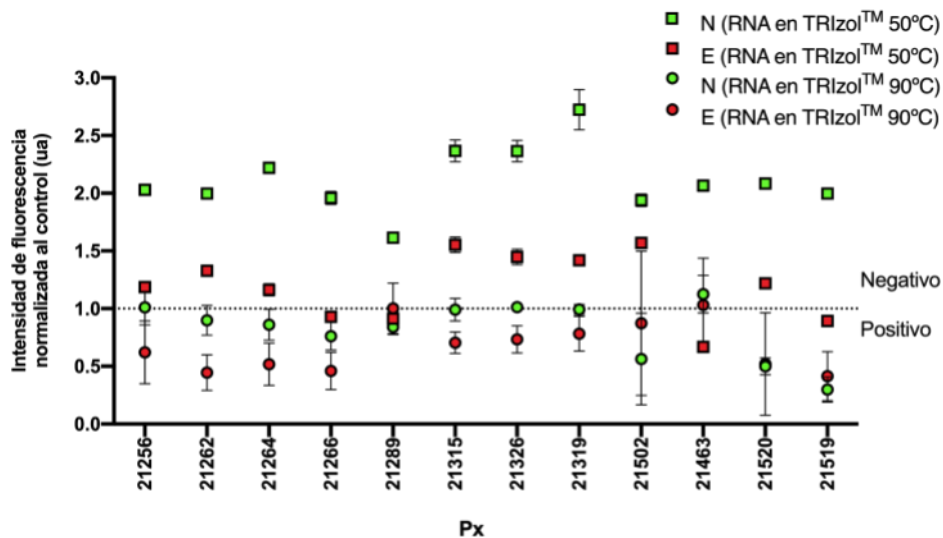


Figura 5. Efecto del calentamiento del TRIZOL™ en la detección del genoma del SARS-CoV-2 en muestras clínicas.

Comparación cuantitativa de pruebas clínicas siguiendo el método experimental establecido (90°C, círculos), contra la omisión del calentamiento a 90°C del paso 2.1 (50°C, cuadros) tanto para el gen N (verde) como el gen E (rojo).

Se encontró de manera general, que las pruebas realizadas únicamente con el calentamiento a 50 °C presentan una mayor fluorescencia que a 90 °C (calentado) en

muestras con MTV+TRIzol™. Sin embargo, en algunos casos el resultado de uno de los genes es equivalente a una interpretación positiva de la prueba (baja o nula fluorescencia). Mientras que para el otro gen, el resultado es equivalente a una interpretación negativa (alta fluorescencia), principalmente a 50 °C. Además, la mayoría de las muestras tratadas a 90 °C resultaron positivas y las tratadas a 50 °C negativas, lo que sugiere un resultado incongruente (Fig. 5).

Considerando que en presencia de MTV+TRIzol™ y de forma independiente de la temperatura se encuentran resultados incongruentes, se realizaron pruebas de comparación entre el MTV+TRIzol™ calentado a 90 °C y sin calentar comparando contra el RNA purificado. Para este ensayo se dividió el volumen de muestra en dos partes: una de ellas pasó por el proceso de extracción y purificación de RNA, mientras que la otra se conservó en MTV+TRIzol™.

Se encontró que en presencia de MTV+TRIzol™ calentado, hay un aumento en la fluorescencia principalmente de N respecto a la prueba con únicamente RNA purificado (Fig. 6A). Además, durante el desarrollo de la metodología se observaron una vez más dificultades en la agrupación de las perlas magnéticas por efecto de los imanes y la formación de cúmulos (Fig. 6A, 21520). De forma contraria, las perlas magnéticas con RNA purificado presentaron mayor sensibilidad al campo magnético del imán. Asimismo, se encontró una distribución de perlas más uniforme en las imágenes del lector de placas.

De manera cuantitativa, se observa que con el RNA purificado las inconsistencias mencionadas entre los genes desaparecen y de manera contraria, persisten en la condición con MTV+TRIzol™ a 90 °C (Fig. 6C). En otras palabras, los genes N y E coinciden en el resultado positivo o negativo en las pruebas con RNA purificado.

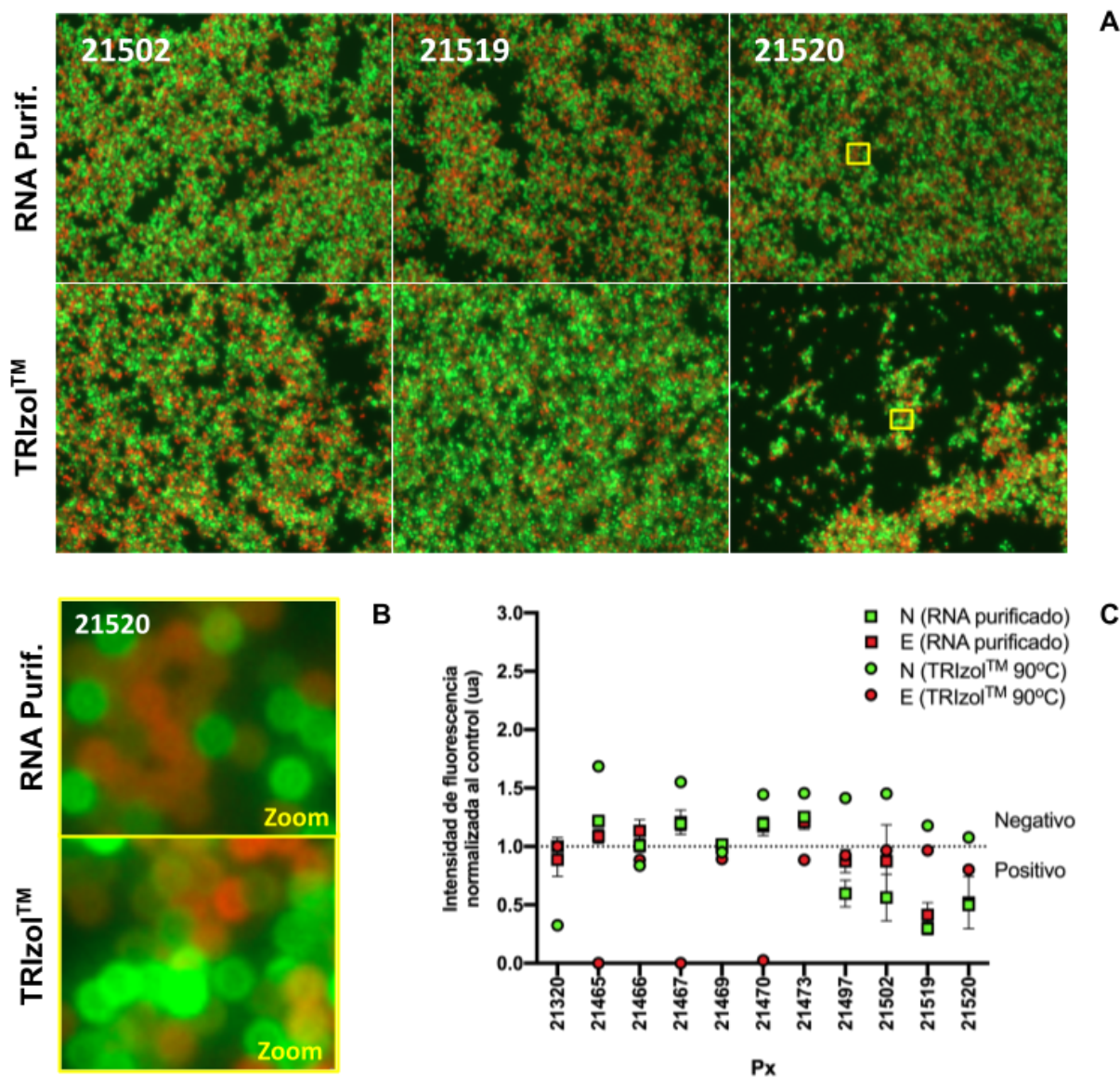


Figura 6. Efecto de la presencia de TRIZOL™ en la detección del genoma del SARS-CoV-2 en muestras clínicas.

A) Comparación cualitativa de pruebas clínicas siguiendo el método experimental establecido con las muestras tratadas con MTV+TRIZOL™ (abajo), contra la omisión del calentamiento a 90°C del paso 2.1 sumada a la extracción y purificación del RNA (RNA purif., arriba) para el gen N (verde) y el gen E (rojo). Fotografías capturadas en el Cytation5™. **B)** Acercamiento de las perlas magnéticas para mayor apreciación del aumento en la fluorescencia por efecto del TRIZOL™. **C)** Comparación cuantitativa de pruebas clínicas siguiendo el método experimental establecido con las muestras tratadas con MTV+TRIZOL™ (círculos), contra la omisión del calentamiento a 90°C del paso 2.1 sumada a la extracción y purificación del RNA (RNA purificado, cuadros) para el gen N (verde) y el gen E (rojo). Los datos en el eje Y se normalizaron respecto al control negativo de manera que el NEG = 1.

Aún con los resultados obtenidos, el proceso de purificación del RNA implica un aumento importante en el costo y tiempo de la prueba, además de un problema para su implementación a nivel masivo. Por ello, se optó por cambiar la disolución de inactivación.

Efectos del RNA Shield™ en la detección de RNA sintético y viral

Al observar las dificultades que se presentan en la reacción de detección como consecuencia del uso de TRIzol™ y con el fin de mantener el costo inicial de la prueba, se consideró utilizar otra opción comercial, el DNA/RNA Shield™ (RNA Shield™). Para fines de este proyecto, el RNA Shield™ tiene una función similar a la del TRIzol™, la inactivación del virus y la conservación del material genético presente en las muestras, para su posterior extracción y purificación.

Con el fin de determinar si se presenta un efecto similar al del TRIzol™ en la reacción de detección. De forma similar a las pruebas con TRIzol™ se realizaron pruebas con curvas de RNA sintético, con muestras clínicas y condiciones variables en el manejo del RNA Shield™ (Fig. 7).

Se realizó una comparación de las pendientes (m) y los coeficientes de correlación (R^2) de las curvas a partir de un análisis de regresión lineal simple, así como de su intervalo de intensidad de fluorescencia. Al comparar la curva de 2 pmol de cDNA-fluorescente + 2.5 μ L de RNA Shield™ contra las tres primeras curvas de la Fig. 7A, se encontraron similitudes en m , R^2 e intensidad de fluorescencia con la curva de 2.6 pmol de cDNA-fluorescente sin RNA Shield™, principalmente en el gen N (Anexo 5). Este resultado sugiere que el RNA Shield™ produce un efecto similar al de aumentar la concentración de cDNA-fluorescente en la curva. Además, al combinarse con el MTV, el RNA Shield™ disminuye el pH del mismo, lo que se observa como un cambio en la coloración del indicador de pH a amarillo.

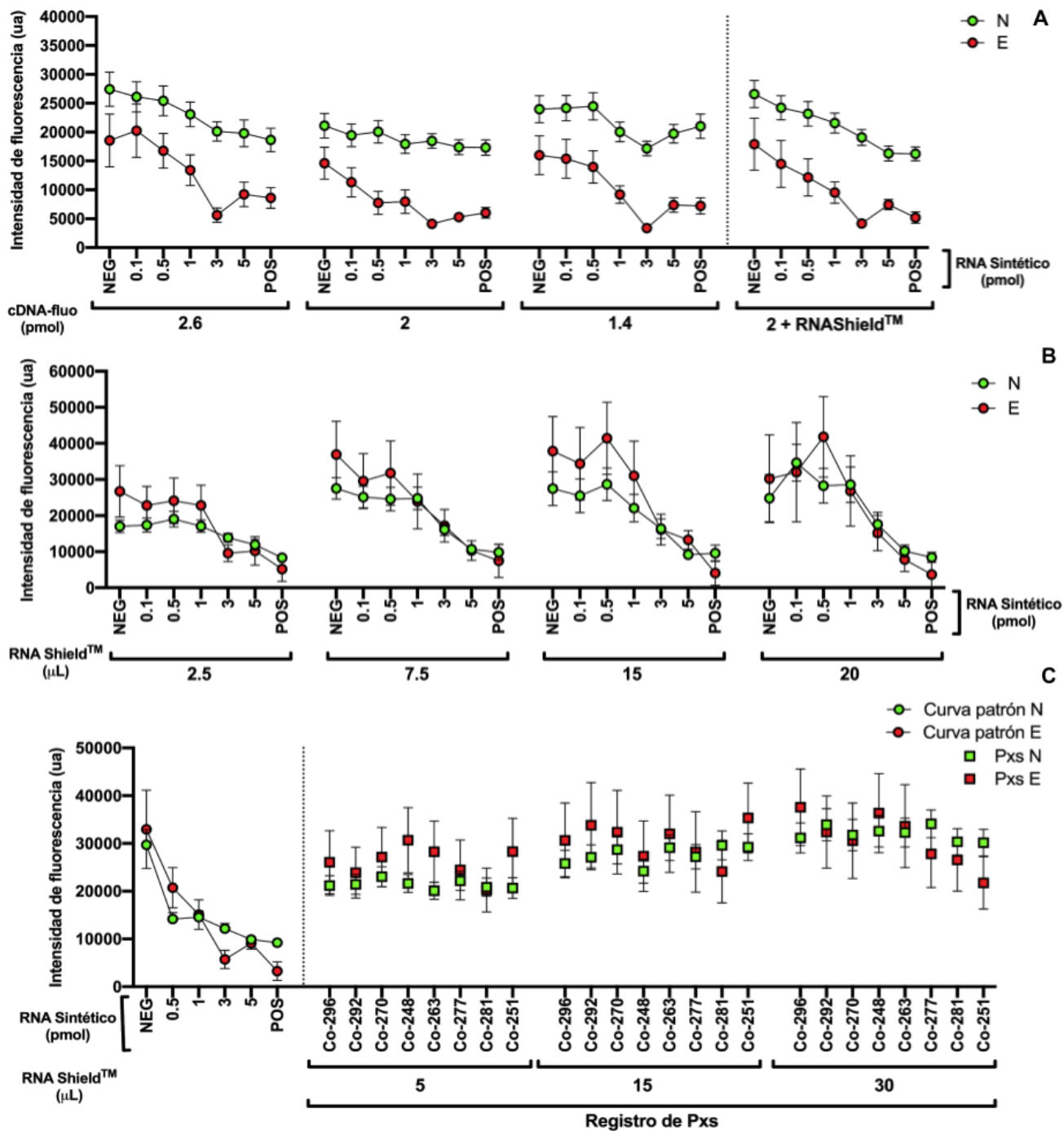


Figura 7. Efecto del volumen DNA/RNA Shield™ en la detección del genoma del SARS-CoV-2 en muestras clínicas.

A) Curvas en ausencia de DNA/RNA Shield™ con 2.6, 2 y 1.4 pmol de cDNA-fluorescente respectivamente, como curvas de referencia. Curva con 2 pmol de cDNA-fluorescente + 2.5 µL de DNA/RNA Shield™ (±SD) del gen N (verde) y el E (rojo). Las constantes son la concentración de ssDNA-biotinilado y el número de perlas magnéticas. **B)** Curvas con 2.5, 7.5, 15 y 20 µL de DNA/RNA Shield™ respectivamente (±SD) para el gen N (verde) y el E (rojo). Las constantes son la concentración de cDNA-fluorescente, ssDNA-biotinilado y el número de perlas magnéticas. **C)** Curva control con RNA sintético para el gen N (círculos, verde) y el E

(círculos, rojo). Pruebas con muestras clínicas proporcionadas por el IMSS Coacalco con 5, 15 y 30 μL de muestra (MTV 1:1 DNA/RNA Shield™) respectivamente ($\pm\text{SD}$) para el gen N (verde) y el E (rojo).

Si bien el RNA Shield™ también produce un aumento en la fluorescencia y cambios en el pH, se evitan otros efectos que presentó el TRIZOL™. Con el RNA Shield™ no ocurre la aglomeración de perlas, la disminución de su respuesta móvil hacia los imanes ni la formación del precipitado blanco. Otra ventaja que se observa es que de forma general no se produce un aumento significativo en la dispersión de los datos.

Posteriormente, se determinó el efecto del volumen de RNA Shield™ utilizado, con una concentración constante de cDNA-fluorescente, ssDNA-biotinilado y número de perlas magnéticas.

Para ello, se utilizaron volúmenes de 2.5-20 μL , un intervalo ligeramente mayor al del TRIZOL™ (2.5-15 μL). De manera similar al ensayo anterior, se compararon los valores obtenidos de una regresión lineal simple (Anexo 6). Donde se observó que el uso de 2.5 μL y 20 μL presentan una m y una R^2 bajas. Una m baja representa una tendencia plana en las curvas, es decir, una baja resolución entre los puntos. Una R^2 baja representa una falta de linealidad en la curva, contrario a lo que se espera para la detección del RNA sintético. Por lo tanto, es posible que a un volumen relativamente bajo y alto de RNA Shield™ se pierda la tendencia esperada. Se observó además, que la desviación estándar entre los datos aumenta de forma directamente proporcional al volumen utilizado de RNA Shield™, principalmente a partir de 15 μL .

Más adelante, se probaron muestras ciegas de pacientes con el fin de determinar el efecto del volumen de RNA Shield™+MTV en pruebas clínicas (Fig. 7C). Se encontró que de la misma forma que en las curvas mencionadas, a un volumen alto (30 μL ; 15 μL RNA Shield™ + 15 μL MTV) de muestra se produce un aumento en la variabilidad de los resultados y un ligero aumento en la fluorescencia de la detección. Además, se observa que el RNA Shield™ puede producir cambios significativos en la detección genómica, como es el caso del paciente Co-251 principalmente para el gen E.

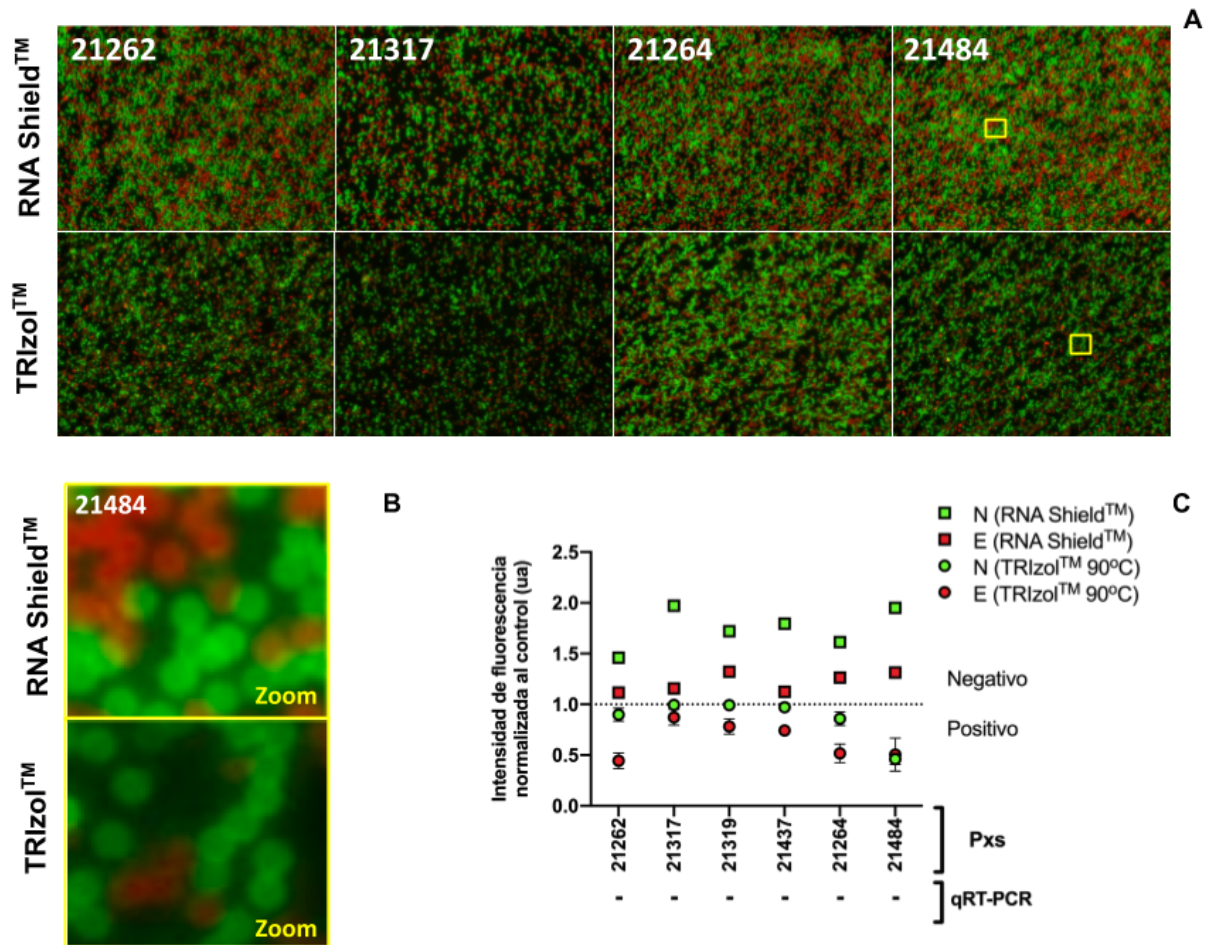


Figura 8. Efecto de la presencia de RNA Shield™ contra la de TRIZOL™ en la detección de muestras clínicas.

A) Comparación cualitativa de pruebas clínicas siguiendo el método experimental establecido con las muestras tratadas con TRIZOL™ (abajo), contra muestras tratadas con RNA Shield™ (arriba) para el gen N (verde) y el gen E (rojo). Fotografías capturadas en el Cytation5™. **B)** Acercamiento de las perlas magnéticas para mayor apreciación del aumento en la fluorescencia por efecto del RNA Shield™. **C)** Comparación cuantitativa de pruebas clínicas siguiendo el método experimental establecido con las muestras tratadas con TRIZOL™ (círculos), contra muestras tratadas con RNA Shield™ (cuadros) para el gen N (verde) y el gen E (rojo), con su respectivo registro y resultado de RT-qPCR. Los datos en el eje Y se normalizaron respecto al control negativo de manera que el NEG = 1.

Finalmente, se realizó un ensayo de comparación directa entre pruebas clínicas tratadas con TRIZOL™ contra las tratadas con RNA Shield™. Para esta se utilizaron pacientes que por RT-PCR resultaron negativos. Se encontró que los resultados de las

muestras tratadas con RNA Shield™ como sustituto, son más específicos que cuando se utiliza el TRIzol™ a 90 °C (Fig. 8).

En ninguna de las condiciones se presentó la dificultad en el manejo de las perlas magnéticas con los imanes, ni se observó el aglomeramiento de las mismas observado con el TRIzol™. Asimismo, no se observa la fluorescencia de fondo en las mediciones y hay una mayor coincidencia entre la fluorescencia de los genes, los cuales aumentan su fluorescencia de forma consistente en presencia de RNA Shield™ (Fig. 8B, 8C).

Propiedades generales del RNA Shield™ y su efecto en la detección

Una vez más se realizó un estudio espectrofotométrico empleando Cytation5™ simulando las condiciones de las pruebas clínicas, sustituyendo el TRIzol™ con el RNA Shield™ (Fig. 9). Al realizar el barrido de absorbancia, se observó que tanto el MTV, como la mezcla de RNA Shield™+MTV presentan los picos más altos de excitación entre 400 y 600 nm, donde se encuentra también la absorción del gen N. El RNA Shield™ por sí solo no absorbe en ese rango de longitud de onda (Fig. 9A)

Una vez determinada la longitud de onda de absorción de las sustancias, se realizó una excitación en longitudes de onda cercanas (>450 nm) y se realizó un barrido de emisión de 500 a 700 nm. (Fig. 9B).

Se encontró de nuevo que el MTV presenta la curva de emisión con mayor fluorescencia en longitudes de onda cercanas a las de emisión de los fluorocromos Alexa Fluor™ 488 y FAM™ 488 utilizados para el gen N. La mezcla del MTV con RNA Shield™ presenta aproximadamente una tercera parte de la fluorescencia del MTV solo. El RNA Shield™ por su parte no presenta una emisión de fluorescencia significativa en ese intervalo.

Finalmente, en el canal de excitación-emisión del gen N se observa una vez más que el MTV presenta la mayor fluorescencia. Además, se encontró un aumento significativo en la fluorescencia del RNA Shield™+MTV en comparación con el RNA Shield™ por sí solo (Fig. 9C). En el caso del canal de excitación-emisión para los fluorocromos Alexa

Fluor™ 647 y Quasar™ 670 utilizados para el gen E, únicamente se encontró un aumento significativo en la variación de los resultados para el RNA Shield™+MTV comparando contra el RNA Shield™ solo (Fig. 9D).

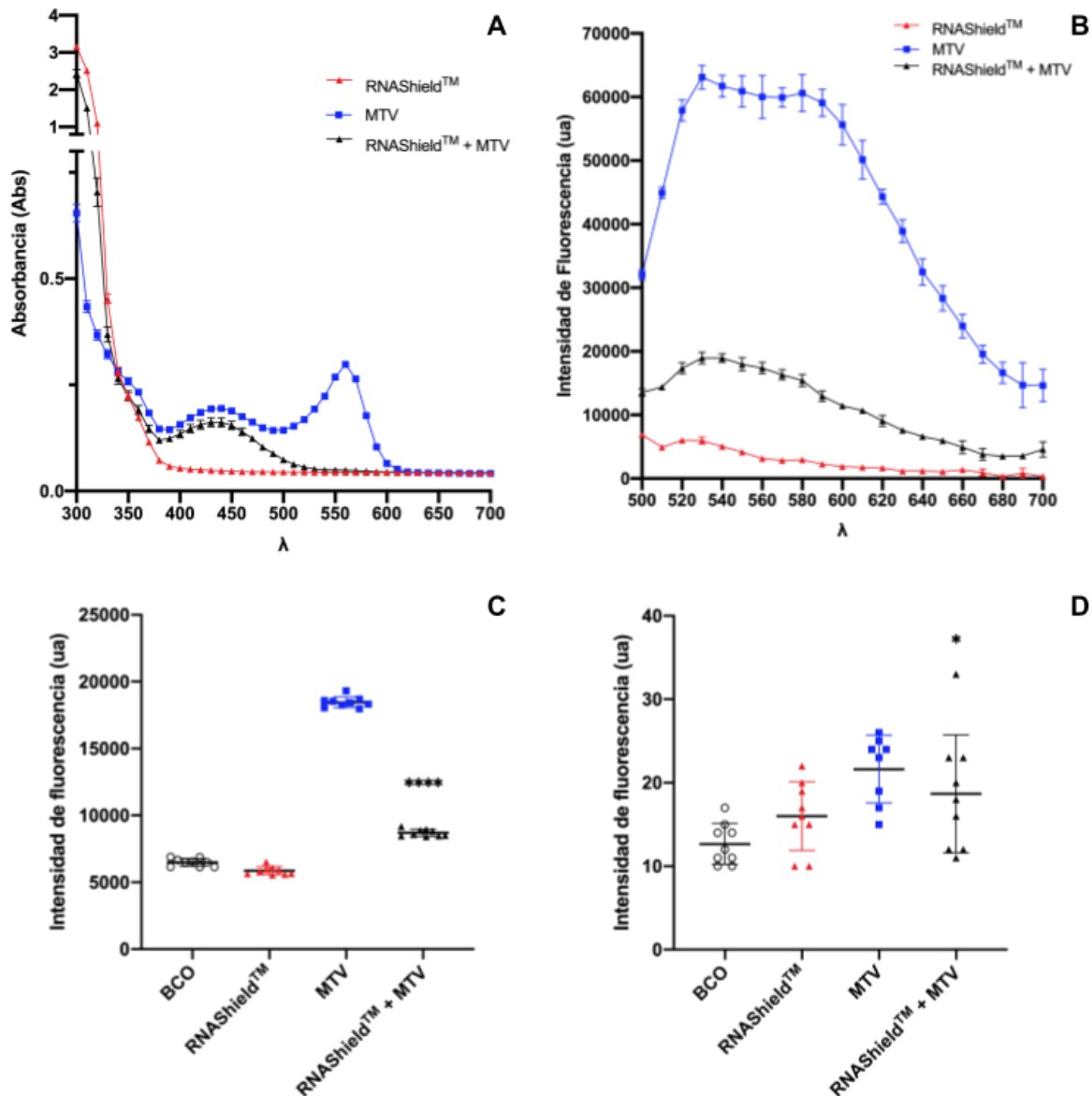


Figura 9. Estudio espectrofotométrico de la interacción entre el medio de transporte viral y el RNA Shield™ con base en las longitudes de onda de los genes N y E.

A) Barrido de absorbancia (Abs) con longitudes de onda (λ) crecientes para 100 μ L de cada sustancia; RNA Shield™ (triángulos, rojo), medio de transporte viral (MTV, cuadros, azul) y la mezcla en proporción 1:1 de RNA Shield™ con MTV (triángulos, negro). **B)** Barrido de emisión de fluorescencia (unidades arbitrarias, ua) con longitudes de onda (λ) crecientes y excitación en 450 nm para 50 μ L de cada sustancia. **C)** Medición de la fluorescencia en el canal de medición del gen N (488 nm) con 100 μ L de cada sustancia. El análisis estadístico t de student (IC=95%; n=9, \pm SD) muestra

diferencias significativas entre las medias de los puntos de RNA Shield™+MTV respecto a los puntos de RNA Shield™ (**** $P<0.0001$). **D)** Medición de la fluorescencia en el canal de medición del gen E (670 nm) con 100 μ L de cada sustancia. El análisis estadístico F de Fisher (IC=95%; n=9, \pm SD) muestra diferencias significativas entre las varianzas de los puntos de RNA Shield™ respecto a los puntos de RNA Shield™+MTV (* $P<0.01$).

Al encontrar que la mayor absorción y emisión de luz es producida por el MTV, se realizó otro estudio espectrofotométrico únicamente con RNA Shield™ (Anexo 7). Esto con el fin de considerar la posibilidad de su uso directo en la toma de muestras, sin el paso intermediario con MTV.

El RNA Shield™ y la Sol. B de forma independiente presentaron una intensidad de fluorescencia nula. Después, se disolvió el equivalente a 2 pmol de cDNA-fluorescente del gen N (N-Fluo) en Sol. B. Esta disolución presentó una intensidad de fluorescencia significativamente mayor a la Sol. B y es considerada la basal. Posteriormente, al RNA Shield™ se le agregó el volumen del stock de N-Fluo equivalente a 2 pmol. La intensidad de fluorescencia en esta condición se duplicó respecto a la disolución de N-Fluo+Sol.B. Finalmente se agregó RNA Shield™ a la disolución de N-Fluo+Sol.B, donde la intensidad de fluorescencia resultó cerca del triple de la basal.

Los resultados anteriores sugieren que, ocurre una reacción entre el RNA Shield™ y el N-Fluo que produce un aumento en la fluorescencia. Por lo que, es posible que la presencia de la Sol. B esté fomentando dicha reacción debido al aumento exacerbado de la fluorescencia.

Efecto del RNA Shield™ en el procesamiento de muestras clínicas

El RNA Shield™ resulta ser una opción viable para reemplazar al TRIzol™, no obstante, aún presenta dificultades en la interpretación del resultado debido a los cambios que produce en la fluorescencia del cDNA-fluorescente. Por esto, una vez más se consideró el uso del RNA purificado, comparando los resultados contra los de RNA Shield™ en muestras clínicas (Fig. 10).

Se encontró que a diferencia del TRIzol™, el RNA Shield™ aumenta la fluorescencia tanto del fluorocromo N como el del E (Fig. 10A, 10B). Por el contrario, con el RNA

purificado hay una mayor consistencia en los resultados, es decir, la variabilidad es menor y el método es más repetible y reproducible. Sin embargo, al comparar con el RNA purificado, se encontró una baja coincidencia entre ambos genes. Una vez más, con el RNA purificado se observó lo contrario, lo que facilita el establecimiento de un diagnóstico a partir de la prueba (Fig. 10C).

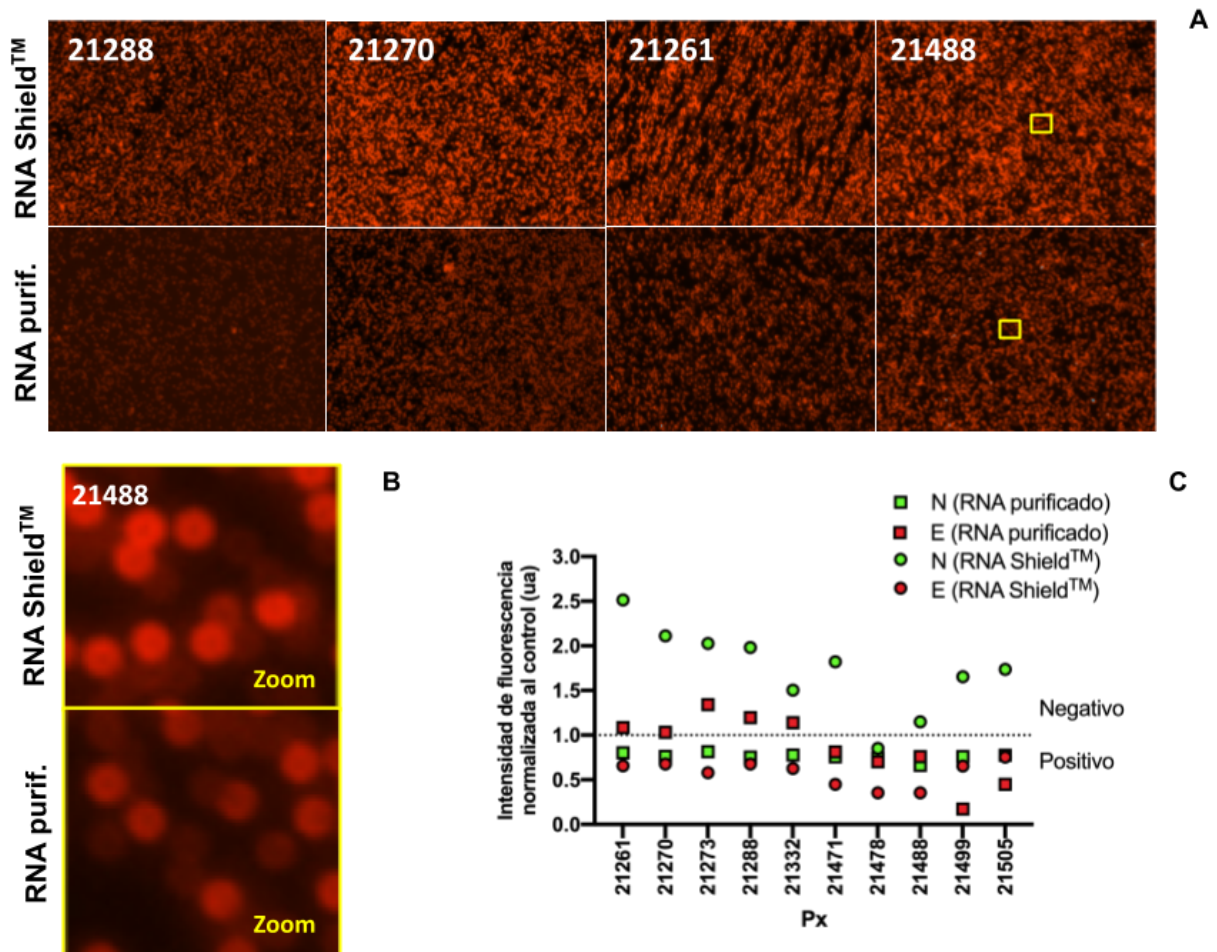


Figura 10. Efecto de la presencia de DNA/RNA Shield™ contra el RNA purificado en la detección de muestras clínicas.

A) Comparación cualitativa de pruebas clínicas siguiendo el método experimental establecido con las muestras tratadas con RNA Shield™ (arriba), contra la extracción y purificación del RNA (RNA purif., abajo) para el gen E (rojo). Fotografías capturadas en el Cytation5™. **B)** Acercamiento de las perlas magnéticas para mayor apreciación del aumento en la fluorescencia por efecto del RNA Shield™. **C)** Comparación cuantitativa de pruebas clínicas siguiendo el método experimental establecido con las muestras tratadas con RNA Shield™ (círculos), contra la extracción y purificación del RNA (RNA purificado, cuadros) para el gen N (verde) y el gen E (rojo). Los datos en el eje Y se normalizaron respecto al control negativo de manera que el NEG = 1.

Aún así, al comparar numerosos resultados de la prueba con RNA purificado contra la RT-qPCR se encuentran algunas discrepancias. Principalmente al revisar la sensibilidad con el estándar de oro como referencia.

Interferencias en las pruebas clínicas utilizando RNA purificado

Debido a las variaciones encontradas en los resultados para las muestras con RNA purificado, se consideró la presencia de RNA humano negativo a SARS-CoV-2 (hRNA; Anexo 3) como interferencia en la prueba. Por ello, inicialmente se determinó la sensibilidad de la prueba únicamente con RNA purificado de muestras positivas a SARS-CoV-2 (vRNA) detectado por RT-qPCR (Fig. 11A). Así, con el fin de determinar el factor tRNA/hRNA en el que existiera un cambio significativo en el resultado de la prueba, se probaron concentraciones crecientes de hRNA con concentraciones fijas de vRNA (Fig. 11B) y concentraciones decrecientes de vRNA con concentraciones crecientes de hRNA (Fig. 11C).

Para la primera condición, se realizó un análisis estadístico ANOVA (IC=95%; $n = 3, \pm$ SD), donde se encontraron diferencias significativas en los puntos de 120 ng y 145 ng de hRNA con respecto al punto de 0 ng, para el gen N ($^aP < 0.05$). Posteriormente, se realizó un análisis de t de student (IC=95%; $n = 3, \pm$ SD) en el cual se compararon los resultados de las concentraciones del hRNA (0, 5, 20, 45, 70, 95, 120, 145 ng totales) con el control negativo (NEG). Se obtuvieron diferencias significativas en los puntos 0 ng y 5 ng para el gen N ($*P < 0.05$) (Fig. 11B). En otras palabras, se encontró que la proporción de hRNA y vRNA pueden afectar significativamente la sensibilidad de la prueba. A partir de 70 ng de hRNA en la muestra, la prueba puede resultar en un falso positivo. A su vez, el resultado de la prueba puede presentarse como un falso negativo, en particular si la concentración viral es baja (7.4 kCV para el gen N y 14.8 kCV para el gen E). Dado que las muestras clínicas no son únicamente RNA viral, se observa que el método de detección pierde sensibilidad por debajo de los 0.8 ng totales de vRNA, lo que se traduce en un estimado de 3.9 kCV para el gen N y 7.7 kCV para el gen E (Fig. 11C).

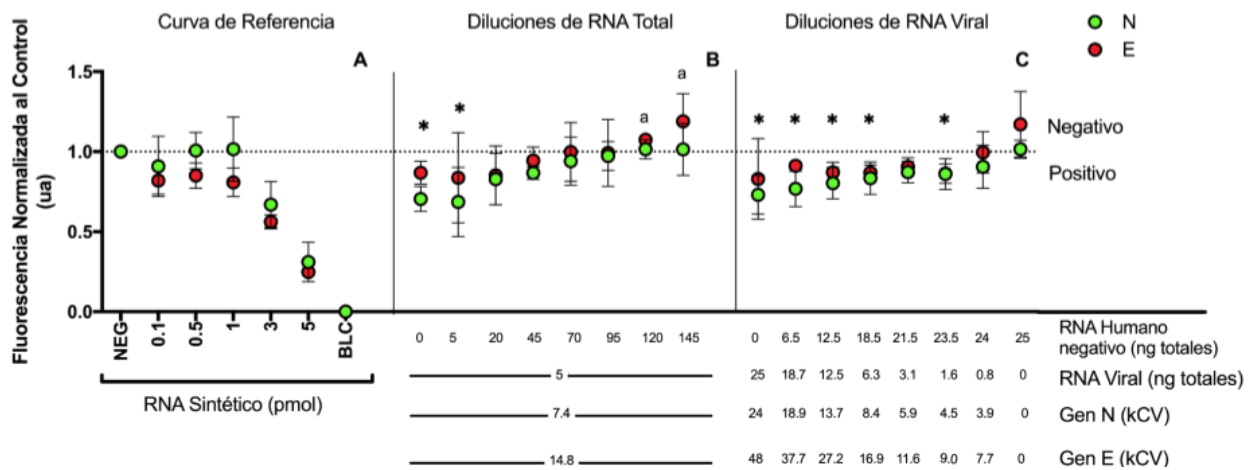


Figura 11. Interferencia de RNA humano y determinación de la carga viral detectable.

A) Curva control o de referencia de la reacción de las perlas magnéticas funcionalizadas (\pm SD) con los genes N (verde) y E (rojo) unidas a las sondas fluorescentes (N y E) que no reconocieron a los RNA sintéticos de los genes N y E a concentraciones crecientes (0, 0.1, 1, 3 y 5 pmol). **B)** Fluorescencia normalizada al control, resultado del análisis del efecto del RNA humano (negativo a SARS-CoV-2) con concentraciones crecientes de este (0, 5, 20, 45, 70, 95, 120, 145 ng totales). **C)** Fluorescencia normalizada al control, resultado del análisis del efecto de concentraciones decrecientes de RNA viral (25, 18.7, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0.8, 0 ng totales), con concentraciones crecientes de RNA humano negativo a SARS-CoV-2 (0, 6.5, 12.5, 18.5, 21.5, 23.5, 24, 25 ng totales).

Resumen de interferencias en la prueba

Etapa	Variable	Interferencia	Diagnóstico
Tratamiento de la muestra	Medio de transporte viral	Remanentes producen un incremento en la fluorescencia en 400-600 nm	Falso negativo
		Interferencia con el reconocimiento del cDNA-fluorescente con el RNA viral/ssDNA-biotinilado en pruebas clínicas por el sólido blanco	Falso negativo/positivo
		Disminución de la propiedad superparamagnética de las perlas	Falso negativo/positivo
	TRIzol™	Con concentraciones bajas, incremento en la fluorescencia del fluorocromo Alexa Fluor™ 488	Falso negativo
		Con concentraciones altas, aglomeración de las perlas magnéticas	Falso positivo
		El calentamiento a 50°C/90°C fomenta reacciones secundarias en la competencia	Falso negativo/positivo
DNA/RNA Shield™	Reacción desconocida con fluorocromos de N y E	Falso negativo	
RNA purificado	Interferencia en el reconocimiento del cDNA-fluorescente con el RNA viral en la muestra clínica por una relación hRNA/vRNA alta	Falso negativo	

Sensibilidad del biosensor

Dados los resultados anteriores, se decidió aumentar el número de pruebas, con el fin de describir la sensibilidad obtenida en función de la disolución de inactivación utilizada o la ausencia de esta. Se construyeron matrices de cálculo de dichos parámetros, con base en los resultados de las realizadas con el biosensor y comparándolos con los obtenidos por RT-qPCR (Vizcaíno-Salazar, 2017).

Se encontró que las muestras tratadas con TRIzol™, presentan menor sensibilidad que las tratadas con RNA Shield™, comparando con los resultados de la RT-qPCR proporcionados por el IMSS (Cuadro 6). Finalmente se descartó el TRIzol™ y se compararon los resultados de las pruebas tratadas con RNA Shield™ y con el RNA purificado, resultando el segundo con una mayor sensibilidad.

Cuadro 6. Matriz de cálculo de sensibilidad del biosensor con base en la RT-qPCR realizada en el IMSS.

	Gen E					
	RNAShield			TRIzol		
	Virus Presente	Virus Ausente	Total	Virus Presente	Virus Ausente	Total
Prueba Positiva	21	4	25	36	23	59
Prueba Negativa	12	14	26	22	27	49
Concordancia	Positivos	Negativos		Positivos	Negativos	
%	63.64	77.78		62.07	54.00	

Cuadro 7. Matriz de cálculo de sensibilidad del biosensor con base en la RT-qPCR realizada en el InDRE.

	Gen E					
	RNA Purificado			RNAShield		
	Virus Presente	Virus Ausente	Total	Virus Presente	Virus Ausente	Total
Prueba Positiva	42	2	44	32	2	34
Prueba Negativa	5	26	31	15	26	41
Concordancia	Positivos	Negativos		Positivos	Negativos	
%	89.36	92.86		68.09	92.86	

	Gen N		
	RNA Purificado		
	Virus Presente	Virus Ausente	Total
Prueba Positiva	45	0	45
Prueba Negativa	2	28	30
Concordancia	Positivos	Negativos	
%	95.74	100.00	

Análisis de resultados y discusión

Efecto del MTV + TRIzol™ en la detección de pruebas clínicas

Las instituciones colaboradoras del proyecto proporcionaron muestras de distintos pacientes, con diferentes cuadros clínicos y resultados de RT-qPCR. Tanto la forma en que se tomó la muestra como los resultados de RT-qPCR dependen de cada una de las instituciones. En algunos casos (INER e InDRE) se tuvo acceso a los resultados de RT-qPCR conociendo qué secuencias génicas virales se emplearon y los ciclos de cuantificación (CT) obtenidos. Para el caso de las muestras provenientes del IMSS no fue posible acceder a esa información y solo se contó con el diagnóstico positivo o negativo. Al momento de realizar los diagnósticos por hibridación, todas eran muestras ciegas.

La toma de muestra, ya sea por exudado orofaríngeo o nasofaríngeo, implica una fricción en el tejido humano, con lo que es posible recolectar células epiteliales, moco, vellosidades y/o microbiota habitual además del virus. Al colocar el hisopo en el medio de transporte viral (MTV), la proliferación de las bacterias y hongos pertenecientes a la microbiota se verían atenuadas debido a la presencia de antibióticos y antimicóticos, respectivamente.

El suero fetal bovino en el MTV sirve para enriquecer el medio, con el fin de conservar las condiciones fisiológicas de un sistema biológico y con esto, conservar íntegro el virus. Finalmente, el pH se ajusta a 7.4 (fisiológico) y las sales actúan como amortiguadores del mismo. El pH es además identificado con un cromóforo como indicador (rojo de fenol). El rojo de fenol se utiliza como indicador de pH debido a que su estructura química cambia en función de este. Si se aumenta el pH ($pK_a = 1.2$), el protón del grupo cetona se pierde, lo que da como resultado el ión amarillo con carga negativa. A pH aún mayor ($pK_a = 7.7$), el grupo hidroxilo del fenol pierde su protón, dando como resultado el ion rojo.

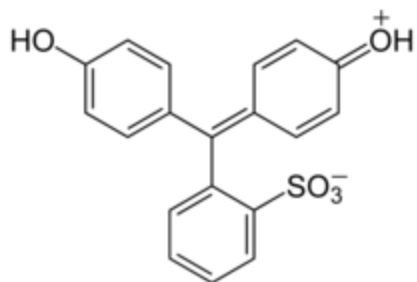


Imagen 5. Estructura química del rojo de fenol.

Al agregar el MTV en proporción 1:1 con la disolución de inactivación, ocurre una lisis de los lípidos presentes en la muestra debido a la presencia de detergentes. En las células, dichos lípidos pueden encontrarse en forma de membrana celular u otras biomoléculas de naturaleza similar. Asimismo, la cápside proteica de los virus es penetrada por moléculas como el tiocianato de guanidinio presente en el TRIzol™, lo que expone el material genético del virus para ser detectado en función de la hibridación de las sondas fluorescentes.

En el diseño experimental de la prueba de hibridación, la curva control o de referencia está diseñada para que el control negativo (NEG) sea el punto más fluorescente en la prueba, ya que carece de RNA sintético o viral. Contiene únicamente el cDNA-fluorescente y las perlas magnéticas funcionalizadas. No obstante, el comportamiento de los resultados fue diferente al esperado para el gen N (Fig. 1A).

El aumento exacerbado en la fluorescencia de las muestras clínicas se atribuyó a la presencia de TRIzol™, que contiene fenol en su formulación. Dicha sustancia química es un disolvente orgánico que contiene un anillo aromático en su estructura. Estos grupos funcionales tienden a presentar fluorescencia, por lo que se sugiere que al no realizar los lavados finales de manera adecuada, el remanente de esta sustancia produciría dicho efecto en la fluorescencia de la prueba. Debido a esto, se aumentó el volumen de 50 a 100 μL de BL1X utilizado en el paso 3.2 (posterior a la detección) de la metodología y se aumentaron de 300 a 500 rpm de agitación de placa.

De manera seguida, se continuó con el ensayo ciego haciendo los cambios indicados. La tendencia obtenida con 5 μ L resulta congruente, ya que se observa una tendencia creciente en la detección del genoma viral. En otras palabras, es posible observar que hay muestras con una carga viral pobre, otras con moderada y otras con una carga viral alta. No obstante, diversos pacientes se encuentran en el límite establecido entre positivo y negativo. Se pensó que al aumentar el volumen de muestra habría un mayor y mejor reconocimiento del RNA viral en la prueba, permitiendo diferenciar de forma más clara los pacientes positivos de los negativos cercanos al límite. Al aumentar el volumen a 10 μ L y 30 μ L ocurrió lo contrario a lo esperado, lo que sugiere que se está afectando entre otras cosas, a la unión biotina estreptavidina o la unión entre la estreptavidina y la perla magnética (Fig. 2).

El fabricante de las DynabeadsTM reporta que la forma en la que se encuentra unida la estreptavidina con la partícula magnética, es a través de una unión covalente. La información reportada, sugiere una unión altamente estable entre dicha proteína y la aleación magnética. Dicha estabilidad es posible manteniendo las perlas magnéticas en la Sol. B que contiene una concentración 0.1 M de NaCl (Anexo 7), una sal que estabiliza a la estreptavidina evitando su degradación durante un tiempo determinado. En numerosos sistemas biológicos se ha descrito el papel de las sales en la estabilización de proteínas mediante interacciones electrostáticas no específicas. Además, dicha sal contenida en la Sol. B, aumenta la linealización de los oligonucleótidos, lo que a su vez promueve la hibridación entre ellos (Arakawa & Timasheff, 1991; Hani et al., 2019).

La unión biotina-estreptavidina está caracterizada por ser una de las uniones no covalentes más fuertes conocidas. Esto se debe principalmente a su alta especificidad, alta afinidad y a la resiliencia de la estreptavidina a cambios de pH, cambios de temperatura y a la presencia de agentes desnaturizantes de proteínas. No obstante, dicha unión se rompe en condiciones específicas de temperatura y pH (Chivers et al., 2011).

Por un lado, el enlace entre estas dos moléculas se da por la presencia de numerosos puentes de hidrógeno que se forman entre los residuos de serina presentes en el sitio de unión de la estreptavidina, de manera específica los de Ser⁴⁵. Dicho aminoácido posee grupos funcionales hidroxilo (OH) libres en su estructura, lo que le permite formar interacciones no covalentes con otras moléculas de la misma naturaleza. Por ello, resulta improbable que se esté rompiendo dicha unión y que los resultados estén relacionados con las sustancias utilizadas en el tratamiento de la muestra.

Por otro lado, el tiocianato de guanidinio actúa como un agente caotrópico, es decir, una molécula que en disolución acuosa puede romper los puentes de hidrógeno presentes en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de la nucleocápside del SARS-CoV-2. De forma general, los agentes caotrópicos interfieren con las interacciones intermoleculares mediadas por fuerzas no covalentes. Estas incluyen a los mencionados puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas. Dichas interferencias producen la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos (Salvi et al., 2005).

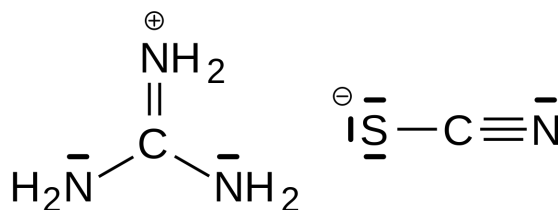


Imagen 6. Estructura química del tiocianato de guanidinio en su forma disociada.

El ion guanidinio obstaculiza los enlaces de hidrógeno formando nuevos entre su propia estructura y los enlaces amida de las proteínas. Asimismo, el ion tiocianato puede formar enlaces con los grupos funcionales tiol (-SH) presentes en los residuos de cisteína, lo que las lleva a una estructura inestable y por lo tanto, a la desnaturalización.

De forma específica, se ha estudiado que la unión biotina-estreptavidina puede verse comprometida en presencia de cloruro de guanidinio a una concentración aproximada de 8 M, pH de 1.5 y/o temperaturas mayores a 80°C (Holmberg et al., 2005). De

acuerdo a los cálculos realizados (Anexo 8), la concentración presente de guanidinio al momento de la reacción de detección es de 0.1 M, 0.2 M y 0.6 M en las condiciones de 5 μ L, 10 μ L y 30 μ L de muestra respectivamente. Si bien esa concentración es lejana a la reportada para la disociación de la estreptavidina, el fenol, el ácido tiocianico y el tiocianato de amonio presentes en el TRIzol™, tienen un pH de 4-5 que disminuye de forma inversamente proporcional a la concentración de TRIzol™ en la muestra, llegando a un pH mínimo de 2. Dichas condiciones, sumadas al calentamiento a 90°C pueden producir a baja concentración (0.1 M), una reacción entre los componentes del TRIzol™ y la estructura química de los fluorocromos acoplados al cDNA, aumentando su fluorescencia. Por otro lado, a altas concentraciones (0.6 M) las perlas magnéticas no presentan fluorescencia, de manera independiente de la concentración de cDNA-fluorescente, del ssDNA-biotinilado y del número de perlas magnéticas. Esto sugiere que ocurrió la disociación del tetrámero de estreptavidina en sus subunidades, lo que llevó a la disociación de la biotina debido a la alta concentración del tiocianato de guanidinio, que interfiere con los puentes de hidrógeno presentes en la unión biotina-estreptavidina (Green & Toms, 1972).

Al disociarse, las proteínas son más susceptibles a uniones inespecíficas con otras proteínas, por lo que los cúmulos formados de perlas magnéticas, pueden deberse a una unión inespecífica entre los monómeros o dímeros de estreptavidina de una perlas magnéticas con otros de su misma naturaleza en las perlas magnéticas vecinas. Para que la función de las proteínas sea adecuada, es necesario no sólo que se vinculen a objetivos específicos, sino también que se eviten las interacciones no funcionales y la agregación no específica. Finalmente, las propiedades superparamagnéticas de las perlas son alteradas debido a los agregados de estreptavidina que se forman entre ellas (Johnson & Hummer, 2011).

Es posible entonces, que la utilización de Dynabeads™ activadas superficialmente para formar un enlace covalente con el ssDNA como un reemplazo de la unión estreptavidina-biotina haga una diferencia significativa en los resultados.

Propiedades generales y efecto del TRIzol™ en la detección de RNA sintético

Uno de los componentes del MTV es la disolución salina balanceada de Hanks. Esta disolución contiene cationes calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}). La formación del precipitado blanco al mezclar el TRIzol™ con el MTV sugiere que estos pueden ser los átomos centrales en la formación de un compuesto de coordinación con el ion tiocianato presente en el TRIzol™ como el ligando o quelante.

Asimismo, la absorbancia exacerbada que se observa (Fig. 3A) puede deberse a dicho precipitado color blanco. La absorbancia es dependiente de la cantidad de moléculas presentes en la disolución y de la distancia que existe entre ellas. Cuando el estado de la materia es sólido, las partículas se encuentran muy cerca entre ellas, lo que hace a la sustancia más opaca y por lo tanto, impide el paso de la luz. De esta forma, al disminuir la cantidad de luz que atraviesa al sólido blanco, aumenta el valor de absorbancia en la lectura (Eichler et al., 2018).

De igual forma que con el fenol, el remanente de este sólido después de la detección puede producir interferencias en la lectura. Las moléculas fluorescentes a detectar al finalizar la prueba, requieren cierta cantidad de luz incidente para ser excitadas. Sin embargo, la presencia del sólido blanco produce un efecto de apantallamiento de la luz incidente, es decir, una disminución en la cantidad de luz que incide en los fluorocromos. Este fenómeno produce una disminución en el número de electrones excitados, lo que se refleja como una disminución de la fluorescencia en la lectura. Así pues, se reitera la importancia de los lavados posteriores a la reacción de detección (Eichler et al., 2018).

Sumado a esto, la presencia del sólido puede evitar el correcto reconocimiento e hibridación del RNA viral por el cDNA-fluorescente debido al impedimento estérico.

Este tipo de interferencias únicamente podrían evitarse con cambios en los componentes de las disoluciones, o cambiando la disolución misma.

En el barrido de emisión (Fig. 3B) se encontró que el MTV presenta una emisión de fluorescencia en longitudes de onda similares a las del fluorocromo para el gen N. Esto confirma que el rojo de fenol representa una interferencia importante para la correcta lectura de la prueba. Al reaccionar este con el TRIzol™, se forma el compuesto de coordinación (Imagen 9) que interfiere con la lectura de fluorescencia y aumenta la dispersión de los datos. Dicha dispersión se debe al efecto de apantallamiento mencionado y a que este no es uniforme en todas las repeticiones del experimento. No obstante, el remanente de MTV y por lo tanto, de rojo de fenol continúan aumentando la fluorescencia en el mismo rango de longitudes de onda.

Con las lecturas utilizando las configuraciones del equipo de lectura para los genes N y E se corroboró que el MTV es el factor que produce el mayor número de interferencias. En el gen N principalmente aumentando la fluorescencia y en el gen E aumentando la dispersión de los datos. Por lo que evitar su uso o disminuir su concentración puede ser una opción viable para la prueba.

Así pues, aún al realizar los experimentos únicamente con TRIzol™ existe un aumento en la fluorescencia de los cDNA-fluorescentes Alexa Fluor™ 488 y 647 sintetizados por IDT™. Dichos cDNAs-fluorescentes tienen diferencias estructurales importantes en comparación con los FAM™ 488 y Quasar™ 670 de la marca T4Oligo™, que incluyen la presencia de grupos funcionales que le confieren a la molécula propiedades reactivas distintas.

Al analizar dichas estructuras se observó que una de las diferencias más importantes es que los fluorocromos de IDT™ poseen grupos funcionales como el sulfonato y amina. Estos grupos funcionales tienen propiedades hidrofílicas debido a la alta electronegatividad de sus átomos (N, S y O) y a la presencia de hidrógenos. La

presencia de átomos electronegativos y de hidrógeno permite la formación de enlaces con el agua, fomentando su solubilidad en este disolvente.

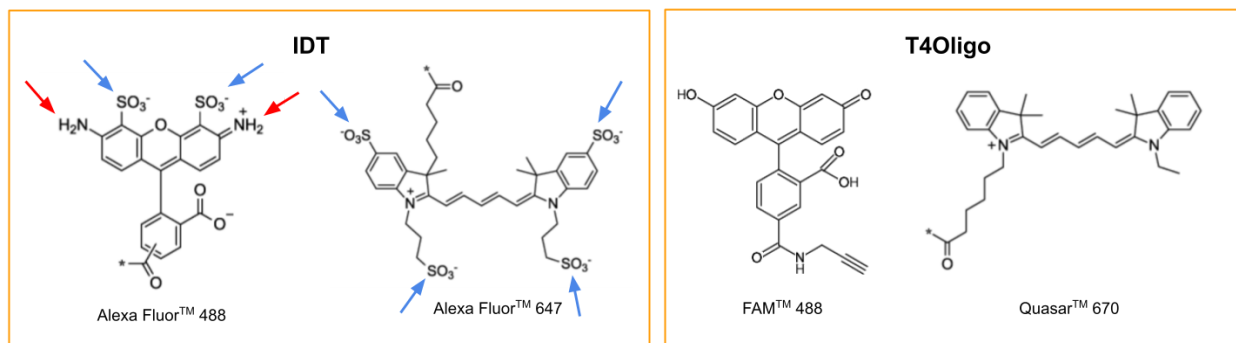


Imagen 7. Estructura química de los fluorocromos acoplados a los cDNA-fluorescentes.

Los cDNA de la marca IDTTM tienen acoplados los Alexa FluorTM de longitud de onda 488 y 647 para los genes N y E respectivamente. Los cDNA de la marca T4OligoTM tienen acoplados los FAMTM 488 y QuasarTM 670 para los genes N y E respectivamente. Las flechas azules señalan los grupos funcionales sulfonato. Las flechas rojas señalan los grupos funcionales amino diferentes a los de un heterociclo. Las estructuras mostradas son las reportadas por los proveedores a pH neutro (~7).

Además, los grupos funcionales de los Alexa FluorTM se encuentran altamente ionizados al pH utilizado en la prueba (pH = 7.5). Sin embargo, al agregar el TRIzolTM el pH se reduce hasta un pH = 2-4, lo que en los grupos sulfonato implica una protonación de los oxígenos, haciendo a la molécula más hidrofóbica. Al ser hidrofóbica, la molécula es más soluble en disolventes orgánicos como el fenol presente en el TRIzolTM, lo que puede producir una división de fases, evitando la correcta interacción del RNA viral con el cDNA-fluorescente que se encuentra en disolución acuosa. Esto a su vez resultaría en una baja detección y por lo tanto, una alta fluorescencia.

Por el contrario, los fluorocromos FAMTM y QuasarTM tienen mayoritariamente grupos funcionales hidrofóbicos como cadenas largas de carbonos y anillos aromáticos no sustituidos. Esto impide que dichas moléculas puedan interactuar con el agua y sean más solubles en disolventes orgánicos como el fenol presente en el TRIzolTM.

De la misma manera que con Alexa FluorTM, las propiedades de estos fluorocromos pueden ser alteradas por el pH del TRIzolTM. El grupo amida presente en el FAMTM 488 puede protonarse a pHs bajos. No obstante, tanto el FAMTM como el QuasarTM son más

estables a cambios de pH y a alteraciones estructurales debido a la ausencia de grupos funcionales altamente reactivos. El RNA viral se encuentra emulsionado en el fenol, por lo que las propiedades hidrofílicas del fluorocromo y por lo tanto del cDNA-fluorescente pueden influir en la interacción intermolecular.

De acuerdo al mencionado análisis estructural, se sugiere que el TRIzol™ puede estar alterando la estructura química de los Alexa Fluor™, particularmente del 488 correspondiente al gen N.

Inicialmente se pensó que la presencia de los grupos sulfonatos en las estructuras de los Alexa Fluor™ podría ser la causa de las inconsistencias en la prueba. Sin embargo, estos grupos funcionales también se encuentran en la estructura del fluorocromo correspondiente al gen E, donde no se encontró un aumento significativo en la fluorescencia. Además, los grupos funcionales sulfonato unidos a uno o más anillos aromáticos son altamente estables y no reaccionan de forma particular con ningún componente del TRIzol™.

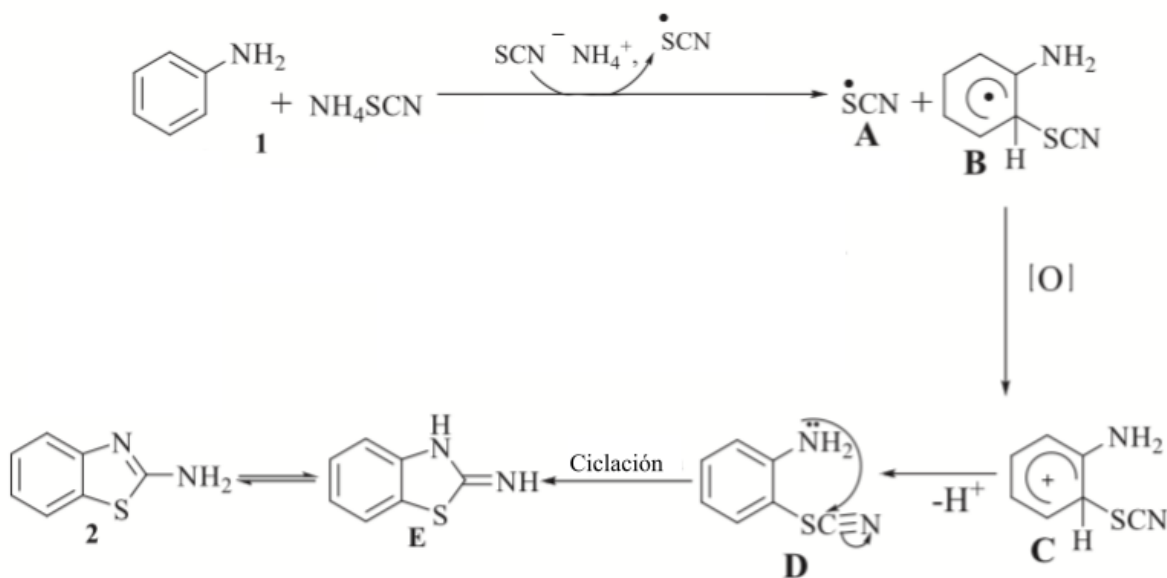


Imagen 8. Mecanismo de acción para la formación de 2-aminobenzotiazoles a partir de anilinas.
Adaptada y traducida al español. (Singh, et al., 2020)

Por otro lado, el Alexa Fluor™ 488 correspondiente al gen N posee en su estructura grupos amino unidos a un benceno llamados anilina o aminobenceno. Dichos grupos funcionales son altamente reactivos con el tiocianato de amonio a temperatura ambiente. Dicha reactividad puede fomentarse en condiciones aeróbicas y con temperaturas superiores a la ambiente (>25°C). De esta forma se produce un anillo heterocíclico unido al benceno denominado 2-aminobenzotiazol (Imagen 8; Singh, et al. 2020).

La presencia de un anillo aromático extra, significa un aumento en el número de dobles enlaces conjugados en la estructura molecular y con ello, un aumento en su fluorescencia. Esta puede ser la razón del aumento significativo en la fluorescencia del Alexa Fluor™ 488 que lo diferencia del 647 de la misma marca y de los otros dos de diferente marca.

Efecto del calentamiento previo a la competencia en la detección de pruebas clínicas en presencia y ausencia de MTV+TRIZOL™

Debido a que el aumento en la temperatura puede fomentar la formación del 2-aminobenzotiazol, se consideró la eliminación del calentamiento a 90°C del método experimental. Considerando la cinética de una reacción como la presentada, un aumento en la temperatura desplaza el equilibrio químico hacia los productos debido a un mayor movimiento en las moléculas reactivas. Además, un aumento en la temperatura aumenta la linealidad de las secuencias de ácidos nucleicos de una sola cadena, lo que disminuye la probabilidad de que se formen heterodímeros y por lo tanto, exista un mayor reconocimiento entre las secuencias complementarias. Por esto, se esperaba un mayor aumento en la fluorescencia al exponer el cDNA-fluorescente a 90°C y una disminución de la misma a 50°C. A pesar de ello, el resultado fue contrario al esperado.

Los resultados sugieren que, dentro de todas las sustancias presentes al momento de la reacción de competencia, ocurren equilibrios químicos secundarios que interfieren con la reacción principal que en este caso, es la formación del heterociclo. Cabe

mencionar que una de las reacciones secundarias es en la que se forma el compuesto de coordinación que precipita al mezclar el TRIzol™ con el MTV. Es posible considerarla una reacción secundaria debido a que la misma molécula iónica (SCN^-) funge como reactivo en esta y en la reacción principal.

Es posible que a 50°C se favorezca la reacción principal. Al formarse los heterociclos en un mayor número de moléculas, se obtiene una intensidad de fluorescencia mayor. Por otro lado, el calentamiento a 90°C puede estar fomentando la formación del compuesto de coordinación con los cationes metálicos presentes en el MTV. Lo que interferiría con el reconocimiento y la hibridación entre los cDNA-fluorescentes y los ssDNA libres en las perlas magnéticas funcionalizadas. En consecuencia, ocurre una disminución de la intensidad de fluorescencia.

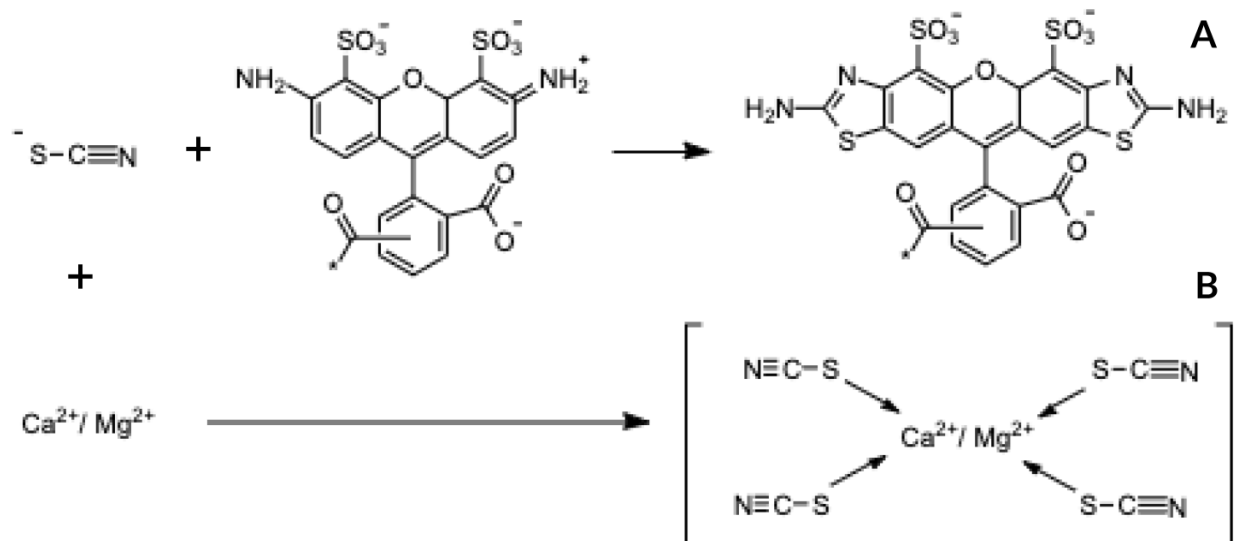


Imagen 9. Reacciones que interfieren en la reacción de detección.

Para ambas reacciones el ion tiocianato (SCN^-) es un reactivo. **A)** Producto de la reacción principal favorecida por el calentamiento a 50°C (formación de heterociclos). **B)** Producto de la reacción secundaria favorecida por el calentamiento a 90°C (formación de complejos).

En cualquiera de los dos casos (50°C y 90°C) los resultados son incongruentes debido a la presencia de TRIzol™ y de MTV. Por ello se consideró la posibilidad de restarlos del biosensor, a través del aislamiento y purificación del analito, es decir, la extracción del RNA.

La extracción de RNA consiste en una serie de pasos que tienen como objetivo el aislamiento del RNA presente en la muestra. Como se mencionó, el TRIzol™ contiene sustancias desnaturizantes de proteínas y lípidos. En el SARS-CoV-2 se desnaturaliza la membrana lipídica externa y la cápside proteica que envuelve al material genético del virus. Sin embargo, también desnaturaliza las membranas de las células epiteliales humanas, así como las de las bacterias de la microbiota habitual que se recolectan durante la toma de la muestra. Esto produce la liberación de diversos componentes celulares que pueden interferir con la correcta detección del RNA.

Una vez que la muestra se encuentra en TRIzol™, se agrega cloroformo. El cloroformo es un disolvente orgánico de mediana-baja polaridad, por lo tanto, los lípidos y moléculas de naturaleza similar, se disolverán en el mismo. De esta forma, se forman dos fases, una orgánica (cloroformo) y otra acuosa donde se encuentran las moléculas iónicas y altamente polares (RNA). Posteriormente se agrega isopropanol, un disolvente de mediana-alta polaridad con el fin de producir la precipitación del RNA y de eliminar las impurezas de naturaleza similar. Finalmente se agrega etanol absoluto grado biología molecular, un disolvente altamente puro con una polaridad ligeramente mayor a la del isopropanol con el mismo fin. Así, se eliminan todas las impurezas con propiedades químicas diferentes a las del RNA, conservándose éste en la fase acuosa.

Al realizar la prueba de hibridación con muestras de RNA purificado, se encontraron resultados congruentes y una mayor coincidencia entre los genes. Esto puede deberse a que se evitan las alteraciones en la fluorescencia como consecuencia del uso del TRIzol™ y del MTV. Entre las alteraciones más frecuentes que se evitan está el aglomeramiento de las perlas magnéticas, el aumento o disminución de la fluorescencia debido a las reacciones descritas y el aumento en la movilidad de las perlas por acción de los imanes.

El uso del RNA purificado en la prueba implica un aumento importante en el costo de la misma. Esto se debe al número y características de las sustancias que se utilizan para el proceso de aislamiento y purificación. Además, es un proceso que requiere de

precisión y experiencia en el manejo de micropipetas, así como en el trabajo experimental con RNA.

Efectos del RNA Shield™ en la detección de RNA sintético y viral

Para fines del biosensor, el RNA Shield™ presenta numerosas ventajas sobre el TRIzol™. De manera general, no contiene sustancias volátiles tóxicas, las muestras pueden conservarse a temperatura ambiente por un tiempo prolongado, entre otras.

De manera similar al TRIzol™, con el RNA Shield™ se observa un aumento en la fluorescencia de la detección. La composición del RNA Shield™ se desconoce, ya que no está reportada por el fabricante. A pesar de ello, es posible asumir que contiene sustancias de naturaleza similar como agentes caotrópicos y desnaturalizantes de proteínas y lípidos. Dichas sustancias poseen una amplia gama de grupos funcionales reactivos que pueden estar reaccionando con los componentes de la prueba.

La ausencia del precipitado blanco al mezclarse con el MTV, reduce la ausencia de agentes quelantes con afinidad por el calcio o magnesio en la composición del RNA Shield™. Sin embargo, ocurre una disminución del pH que se denota por el vire del rojo de fenol a amarillo.

Al probar diferentes volúmenes de RNA Shield™ en las curvas, se determinó que este tiene un margen de uso mayor que el TRIzol™. Es decir, que pueden utilizarse hasta 20 μ L de RNA Shield™ sin presentar la mayoría de las interferencias que presenta el TRIzol™. Aún así, con 20 μ L la tendencia de la curva se ve afectada, así como se ve aumentada la dispersión de los datos. Esto puede deberse a que a altas concentraciones de RNA Shield™, los grupos funcionales reactivos mencionados pueden interferir con la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas de RNA-cDNA-ssDNA. Dichas interferencias pueden producirse debido a la repulsión de cargas entre moléculas, por impedimento estérico, o bien por reacciones químicas que compiten con la hibridación de los ácidos nucleicos.

En las pruebas clínicas ocurre un comportamiento similar, ya que la intensidad de fluorescencia promedio de las pruebas aumenta ligeramente al aumentar el volumen de muestra (MTV+RNA Shield™) utilizado. Únicamente en uno de los pacientes se observa un cambio mayor en el gen E al aumentar la concentración de la muestra. Este tipo de cambios pueden representar un diagnóstico erróneo al establecer si la prueba es positiva o negativa. No obstante, en todas las pruebas de diagnóstico, se tiene un porcentaje de confiabilidad menor al 100%, por lo que es importante determinarlo y reportarlo aumentando el número de pruebas clínicas (Prince-Guerra, 2021).

Para determinar la sensibilidad del biosensor con RNA Shield™ y TRIzol™, se realizaron pruebas de RT-qPCR a las muestras evaluadas. Al comparar de forma directa los resultados, se obtuvo que el RNA Shield™ presenta una mayor sensibilidad. Esto puede deberse a la mencionada ausencia de interferencias que se observan con el uso de TRIzol™.

Pese a las interferencias que puede producir el uso de RNA Shield™, resultan significativamente menores a las presentadas con el TRIzol™. Por esto, el uso del RNA Shield™ como sustituto puede ser una opción viable para conservar el precio original del biosensor. Además, al disminuir el número de posibles discrepancias, aumenta considerablemente la confiabilidad del resultado de la prueba.

Propiedades generales del RNA Shield™ y su efecto en la detección

Al estudiar las propiedades espectrofotométricas se encontró que el RNA Shield™ no presenta una absorción ni emisión significativa en las longitudes de onda de fluorescencia de detección de los genes N y E. De la misma manera, en los canales y configuraciones para ambos genes, presentó una fluorescencia comparable con el blanco. Sin embargo, su combinación con el MTV produce un aumento en la dispersión de los datos.

Por un lado, estos resultados sugieren que, el uso del MTV puede ser la causa principal de las variaciones en los resultados. Ya sea formando el precipitado blanco con el TRIzol™, brindándole propiedades cromóforas y fluorescentes al RNA Shield™, o bien alterando el medio de reacción de la prueba. Por otro lado, el remanente de RNA Shield™ solo, no produciría fluorescencia a esas longitudes de onda, lo que sugiere que en su composición no se encuentran sustancias con estructuras químicas fluorescentes. Por lo tanto, es posible que el aumento en la fluorescencia de los resultados se deba a un cambio en la estructura química del fluorocromo similar a la ocurrida con el TRIzol™.

Dicha hipótesis se evalúa con el uso del cDNA-fluorescente del gen N y la ausencia de MTV. Se utilizó este gen debido a que es el que presenta mayores alteraciones en la fluorescencia. En numerosos estudios se utiliza el NaCl como catalizador de una gran variedad de reacciones químicas. Un catalizador es una sustancia que favorece la formación de productos en una reacción química y que al llegar al equilibrio, se recupera totalmente. Los resultados obtenidos sugieren entonces, que ocurre una reacción entre el RNA Shield™ y el fluorocromo del gen N, que es catalizada por la presencia de las sales que conforman a la Sol. B (Hazra et al., 2020).

Efecto del RNA Shield™ en el procesamiento de muestras clínicas

El que el RNA Shield™ produzca un aumento en la fluorescencia de ambos genes, representa una ventaja sobre el TRIzol™. Por un lado, el aumento en la fluorescencia particularmente del gen N por parte del TRIzol™, significa una menor coincidencia entre el resultado de cada gen. Por otro lado, el aumento uniforme en ambos genes que produce el RNA Shield™ permite asimismo, aumentar el valor límite para el establecimiento de un resultado positivo o negativo.

Sin embargo, al comparar contra el RNA purificado y al establecer el límite, se encuentran inconsistencias similares a las presentadas con el TRIzol™. Esto puede

deberse a que las interferencias mencionadas no sean consistentes, en otras palabras, que se presenten en diversos experimentos y en otros no.

Interferencias en las muestras clínicas con RNA purificado

Los procesos de lisis lipídica y desnaturalización proteica mencionados, ocurren tanto en el virus como en las células que pudieran encontrarse en la muestra. De esta forma se libera el material genético de las mismas. Por esto, las interferencias en la prueba del biosensor por material genético ajeno al virus es probable.

Inicialmente se determinó la sensibilidad de la prueba sin interferencias biológicas. Al evaluar dichas interferencias de manera controlada con RNA humano extraído de un sujeto sano, e igualmente controlando la concentración de RNA viral sintético (Fig. 11), fue posible determinar que la presencia del RNA humano puede cambiar el resultado de la prueba. Esto puede deberse a un efecto de impedimento estérico por parte del RNA humano, considerando que dicho RNA no reconozca y/o hibride a las secuencias utilizadas en la funcionalización de las perlas magnéticas y en la reacción de competencia.

Los cDNA utilizados en la prueba están compuestos por un máximo de 21 nucleótidos (nt), mientras que el RNA humano puede llegar a tener más de 200 nt, por ello puede representar una interferencia importante durante la hibridación del cDNA-fluorescente con el RNA viral, o bien del ssDNA-biotinilado con el cDNA-fluorescente. Este resultado es una limitante general de las muestras debido a que es necesario recuperar células humanas infectadas con el virus para asegurar la recolección del mismo, únicamente es importante considerarlo como una limitante de esta prueba y de todas las que impliquen una muestra similar (Jayamohan et al., 2020).

Sensibilidad del biosensor

Finalmente, se encontró que la sensibilidad de la prueba aumenta significativamente con el uso de RNA Shield™ como sustituto del TRIzol™. Obteniendo una concordancia de resultados positivos y negativos de 62.07% y 54.00% respectivamente para el TRIzol™; del 63.64% y 77.78% respectivamente para el RNA Shield™. A su vez, el uso de RNA purificado aumenta significativamente dichos valores sobre el RNA Shield™, con una concordancia del 95-100%.

Los valores calculados de sensibilidad se realizaron con base en las pruebas de RT-qPCR realizadas por las instituciones que proporcionaron las muestras clínicas. En caso de no contar con los resultados reportados por dichas instituciones, se realizaron pruebas de RT-qPCR en el laboratorio adaptando el protocolo y las sondas a los equipos disponibles.

La selección de un límite para afirmar si el virus se encuentra o no en un organismo es variable, aún en el estándar de oro. La interpretación positiva o negativa del resultado es en cierta medida subjetiva, ya que depende de que se fije un valor de umbral. El valor de umbral puede cambiar entre muestras, equipos, y entre usuarios de experimentación. Es por esto, que cualquier tipo de diagnóstico debe ser establecido en conjunto con el médico que ha revisado el cuadro clínico del paciente y considerando un margen de error en las pruebas realizadas (Weissleder et al., 2020).

Evaluando todas las variables presentadas, es posible afirmar que las pruebas con RNA purificado podrían significar una prueba confiable de diagnóstico. Mientras que las pruebas con RNA Shield™ podrían utilizarse como prueba de tamizaje, con el fin de descartar casos negativos e identificar casos positivos evidentes.

Propuesta de formulación

En diversos estudios se han reportado formas de extracción y preservación del RNA de virus, bacterias y otros organismos. Estas incluyen el uso de sustancias químicas o de variables termodinámicas que inactivan a los organismos y exponen su material genético. Además, abarcan otras sustancias que estabilizan el RNA e inactivan las enzimas que comprometen su estructura (RNAsas) (Kashofer et al., 2013; Menke et al., 2017; Pavlovska et al., 2021; Sadler & Khodavirdi, 2015).

El objetivo final de este trabajo es plantear una formulación de una disolución para la inactivación del virus SARS-CoV-2 y preservación de su RNA. Una disolución que además no interfiera químicamente con la prueba de hibridación. Sin embargo, las disoluciones reportadas en la literatura para este fin, describen en su mayoría componentes (guanidinio y agentes caotrópicos similares) que pueden alterar la integridad de la unión estreptavidina-biotina (Hasegawa et al., 2021; Kono et al., 2016; Yan et al., 2020).

Debido a ello, se propone un cambio en la unión del ssDNA-biot con la perla magnética. Distintos proveedores producen perlas magnéticas con grupos funcionales unidos a éstas, diferentes a la estreptavidina. De esta forma, podría formarse una unión covalente entre el oligonucleótido (ssDNA) y la perla magnética, sin necesidad del acoplamiento de la biotina al ssDNA. Dicha unión no estaría comprometida por la presencia de agentes caotrópicos o desnaturizantes de proteínas, los cuales son indispensables para la inactivación del virus.

Una vez formada la unión covalente entre la perla magnética y el oligonucleótido, es posible utilizar una disolución de inactivación sin que ésta se vea comprometida. Para ello se propone eliminar o sustituir las sustancias que pueden reaccionar con los fluorocromos. El objetivo de MTV es la conservación del virus y de las células que lo hospedan, por lo que es posible descartarlo por completo de esta formulación.

Si se descarta el tiocianato de amonio presente en el TRIzol™, se evitará la formación del heterociclo en la estructura de los fluorocromos. Sin embargo, como agente caotrópico se propone la conservación del guanidinio, que se ha encontrado que funciona tanto como inactivador del virus como preservador de su RNA.

Se propone además, utilizar un detergente suave con el fin de desnaturalizar los lípidos presentes en la muestra. Para ello, pueden usarse detergentes comúnmente utilizados en biología molecular como el lauril sulfato de sodio (SDS), o desoxicolato de sodio. Ambos poseen estructuras químicas poco reactivas con una baja probabilidad de reaccionar con los fluorocromos.

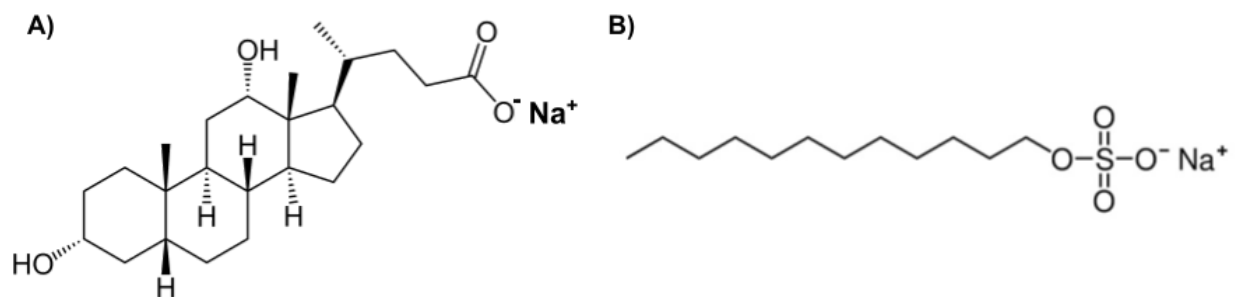


Imagen 10. Estructura química de detergentes.
A) Desoxicolato de sodio. B) Lauril sulfato de sodio

Finalmente, se sugiere el uso de una disolución salina isotónica como soporte de la disolución de inactivación y/o una disolución amortiguadora de pH compuesta por sales de sulfatos y fosfatos (PBS), o por ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Para validar el uso de las sustancias mencionadas, es necesario realizar una serie de pruebas de compatibilidad entre los componentes y de estabilidad de la disolución. Asimismo, es necesario analizar los posibles equilibrios químicos simultáneos debido a cambios en las condiciones de presión, temperatura y pH. Una vez validada la disolución de forma independiente, es imprescindible estudiar sus efectos en la prueba.

Conclusiones

- Se identificó que las disoluciones de transporte e inactivación del virus producen distintos efectos químicos en la prueba de hibridación. Dichos efectos se ven en distintas etapas de la prueba. En el procesamiento de la muestra, previo a la competencia, se forman precipitados al mezclar disoluciones que reaccionan entre sí. En la competencia, las disoluciones reaccionan con los fluorocromos e interfieren con la hibridación de los oligonucleótidos. En la detección, absorben y emiten luz a longitudes de onda similares a las de los fluorocromos utilizados.
- Se determinó que las disoluciones comúnmente utilizadas para el tratamiento de muestras clínicas, contienen sustancias desnaturizantes de proteínas, lípidos y preservadoras del RNA. Las cuales poseen características estructurales particulares que tienden a reaccionar entre ellas y con las sustancias a su alrededor. Asimismo, contienen disolventes orgánicos o acuosos que pueden evitar la correcta interacción entre los componentes de la prueba o interferir en la lectura final de la misma.
- Se describieron las posibles reacciones químicas entre componentes, como los iones catiónicos presentes en el MTV y los fluorocromos del cDNA-fluorescente con el tiocianato de amonio presente en el TRIzol™. Sumado a esto, el efecto del guanidinio presente en el TRIzol™ en la desnaturización de la estreptavidina y el efecto de los remanentes de rojo de fenol, fenol y RNA Shield™ en la detección. De la misma manera, se describieron las posibles interferencias por impedimento estérico con base en la presencia del precipitado que se forma cuando los iones tiocianato interaccionan con el Ca²⁺ del MTV, así como un valor bajo de la relación vRNA/hRNA.
- Se comparó entre dos disoluciones de inactivación (TRIzol™ y RNA Shield™) mezcladas con el medio de transporte viral (MTV) y la ausencia de ellas (RNA purificado). Se determinó que el uso de RNA Shield™ posee mayores ventajas sobre el uso TRIzol™ para la prueba de hibridación. Sin embargo, la mayor

sensibilidad se observó al utilizar el RNA purificado, lo que implica un aumento en el costo y tiempo de la prueba.

- Se propuso la preparación de una disolución de inactivación y preservación del RNA viral con base en las disoluciones estudiadas. Dicha propuesta se realizó considerando el uso de perlas magnéticas unidas covalentemente al oligonucleótido como alternativa a la unión estreptavidina-biotina.

Bibliografía

- Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1991). The Interactions of Proteins with Salts, Amino Acids, and Sugars at High Concentration. En *Advances in Comparative and Environmental Physiology* (pp. 226–245). https://doi.org/10.1007/978-3-642-76226-0_8
- Augustine, R., Das, S., Hasan, A., Abhilash, S., Salam, S. A., Augustine, P., Dalvi, Y. B., Varghese, R., Primavera, R., Yassine, H. M., Thakor, A. S., & Kevadiya, B. D. (2020). Rapid Antibody-Based COVID-19 Mass Surveillance: Relevance, Challenges, and Prospects in a Pandemic and Post-Pandemic World. *Journal of Clinical Medicine Research*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/jcm9103372>
- Barik, S. (2021). Systematizing the genomic order and relatedness in the open reading frames (ORFs) of the coronaviruses. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 92, 104858. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104858>
- Chang, R., & Goldsby, K. (2015). *Chemistry*. <https://www.mheducation.com/highered/product/chemistry-chang-goldsby/M9780078021510.html>
- Chivers, C. E., Koner, A. L., Lowe, E. D., & Howarth, M. (2011). How the biotin-streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochemical Journal*, 435(1), 55–63. <https://doi.org/10.1042/BJ20101593>
- Comber, L., Walsh, K. A., Jordan, K., O'Brien, K. K., Clyne, B., Teljeur, C., Drummond, L., Carty, P. G., De Gascun, C. F., Smith, S. M., Harrington, P., Ryan, M., & O'Neill, M. (2020). Alternative clinical specimens for the detection of SARS-CoV-2: A rapid review. *Reviews in Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/rmv.2185>

- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J., Zambon, M., ... Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 25(3).
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Eichler, H. J., Eichler, J., & Lux, O. (2018). Absorption and Emission of Light: Basics, Advances and Applications. *Lasers*, 29–49. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99895-4_2
- González Villa, E. A. (2017). *Segmentación semi-automática de células hipofisarias de ratón con interfaz gráfica*. <http://132.248.52.100:8080/xmlui/handle/132.248.52.100/12879>
- Green, N. M., & Toms, E. J. (1972). The dissociation of avidin–biotin complexes by guanidinium chloride. En *Biochemical Journal* (Vol. 130, Número 3, pp. 707–711).
<https://doi.org/10.1042/bj1300707>
- Hani, F. M., Cole, A. E., & Altman, E. (2019). The ability of salts to stabilize proteins in vivo or intracellularly correlates with the Hofmeister series of ions. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 10(3), 23.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6737386/>
- Hasegawa, N., Techer, M., & Mikheyev, A. S. (2021). A toolkit for studying Varroa genomics and transcriptomics: preservation, extraction, and sequencing library preparation. *BMC Genomics*, 22(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07363-7>
- Hastings, P. J. (2001). Complementary DNA (cDNA). En S. Brenner & J. H. Miller (Eds.), *Encyclopedia of Genetics* (p. 433). Academic Press.
<https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0253>

- Hazra, S., Tiwari, V., Verma, A., Dolui, P., & Elias, A. J. (2020). NaCl as Catalyst and Water as Solvent: Highly -Selective Olefination of Methyl Substituted -Heteroarenes with Benzyl Amines and Alcohols. *Organic Letters*, 22(14), 5496–5501.
<https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c01851>
- Holmberg, A., Blomstergren, A., Nord, O., Lukacs, M., Lundeberg, J., & Uhlén, M. (2005). The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. En *ELECTROPHORESIS* (Vol. 26, Número 3, pp. 501–510).
<https://doi.org/10.1002/elps.200410070>
- Jayamohan, H., Lambert, C. J., Sant, H. J., Jafek, A., Patel, D., Feng, H., Beeman, M., Mahmood, T., Nze, U., & Gale, B. K. (2020). SARS-CoV-2 pandemic: a review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with associated advantages and limitations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02958-1>
- Johnson, M. E., & Hummer, G. (2011). Nonspecific Binding Limits the Number of Proteins in a Cell and Shapes their Interaction Networks. En *Biophysical Journal* (Vol. 100, Número 3, p. 32a). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.378>
- Karp, G., Iwasa, J., & Marshall, W. (2015). *Karp's Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, 8th Edition*.
<https://www.wiley.com/en-us/Karp%27s+Cell+and+Molecular+Biology%3A+Concepts+and+Experiments%2C+8th+Edition-p-9781118886144>
- Kashofer, K., Viertler, C., Pichler, M., & Zatloukal, K. (2013). Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: implications for RT-PCR and microarray analysis. *PloS One*, 8(7), e70714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070714>
- Kono, N., Nakamura, H., Ito, Y., Tomita, M., & Arakawa, K. (2016). Evaluation of the impact of

- RNA preservation methods of spiders for de novo transcriptome assembly. *Molecular Ecology Resources*, 16(3), 662–672. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12485>
- Kumar, A., Prasoon, P., Kumari, C., Pareek, V., Faiq, M. A., Narayan, R. K., Kulandhasamy, M., & Kant, K. (2020). SARS-CoV-2 specific virulence factors in COVID-19. *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.26615>
- Luong, J. H. T., & Vashist, S. K. (2020). Chemistry of Biotin-Streptavidin and the Growing Concern of an Emerging Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *ACS Omega*, 5(1), 10–18. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03013>
- Mathuria, J. P., Yadav, R., & Rajkumar. (2020). Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods. *Journal of Infection and Public Health*, 13(7), 901–905. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.005>
- Menke, S., Gillingham, M. A. F., Wilhelm, K., & Sommer, S. (2017). Home-Made Cost Effective Preservation Buffer Is a Better Alternative to Commercial Preservation Methods for Microbiome Research. *Frontiers in Microbiology*, 8, 102. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00102>
- Pavlovska, M., Prekrasna, I., Parnikoza, I., & Dykyi, E. (2021). Soil Sample Preservation Strategy Affects the Microbial Community Structure. *Microbes and Environments / JSME*, 36(1). <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME20134>
- Prince-Guerra, J. L. (2021). Evaluation of Abbott BinaxNOW Rapid Antigen Test for SARS-CoV-2 Infection at Two Community-Based Testing Sites — Pima County, Arizona, November 3–17, 2020. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 70. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7003e3>
- Rezaei, N. (Ed.). (2021). *Coronavirus Disease - COVID-19*. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-63761-3>

- Sadler, T. R., & Khodavirdi, A. C. (2015). High-quality RNA extracted from biopsied samples dehydrated and stored dried at room temperature without chemical preservation for up to 3 months as evidenced by RT-PCR results. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM / Official Publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, 23(6), 456–461. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000100>
- Salvi, G., De Los Rios, P., & Vendruscolo, M. (2005). Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins*, 61(3). <https://doi.org/10.1002/prot.20626>
- Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., & Bootman, M. D. (2014). Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(10), db.top071795. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>
- Schildgen, V., Demuth, S., Lüsebrink, J., & Schildgen, O. (2021). Limits and Opportunities of SARS-CoV-2 Antigen Rapid Tests: An Experienced-Based Perspective. *Pathogens*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens10010038>
- Simek, J., & Wade, L. G., Jr. (2009). *Solutions Manual [for] Organic Chemistry, Seventh Ed. [by] L.G. Wade: Solutions*. Pearson College Division. https://books.google.com/books/about/Solutions_Manual_for_Organic_Chemistry_S.html?hl=&id=DTpoPgAACAAJ
- Singh, et al. (2020). Visible-light photoredox catalytic approach for the direct synthesis of 2-aminobenzothiazoles from anilines. *Tetrahedron letters*, 61(13), 151700. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.151700>
- Stayton, P. S., Freitag, S., Klumb, L. A., Chilkoti, A., Chu, V., Penzotti, J. E., To, R., Hyre, D., Le Trong, I., Lybrand, T. P., & Stenkamp, R. E. (1999). Streptavidin-biotin binding energetics. *Biomolecular engineering*, 16(1-4). [https://doi.org/10.1016/s1050-3862\(99\)00042-x](https://doi.org/10.1016/s1050-3862(99)00042-x)
- Vizcaíno-Salazar, G. J. (2017). Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de

laboratorio. En *Medicina y Laboratorio* (Vol. 23, Números 7-8, pp. 365–386).

<https://doi.org/10.36384/01232576.34>

Weissleder, R., Lee, H., Ko, J., & Pittet, M. J. (2020). COVID-19 diagnostics in context. En

Science Translational Medicine (Vol. 12, Número 546, p. eabc1931).

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc1931>

WHO *Coronavirus (COVID-19)*, 2021. (s/f). Recuperado el 21 de junio de 2021, de

<https://covid19.who.int>

Yadav, R., Chaudhary, J. K., Jain, N., Chaudhary, P. K., Khanra, S., Dhamija, P., Sharma, A.,

Kumar, A., & Handu, S. (2021). Role of Structural and Non-Structural Proteins and

Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells* , 10(4).

<https://doi.org/10.3390/cells10040821>

Yan, Y., Chang, L., & Wang, L. (2020). Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and

SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in*

Medical Virology, 30(3), e2106. <https://doi.org/10.1002/rmv.2106>

Anexos

Anexo 1. Complemento de la metodología.

Disoluciones

- H₂O con Dietil Pirocarbonato (DEPC) Inactivado.
- Buffer de Lavados 2X: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 2 M NaCl, H₂O DEPC.
- Buffer de Lavados 1X: 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, H₂O DEPC.
- Disolución A: 0.1 M NaOH en H₂O DEPC, 0.05 M NaCl en H₂O DEPC.
- Disolución B: 0.1 M NaCl en H₂O DEPC.
- B4-BSA: PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ en H₂O DEPC pH 7.4, complementado con BSA 0.01%, filtrada con filtro de 20µm.

Oligonucleótidos

Cuadro 8. Datos generales de oligonucleótidos utilizados en la prueba para el gen E.

Gen E		
Nombre	Tipo	Secuencia 5' - 3'
E-Biot (119 pmol/µL)	cDNA Biotinilado	ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT
E-Fluo (117 pmol/µL)	cDNA Fluorescente	ACG CTA TTA ACT ATT AAC GTA CCT GT
E (118 pmol/µL)	RNA Sintético	ACA GGU ACG UUA AUA GUU AAU AGC GU

Cuadro 9. Datos generales de oligonucleótidos utilizados en la prueba para el gen N.

Gen N		
Nombre	Tipo	Secuencia 5' - 3'
N-Biot (126 pmol/µL)	cDNA Biotinilado	ACT TCC TCA AGG AAC AAC ATT GCC A
N-Fluo (100pmol/µL)	cDNA Fluorescente	TGG CAA TGT TGT TCC TTG AGG AAG T
N (134 pmol/µL)	RNA Sintético	ACU UCC UCA AGG AAC AAC AUU GCC

Nota: En caso de variar el proveedor, la secuencia se conservó, cambiando únicamente la concentración estándar y/o el fluorocromo acoplado.

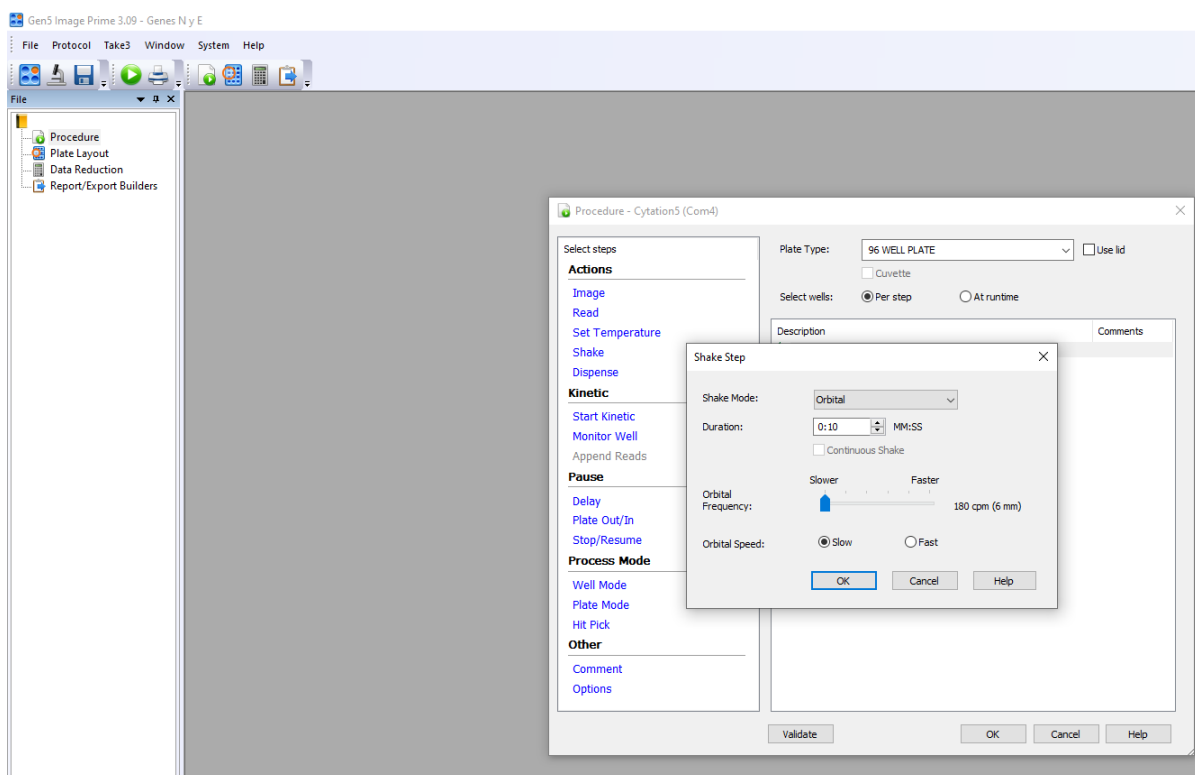
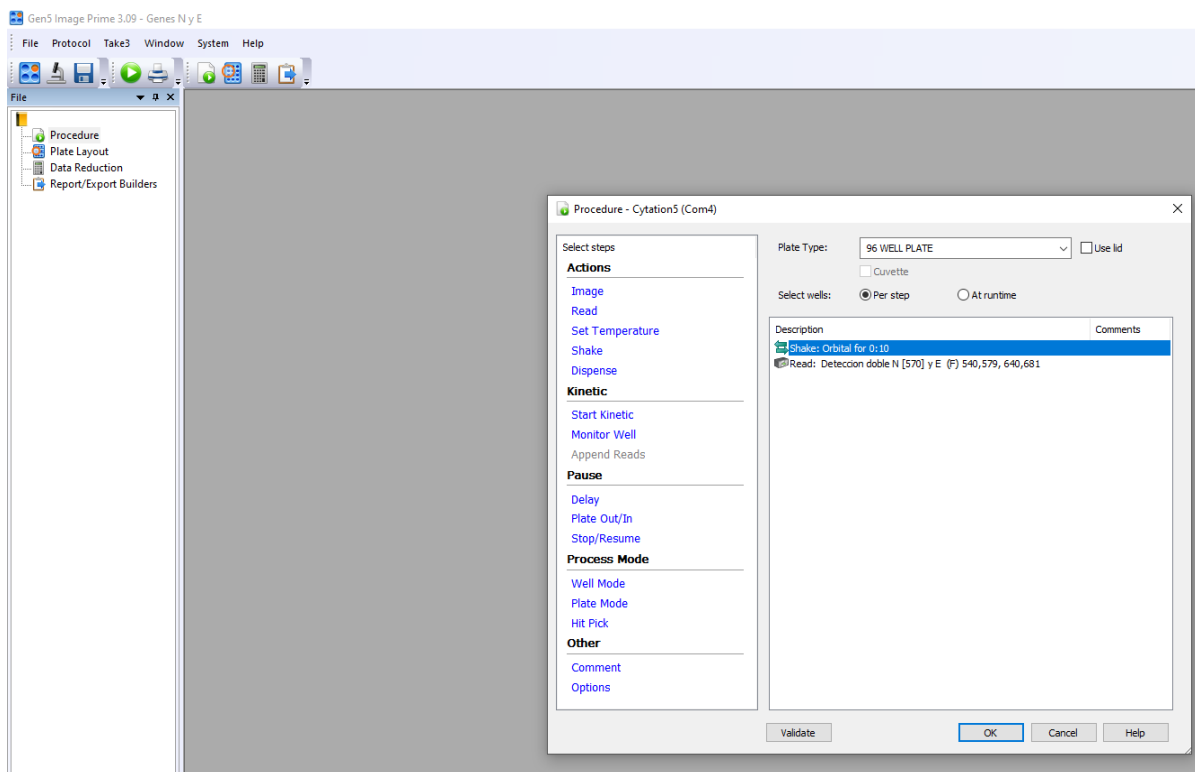
Materiales y reactivos

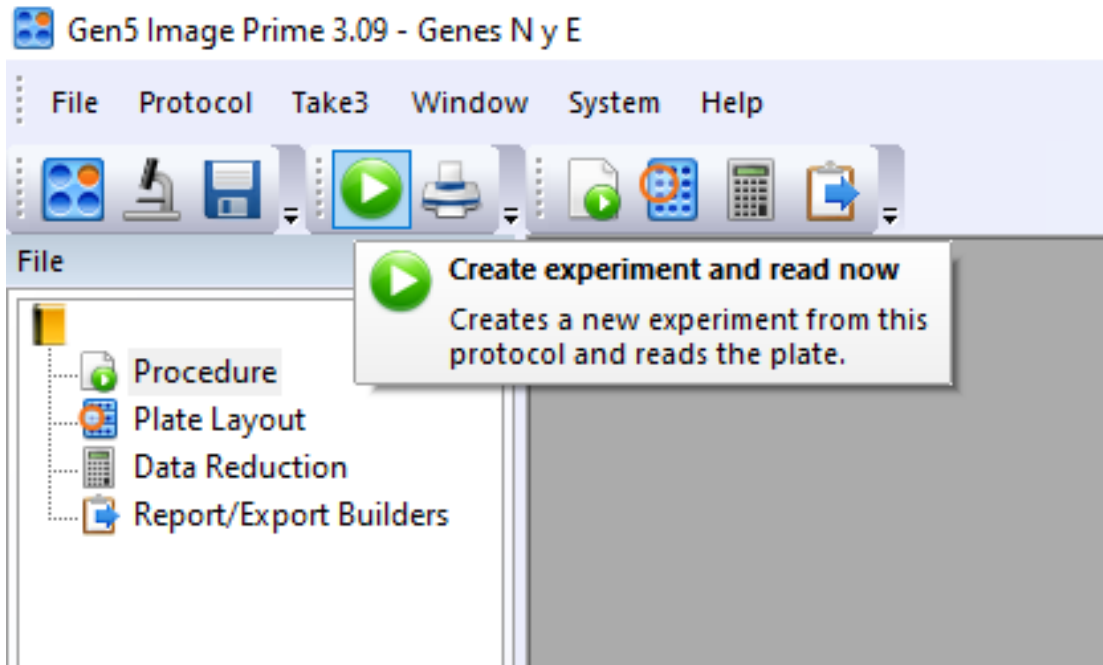
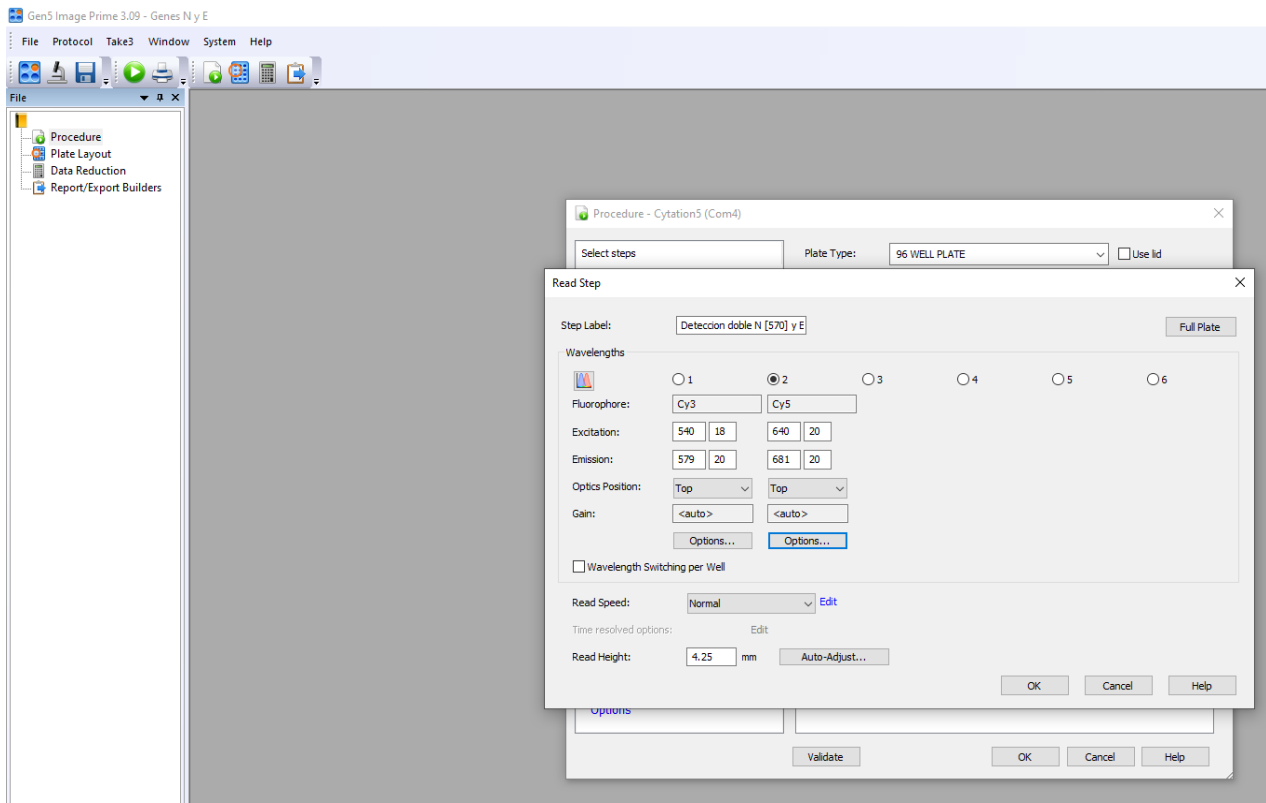
- Dynabeads™ M-270 Streptavidin
- TRIzol™ o DNA/RNA Shield™
- Tubos para microcentrífuga de 1.5mL
- Placa de Elisa de 96 pozos transparente sin recubrimiento, libre de RNAsas (RNase Free)
- Gradillas con imanes
- Reservorios Deep Well 16 mL de 12 columnas
- Base magnética de manejo de perlas magnéticas para placa de ELISA
- Micropipetas de 0.5-10µL; 2-20µL, 20-200µL, 100-1000µL
- Puntas de micropipeta de 10µL y 200µL, de baja retención/RNaseFree
- Puntas de micropipeta de 10µL, 200µL y 1000µL RNaseFree

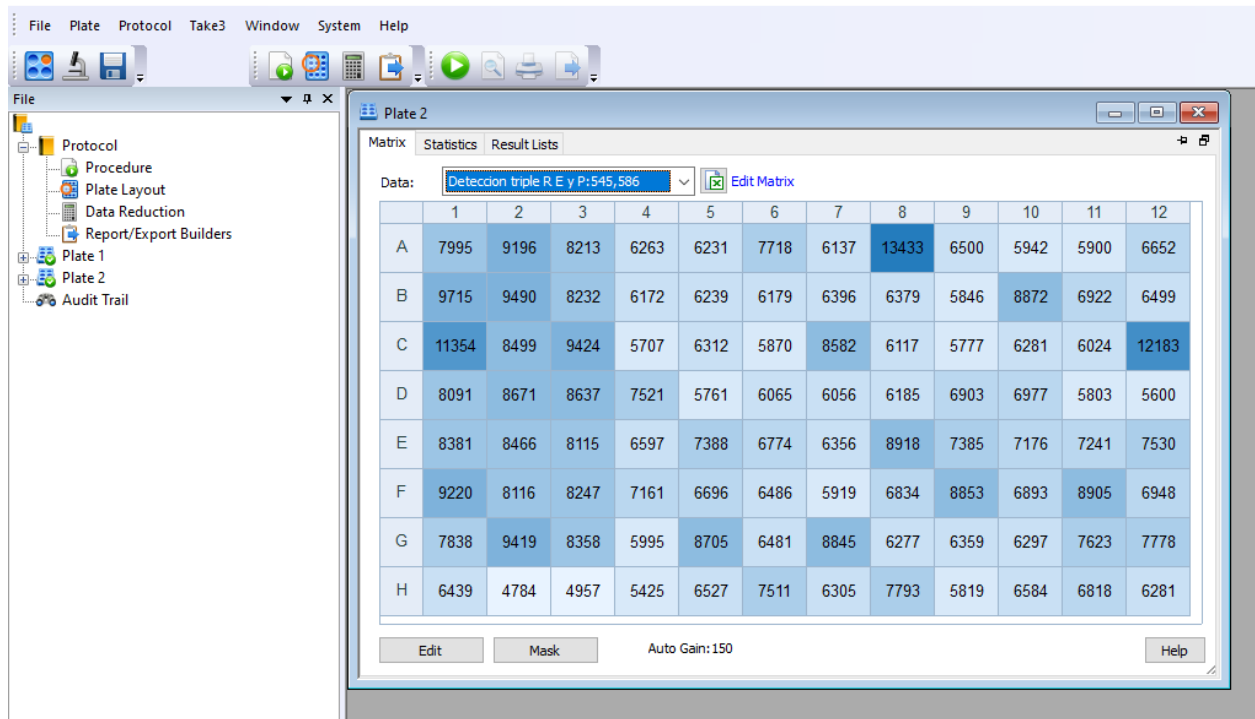
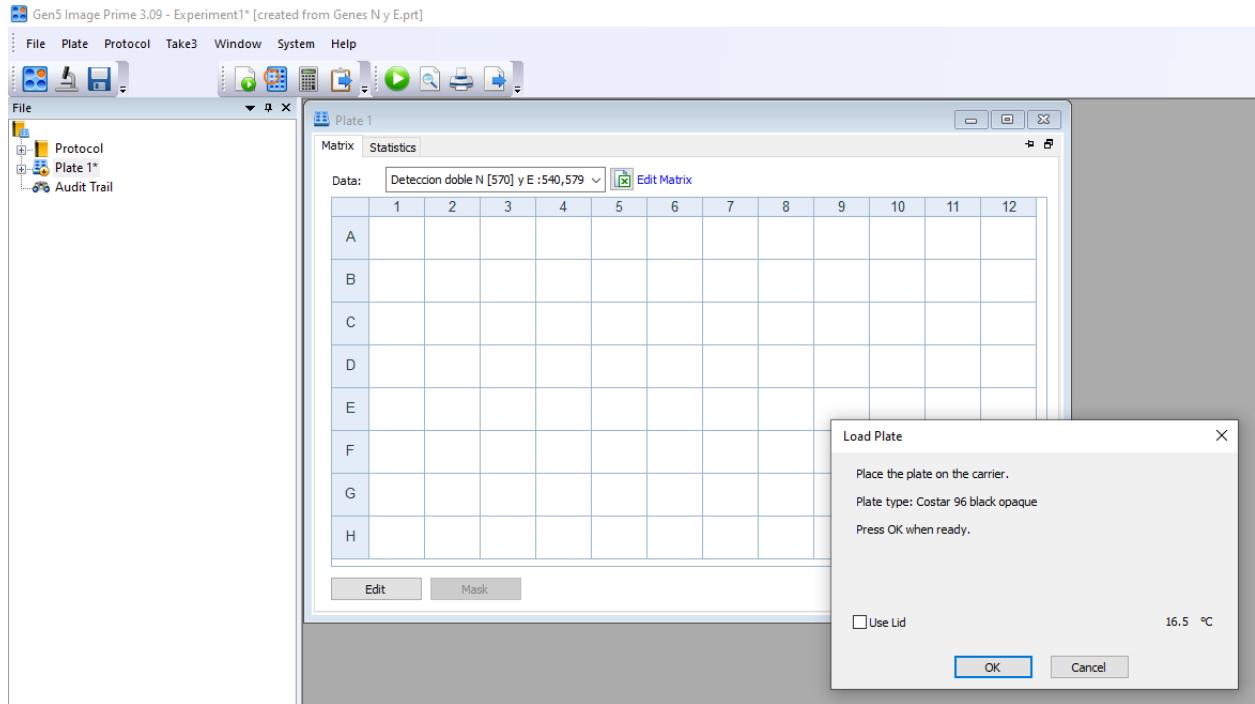
Equipos

- Hulamixer™
- Vórtex
- Centrífuga
- Incubadora (50°C)
- Thermoblock™
- Robot pipeteador Integra™ Viaflo-96, cabezal 15-300 µL
- Campana de Bioseguridad Nivel II
- Lector de placas Fluoroskan™ y Cytation5™

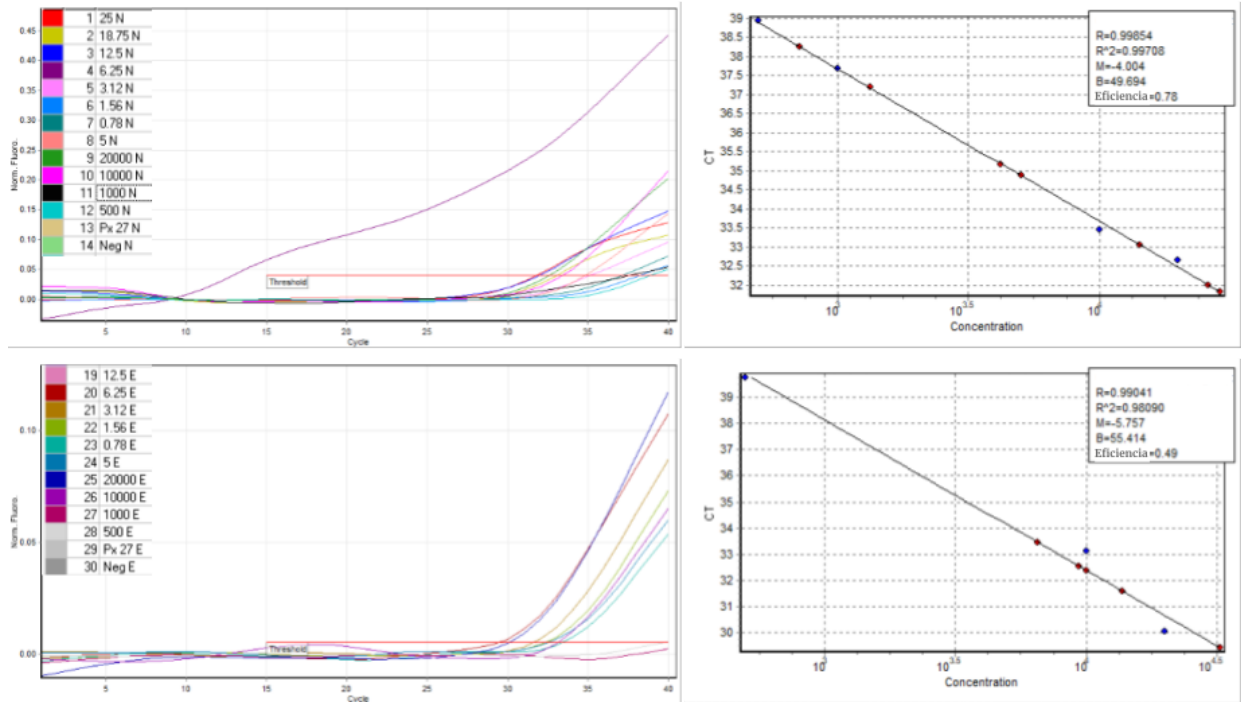
Anexo 2. Medición de fluorescencia con el software Gen 5.0™ y el equipo Cytation5™







Anexo 3. Estimación de la equivalencia de pmol a copias virales (CV) del genoma de SARS-CoV-2.



Gen N					
Nombre	Tipo	CT	Concentración esperada (CV/uL)	Concentración medida (CV/uL)	% Error
20000 N	Estándar	32.65	4000	3605	9.90%
10000 N	Estándar	33.46	2000	2269	13.50%
1000 N	Estándar	37.67	200	201	0.70%
500 N	Estándar	38.94	100	97	2.90%
25 N	Muestra	31.83		5806	
18.75 N	Muestra	33.06		2850	
12.5 N	Muestra	32		5248	
6.25 N	Muestra	-		-	
3.12 N	Muestra	35.18		843	
1.56 N	Muestra	38.26		143	
0.78 N	Muestra	37.18		266	
5 N	Muestra	34.88		1005	

Gen E					
Nombre	Tipo	CT	Concentración esperada (CV/uL)	Concentración medida (CV/uL)	% Error
20000 E	Estándar	30.05	4000	5092	27.30%
10000 E	Estándar	33.13	2000	1486	25.70%
1000 E	Estándar	-	200	-	-
500 E	Estándar	39.74	100	106	5.70%
12.5 E	Muestra	29.84		5539	
6.25 E	Muestra	29.44		6500	
3.12 E	Muestra	31.6		2746	
1.56 E	Muestra	32.37		2016	
0.78 E	Muestra	33.45		1306	
5 E	Muestra	32.54		1881	

Anexo 4. Análisis de estabilidad de funcionalización y ejemplo visual de la detección.

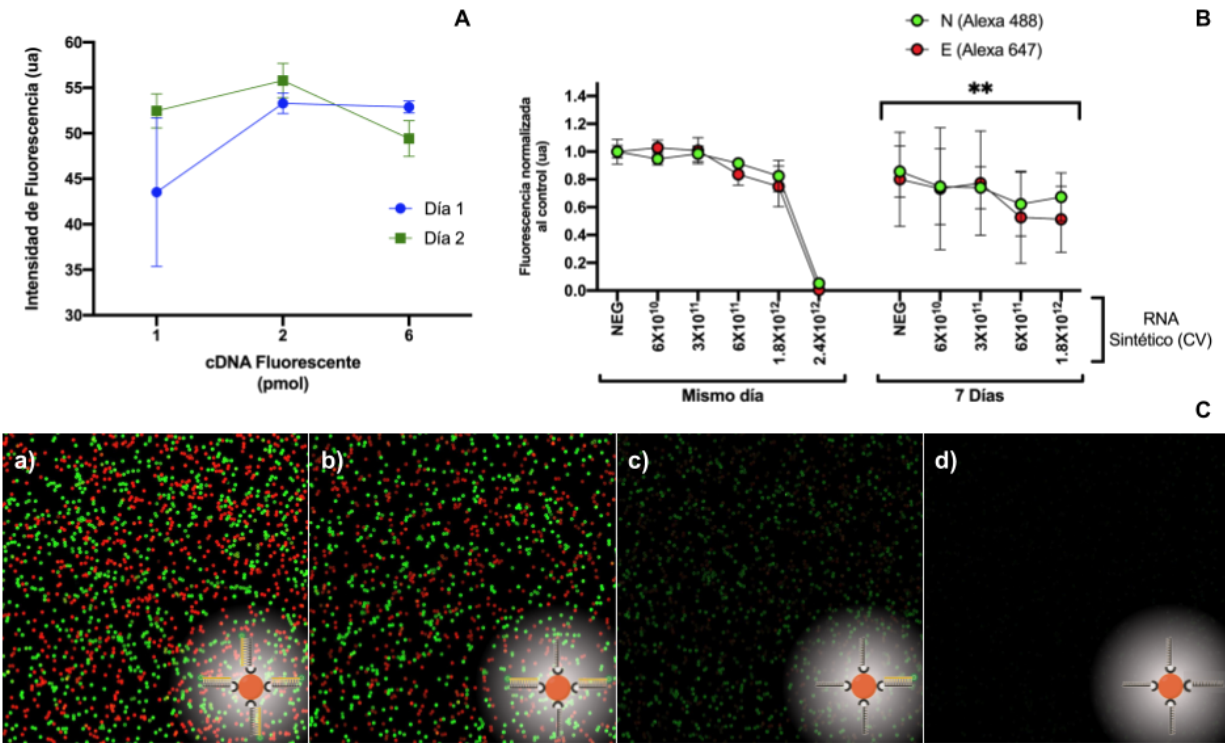


Figura Complementaria 1. Pruebas de estabilidad de la funcionalización.

A) Formación de la unión biotina-estreptavidina interrumpiendo el método experimental (\pm SD): Día 1. Funcionalización completa en un día (Azul); Día 2. Funcionalización en dos días (Verde). **B)** Fluorescencia normalizada (considerando el control negativo con un valor igual a 1.0) de la detección (\pm SD) en función de la concentración de RNA sintético equivalente en copias virales (CV), con perlas magnéticas funcionalizadas el mismo día (izquierda) y 7 días después de la funcionalización (derecha). Tanto en el gen N (Verde) como en el gen E (Rojo), el análisis estadístico t de student (IC=95%; n=3, \pm SD) muestra diferencias significativas entre los puntos a los 7 días con respecto a los puntos al mismo día (** $P < 0.01$) incluyendo al control negativo (NEG, equivalente al control de la mayor hibridación entre la sonda fluorescente y el cDNA unido a las perlas magnéticas funcionalizadas). **C)** Imágenes ejemplo de: a) Control negativo (NEG), b) Mismo día, 6×10^{11} CV, c) 7 Días, 6×10^{11} CV, d) Mismo día, 2.4×10^{12} CV, resultado equivalente a un control positivo. Las fotografías fueron capturadas a través del Cytation5™.

Anexo 5. Cálculo de pendientes para la comparación de curvas con concentración variable de cDNA-fluorescente y RNA Shield™.

Cuadro 10. Análisis de regresión lineal simple de los datos ajustados al blanco de la figura 7A.

RNA Sintético (pmol)	cDNA-fluorescente (pmol)							
	Gen N				Gen E			
	2.6	2	1.4	2+RNA Shield™	2.6	2	1.4	2+RNA Shield™
0.0	27926.70	21116.21	23985.88	26578.10	18548.55	14606.06	15998.47	17915.42
0.1	26095.40	19457.15	24165.69	24220.91	20260.52	11306.38	15379.35	14496.83
0.5	25420.88	20072.36	24478.87	23175.16	16763.52	7751.33	13965.12	12160.44
1.0	23088.99	17943.69	20027.97	21565.15	13403.60	7949.44	9180.82	9528.25
3.0	20108.47	18460.64	17181.53	19087.38	5625.99	4107.75	3356.96	4166.63
5.0	18793.10	17395.37	19734.74	16298.77	9217.26	5286.15	7381.65	7425.24
Pendiente	-1688.13	-544.14	-1126.49	-1766.33	-2378.66	-1502.59	-1996.95	-1930.87
R2	0.89	0.60	0.55	0.91	0.70	0.59	0.62	0.60

Anexo 6. Cálculo de pendientes y de coeficientes de correlación para la comparación de curvas con volumen variable de RNA Shield™.

Cuadro 11. Análisis de regresión lineal simple de los datos ajustados al blanco de la figura 7B.

RNA Sintético (pmol)	Volumen de RNA Shield™ (µL)							
	Gen N				Gen E			
	2.5	5	15	20	2.5	5	15	20
0.0	17019.75	27549.00	27487.42	24811.28	26710.80	36908.32	37863.42	30212.19
0.1	17371.74	25143.00	25498.04	34645.48	22835.34	29581.67	34394.72	32008.26
0.5	19009.33	24559.33	28657.29	28255.05	24128.47	31797.93	41435.50	41824.64
1.0	17086.65	24775.30	22082.38	28564.83	22830.42	23932.72	31006.12	26825.01
3.0	13861.81	16124.16	16372.52	17593.60	9593.32	17159.34	16141.77	15182.11
5.0	11944.46	10674.23	9162.57	10191.16	10218.18	10316.90	13276.88	7814.00
Pendiente	-1227.83	-3256.64	-3664.58	-4050.49	-3470.22	-4706.66	-5458.11	-5559.37
R2	0.88	0.98	0.95	0.85	0.86	0.90	0.87	0.82

Anexo 7. Estudio espectrofotométrico de RNA Shield™, Sol. B y N-Fluo.

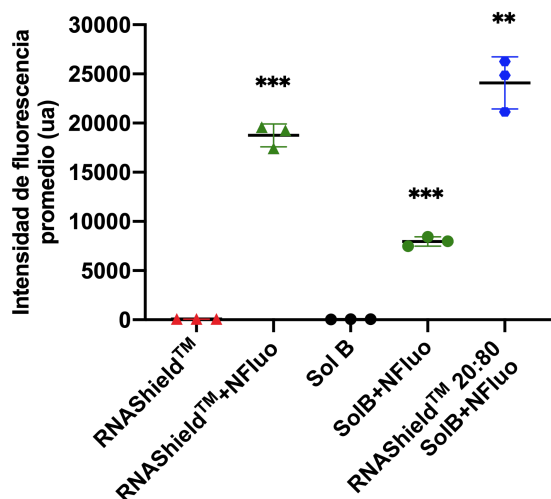


Figura complementaria 2. Análisis espectrofotométrico de las disoluciones presentes en la detección de N-Fluo.

Medición de la fluorescencia en el canal de medición del gen N (488 nm) con 100 µL de cada sustancia. El análisis estadístico t de student (IC=95%; n=3, ± SD) muestra diferencias significativas entre las medias de los puntos de SolB+NFluo respecto a los puntos de RNA Shield™ y Sol. B (**P<0.001); de RNA Shield™+NFluo respecto a SolB+NFluo (**P<0.001) y de RNA Shield™ 20:80 SolB+NFluo contra SolB+NFluo (**P>0.001).

Anexo 8. Cálculo de la concentración de guanidinio presente en la reacción de competencia.

Para el cálculo, se consideró la concentración promedio del guanidinio en el TRIzol™ reportado en la hoja de seguridad de la marca ThermoFisher™.

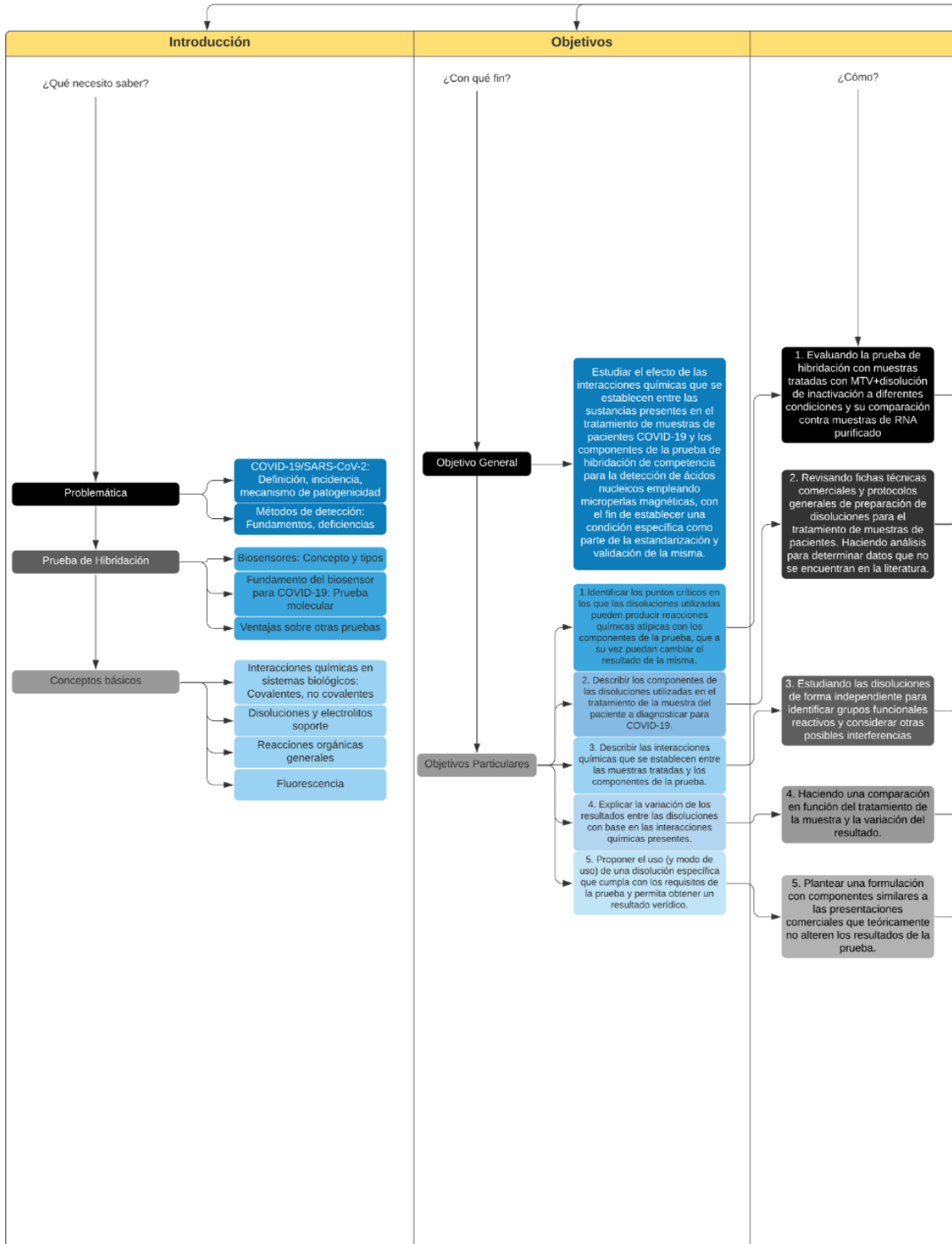
$$\left(\frac{2.5 \mu\text{L TRIzol}^{\text{TM}}}{57.5 \mu\text{L Disolución de Competencia}} \right) \left(\frac{1,075.1 \mu\text{g TRIzol}^{\text{TM}}}{1 \mu\text{L TRIzol}^{\text{TM}}} \right) \left(\frac{13.75 \mu\text{g Guanidinio}}{100 \mu\text{g TRIzol}^{\text{TM}}} \right) \left(\frac{1 \mu\text{mol Guanidinio}}{59.07 \mu\text{g Guanidinio}} \right) = 0.11 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$$

$$\left(\frac{0.11 \mu\text{mol Guanidinio}}{1 \mu\text{L de Disolución de Competencia}} \right) \left(\frac{10^6 \mu\text{L Disolución de Competencia}}{1 \text{ L Disolución de Competencia}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol Guanidinio}}{10^6 \mu\text{mol Guanidinio}} \right) = 0.11 \text{ M}$$

Anexo 9. Diagrama resumen de tesis.

"Estudio de las interacciones químicas presentes en el tratamiento de muestr

¿Qué ocurre químicamente entre las muestras



ras clínicas para el desarrollo y validación de un método para la detección del SARS-CoV-2"

ras clínicas inactivadas y los componentes de la prueba de hibridación?

