



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

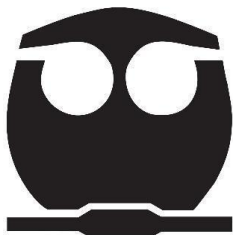
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA POR  
FLUORESCENCIA PARA LA DETECCIÓN DEL  
VIRUS SARS-CoV-2”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO – BIÓLOGO**

**PRESENTA:  
OSWALDO MATA LÓPEZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: MIREYA RODRÍGUEZ PENAGOS**

**VOCAL: ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA**

**SECRETARIO: FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA**

**1<sup>er</sup> SUPLENTE: J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS**

**2<sup>do</sup> SUPLENTE: EUCLIDES AVILA CHÁVEZ**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio de Microscopía y Microdissección Láser, Unidad de Genética Molecular, Edificio Principal, Instituto de Ecología, Ciudad Universitaria.

**ASESOR DEL TEMA:**

DRA. FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

DR. GASTÓN CONTRERAS JIMÉNEZ

**SUSTENTANTE:**

OSWALDO MATA LÓPEZ

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto de Ecología por haberme permitido hacer uso de las instalaciones.

A CONACYT por la beca de estancia posdoctoral otorgada a mi asesora la Dra. Francisca Morayna Gutiérrez Luna y la financiación del proyecto otorgada al Dr. Gastón Contreras Jiménez con la que se realizó este trabajo.

Al Dr. Gastón Contreras Jiménez, encargado del Laboratorio de Microscopía y Microdissección Láser (LabMicroLas) del Instituto de Ecología y responsable del proyecto de investigación, por el apoyo técnico brindado durante mi estancia.

A la Dra. Francisca Morayna Gutiérrez Luna por aceptar ser mi asesora de tesis, proponer parte de la investigación de este trabajo y el apoyo brindado durante mi estancia.

Al Dr. Marco Tulio Solano De la Cruz, responsable de la Unidad de Genética Molecular del Instituto de Ecología, por haberme permitido hacer uso de las instalaciones y el apoyo técnico que me brindó durante mi estancia de investigación.

Al Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera por proponer parte de la investigación del proyecto que dio origen a este trabajo.

Al M. en C. Karel Estrada Guerra por haber diseñado los oligos específicos de las secuencias del genoma del SARS-CoV-2 que usé en este trabajo.

A la Dra. María del Rocío Cruz Ortega y a la M. en C. Verónica Monserrat Rodríguez Sánchez por el apoyo con reactivos para la realización de este trabajo y el apoyo técnico brindado durante mi estancia de investigación.

A la M. en C. Mireya Rodríguez Penagos y Dra. Rocio Gabriela Tirado Mendoza por sus valiosas aportaciones para la mejora del presente trabajo.

A toda mi familia: mamá, abuela, tío y tías por todo su apoyo a lo largo de mi vida.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	6
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	8
<b>ÍNDICE DE FIGURAS EN ANEXOS</b> .....	9
<b>ÍNDICE DE TABLAS EN ANEXOS</b> .....	9
<b>ABREVIATURAS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
1.1. Coronavirus.....	13
1.1.1. Morfología .....	13
1.1.2. Clasificación .....	15
1.2. Coronavirus humanos (HCoV).....	16
1.2.1. SARS-CoV-2 .....	16
1.2.2. Patogénesis.....	17
1.3. Métodos de diagnóstico para la detección del virus SARS-CoV-2.....	18
1.3.1. Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) empleadas para detectar el virus SARS-Cov-2 .....	18
1.3.2. Pruebas serológicas para la detección de antígenos y anticuerpos anti-SARS-CoV-2	21
1.4. Métodos de purificación de ácidos nucleicos para su posterior uso en las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT). .....	23
1.4.1. Purificación de ácidos nucleicos mediante nanopartículas magnéticas.....	24
1.5. Detección de los productos amplificados por PCR en las pruebas NAAT.....	26
1.5.1. Fluorescencia .....	26
1.5.2. Microscopía de Epifluorescencia .....	27
1.6. Fluoróforos utilizados en el marcaje de oligonucleótidos o nucleótidos (bioconjugación).....	29
1.6.1. Estrategias para el marcaje de oligonucleótidos/nucleótidos. ....	30
1.7. Química “click” .....	30
1.7.1. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar azida/alquino catalizada con cobre(I) (CuAAC) .....	31
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	33
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	36
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	36
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
5.1. Diagrama de flujo .....	37

5.2.	Secuencias sintéticas de DNA de Betacoronavirus (BC) y SARS-CoV-2 (SC2) para la reacción de PCR. ....	37
5.3.	Oligonucleótidos BC_p4_KEG, SC2_p2_KEG, SC2_p3_KEG y SC2_p4_KEG para la reacción de PCR. ....	38
5.4.	Mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) para la reacción de PCR... ..	39
5.5.	Mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) con el nucleótido EdU para la reacción de PCR. ....	39
5.6.	Obtención de las secuencias de DNA sintético de BC y SC2 con el nucleótido EdU, secuencias control de BC y SC2 sin EdU, y muestra sin DNA.....	40
5.7.	Análisis del producto de DNA amplificado, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. ....	41
5.7.1.	Preparación del buffer de carga.....	41
5.7.2.	Preparación del marcador de peso molecular (MPM). ....	41
5.8.	Inmovilización del DNA amplificado en nanopartículas magnéticas. ....	42
5.9.	Detección del nucleótido EdU incorporado al DNA amplificado de BC y SC2 empleando el fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-Azida mediante química “click” .....	43
5.9.1.	Preparación del fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina (cumarina) .....	44
5.10.	Visualización mediante microscopía óptica y microscopía epifluorescente .....	44
6.	<b>RESULTADOS</b> .....	45
6.1.	Condiciones de amplificación de las secuencias de DNA.....	45
6.2.	Inmovilización de los productos amplificados por PCR en nanopartículas magnéticas.....	50
6.3.	Detección del nucleótido EdU en las secuencias de Betacoronavirus y SARS-CoV-2 mediante el fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-azida .....	64
6.4.	Detección del nucleótido EdU en las secuencias de Betacoronavirus y SARS-CoV-2 mediante el fluoróforo Cumarina .....	85
7.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	96
8.	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	98
9.	<b>REFERENCIAS</b> .....	99
10.	<b>ANEXO</b> .....	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de un virión de coronavirus y sus proteínas estructurales. ....	14
<b>Figura 2.</b> Genoma del coronavirus SARS-CoV-2.....	14
<b>Figura 3.</b> Clasificación taxonómica de los coronavirus de acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). ....	15
<b>Figura 4.</b> Inmunopatogénesis iniciada por la replicación del SARS-CoV-2 en las vías respiratorias inferiores.....	18
<b>Figura 5.</b> Ilustración del principio de la reacción RT-PCR.....	19
<b>Figura 6.</b> Ilustración del mecanismo de la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).....	20
<b>Figura 7.</b> Ilustración de los inmunoensayos de flujo lateral.....	21
<b>Figura 8.</b> Componentes de una nanopartícula magnética (MNP). ....	24
<b>Figura 9.</b> Tipos principales de interacciones entre el DNA y las nanopartículas magnéticas. ....	25
<b>Figura 10.</b> Diagrama de Jablonski que ilustra los procesos involucrados en el fenómeno de fluorescencia.....	27
<b>Figura 11.</b> Trayectoria del rayo de luz en un microscopio de epifluorescencia. ....	28
<b>Figura 12.</b> Fluoróforos orgánicos Rodamina y Cumarina.....	29
<b>Figura 13.</b> Reacciones de tipo “click”.....	31
<b>Figura 14.</b> Reacción de Huisgen. ....	31
<b>Figura 15.</b> Reacción de cicloadición alquino-azida catalizada por cobre (I) (CuAAC).....	32
<b>Figura 16.</b> Tipos de pruebas para el diagnóstico de la enfermedad de COVID-19. ....	33
<b>Figura 17.</b> Selección del tipo de prueba de diagnóstico apropiada de acuerdo con la progresión de la infección por SARS-CoV-2. ....	34
<b>Figura 18.</b> Pruebas de diagnóstico realizadas en relación con el tamaño de la población.....	35
<b>Figura 19.</b> Diagrama de flujo de la metodología empleada en este trabajo. ....	37
<b>Figura 20.</b> Imagen que ejemplifica la distribución de las muestras en un gel para realizar el análisis de los productos amplificados por PCR en el gel de agarosa al 2%. ....	42
<b>Figura 21.</b> Amplificación mediante PCR con 25 ciclos de las secuencias de DNA de BC y SC2 a una Ta de 68°C.....	47
<b>Figura 22.</b> PCR de 25, 20, 10 y 1 ciclos de las secuencias de DNA de BC_p4 y SC2_p3.....	48
<b>Figura 23.</b> PCR de 25, 20, 10 y 1 ciclos de las secuencias de DNA de BC_p4 y SC2_p4.....	48
<b>Figura 24.</b> PCR 1 ciclo de las secuencias de DNA de BC_p4 y SC2_p2.....	49
<b>Figura 25.</b> PCR de 1 ciclo de las secuencias de DNA de BC_p4 y SC2_p3 modificando la extensión final.....	50

<b>Figura 26.</b> Ejemplo de la visualización de las nanopartículas magnéticas con el DNA amplificado inmovilizado. ....	52
<b>Figura 27.</b> Detección mediante epifluorescencia del DNA marcado de BC_p4 y SC2_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas (dilución 1/100).....	53
<b>Figura 28.</b> Detección del DNA marcado de BC_p4 y SC2_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas (dilución 1/50).....	55
<b>Figura 29.</b> Detección del DNA marcado de BC_p4 y SC2_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas.....	57
<b>Figura 30.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las muestras recuperadas de los lavados.....	59
<b>Figura 31.</b> Detección mediante epifluorescencia del DNA marcado de BC_p4 y SC2_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas.....	61
<b>Figura 32.</b> Detección del DNA marcado de BC_p4 y SC2_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas.....	63
<b>Figura 33.</b> Reacción “click” para el marcaje de EdU incorporado en las secuencias de DNA con el fluoróforo TAMRA.....	65
<b>Figura 34.</b> Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la detección del DNA marcado de BC_p4 y SC2_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas.....	68
<b>Figura 35.</b> Detección mediante microscopía de epifluorescencia del DNA marcado con TAMRA de BC_p4 y SC2_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas.. ....	70
<b>Figura 36.</b> Detección del DNA marcado con TAMRA de BC_p4 y SC2_p3. ....	72
<b>Figura 37.</b> Detección del DNA marcado con TAMRA de BC_p4 y SC2_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas.....	74
<b>Figura 38.</b> Imágenes de epifluorescencia de la detección del DNA de BC_p4 y SC2_p4 adsorbido a nanopartículas magnéticas y marcado con el fluoróforo TAMRA.....	76
<b>Figura 39.</b> Detección mediante microscopía de epifluorescencia del DNA marcado con TAMRA de BC_p4 y SC2_p4 adsorbido a nanopartículas magnéticas. ....	78
<b>Figura 40.</b> Detección del DNA marcado de BC_p4 y SC2_p4 adsorbido a nanopartículas magnéticas.....	80
<b>Figura 41.</b> Detección del DNA marcado con el fluoróforo TAMRA de BC_p4 y SC2_p4 adsorbido a nanopartículas magnéticas.....	82
<b>Figura 42.</b> Imágenes de microscopía de epifluorescencia de las muestras de DNA de BC_p4 y SC2_p4 marcado con TAMRA después de los lavados con agua libre de nucleasas.....	84
<b>Figura 43.</b> Reacción “click” para el marcaje de EdU incorporado en las secuencias de DNA con el fluoróforo cumarina.....	86
<b>Figura 44.</b> Ensayos de concentración para la detección del fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina (cumarina).....	87
<b>Figura 45.</b> Detección mediante microscopía de epifluorescencia del DNA marcado con cumarina de BC_p4 y SC2_p2 adsorbido a nanopartículas magnéticas. ....	90
<b>Figura 46.</b> Imágenes de microscopía de epifluorescencia para la detección del DNA de BC_p4 y SC2_p2 adsorbido a nanopartículas magnéticas marcado con cumarina.....	92



<b>Figura 47.</b> Detección del DNA marcado de BC_p4 y SC2_p2 adsorbido a nanopartículas magnéticas.....	94
--	----

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tipos de metodologías empleadas en la detección de SARS-CoV-2..	22
<b>Tabla 2.</b> Concentración de DNA control de las secuencias de Betacoronavirus y SARS-CoV-2.....	38
<b>Tabla 3.</b> Secuencia de los oligonucleótidos y su respectiva temperatura de fusión (T <sub>m</sub> ).....	38
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos usados para la reacción de PCR. Datos de las concentraciones de los diferentes oligos usadas para realizar los ensayos de PCR. ....	38
<b>Tabla 5.</b> Preparación de los oligos para la reacción de PCR.....	39
<b>Tabla 6.</b> Componentes para la reacción de PCR..	40
<b>Tabla 7.</b> Condiciones del termociclador para la reacción de PCR. ....	40
<b>Tabla 8.</b> Componentes de la solución de marcaje con el fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-azida.....	43
<b>Tabla 9.</b> Tamaño de los fragmentos amplificados por PCR.....	46
<b>Tabla 10.</b> Cantidad de nanopartículas empleadas para las secuencias de BC_p4 y SC2_p3.....	51
<b>Tabla 11.</b> Cantidad de nanopartículas empleadas para las secuencias BC_p4 y SC2_p4.....	51
<b>Tabla 12.</b> Cantidad de nanopartículas empleadas para las secuencias BC_p4 y SC2_p2.....	51
<b>Tabla 13.</b> Concentraciones del fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-Azida utilizadas para los experimentos con las secuencias de DNA de BC_p4 y SC2_p3.....	66
<b>Tabla 14.</b> Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación de las secuencias de SC2_p2 y BC_p4.....	87
<b>Tabla 15.</b> Componentes de la solución de marcaje con el fluoróforo 3-azido-7-hidroxicumarina. ....	88
<b>Tabla 16.</b> Componentes de la solución de marcaje con el fluoróforo 3-azido-7-hidroxicumarina para una concentración final de 1 mM. ....	91
<b>Tabla 17.</b> Comparación de los tiempos requeridos en cada paso de la metodología empleando los fluoróforos TAMRA y Cumarina. ....	95

## ÍNDICE DE FIGURAS EN ANEXOS

<b>Figura 1S.</b> Espectro de Fluorescencia de TAMRA.....	107
<b>Figura 2S.</b> Espectro de Fluorescencia de Cumarina.....	107
<b>Figura 3S.</b> Región del genoma de SARS-CoV-2 que se amplifica con los oligos FW y RV de BC_p4, empleados en este trabajo. ....	108
<b>Figura 4S.</b> Región del genoma de SARS-CoV-2 que se amplifica con los oligos FW y RV de SC_p2 empleados en este trabajo. ....	109
<b>Figura 5S.</b> Región del genoma de SARS-CoV-2 que se amplifica con los oligos FW y RV de SC_p3 empleados en este trabajo. ....	110
<b>Figura 6S.</b> Región del genoma de SARS-CoV-2 que se amplifica con los oligos FW y RV de SC_p4 empleados en este trabajo. ....	111

## ÍNDICE DE TABLAS EN ANEXOS

<b>Tabla 1S.</b> Cálculo teórico del número de moléculas de DNA de BC_p4 en los ciclos de PCR.....	105
<b>Tabla 2S.</b> Cálculo teórico del número de moléculas de DNA de SC2_p2 en los ciclos de PCR.....	105
<b>Tabla 3S.</b> Cálculo teórico del número de moléculas de DNA de SC2_p3 en los ciclos de PCR.....	106
<b>Tabla 4S.</b> Cálculo teórico del número de moléculas de DNA de SC2_p4 en los ciclos de PCR.....	106

## ABREVIATURAS

<b>ACE2</b>	Enzima Conversiva de Angiotensina II	<b>MERS-CoV</b>	Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio
<b>AEC2</b>	Células Epiteliales Alveolares Tipo II	<b>MIP1<math>\alpha</math></b>	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$
<b>BC</b>	Betacoronavirus	<b>MIP1<math>\beta</math></b>	Proteína inflamatoria de macrófagos 1- $\beta$
<b>CCD</b>	Dispositivo de carga acoplada	<b>MNP</b>	Nanopartículas magnéticas
<b>CDC</b>	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades	<b>MPM</b>	Marcador de peso molecular
<b>cDNA</b>	DNA complementario	<b>NAAT</b>	Pruebas de amplificación de ácido nucleico
<b>CoV</b>	Coronavirus	<b>NSP</b>	Proteínas no estructurales
<b>COVID-19</b>	Enfermedad por coronavirus 2019	<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>CsCl</b>	Cloruro de cesio	<b>ORF1ab</b>	Marco abierto de lectura 1ab
<b>Cu (I)</b>	Cobre I	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>CuAAC</b>	Cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre	<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>DAMP</b>	Patrones moleculares asociados a daños	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>rpm</b>	Revolución por minuto
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótidos trifosfatos	<b>RTC</b>	Complejo de replicación-transcripción
<b>EdU</b>	5-etinil-2'-desoxiuridina	<b>RT-LAMP</b>	Amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima	<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

<b>EtBr</b>	Bromuro de etidio	<b>SARS-CoV</b>	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave
<b>HCoV</b>	Coronavirus humano	<b>SARS-CoV-2</b>	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave tipo 2
<b>IBV</b>	Virus de la bronquitis infecciosa	<b>SC2</b>	SARS-CoV-2
<b>ICTV</b>	Comité Internacional de Taxonomía de Virus	<b>SDRA</b>	Síndrome de dificultad respiratoria aguda
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma	<b>ssDNA</b>	DNA monocatenario
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G	<b>Ta</b>	Temperatura de alineamiento
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M	<b>TAMRA</b>	Carboxitetrametilrodamina
<b>IL-6</b>	Interleucina-6	<b>TC</b>	Tomografía Computarizada
<b>IP-10</b>	Proteína-10 inducible por interferón gamma	<b>Tm</b>	Temperatura de fusión
<b>MCP1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos 1		

## RESUMEN

El SARS-CoV-2 es un nuevo virus, identificado a finales de 2019, que pertenece a la familia de los *Coronavirus* y causa la enfermedad COVID-19, cuyos síntomas pueden variar de muy leves a graves. Debido a la rápida propagación del SARS-CoV-2 el 11 de marzo de 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) decidió considerarlo como una pandemia.

Durante la emergencia sanitaria, las estrategias de salud pública para la detección del virus se basaron en pruebas de diagnóstico que permitieron detectar y aislar a los pacientes infectados con el objetivo de contener la transmisión viral. Los dos tipos de pruebas de diagnóstico más usadas son: 1) Pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y 2) Pruebas de antígeno o pruebas rápidas. Aunque estas pruebas de diagnóstico permitieron controlar la pandemia en su momento, tenían algunas desventajas como el costo y el tiempo de procesamiento (de 4 a 6 horas) en el caso de la RT-PCR, por otra parte, las pruebas rápidas son menos sensibles y específicas especialmente en muestras de pacientes asintomáticos, estas características hicieron evidente la necesidad de desarrollar nuevas metodologías.

En este trabajo se desarrolló una metodología, comparable a una RT-PCR y mejorada en términos de rapidez. Utilizando secuencias sintéticas de DNA de SARS-CoV-2 (SC2\_p2\_KEG\_Ext y SC2\_p3\_KEG\_Med; gen proteína S, SC2\_p4\_KEG\_Med; gen ORF1ab) y Betacoronavirus (BC\_p4\_KEG\_Med; gen ORF1ab), en las que el nucleótido timidina fue reemplazado por un análogo: la molécula 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU), durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con este reemplazo se realizó el marcaje empleando dos fluoróforos: 5-TAMRA-PEG3-azida (TAMRA) y 3-azido-7-hidroxicumarina (cumarina), mediante una reacción "click". Posteriormente, el producto se adhirió a nanopartículas magnéticas (MNP) para facilitar su detección mediante microscopía de epifluorescencia. Con esta metodología se logró determinar la presencia del DNA sintético del virus en ensayos de PCR de 1 ciclo al usar ambos fluoróforos en aproximadamente 2 horas en el caso de TAMRA y 1 hora 40 minutos usando el fluoróforo cumarina.

## 1. INTRODUCCIÓN

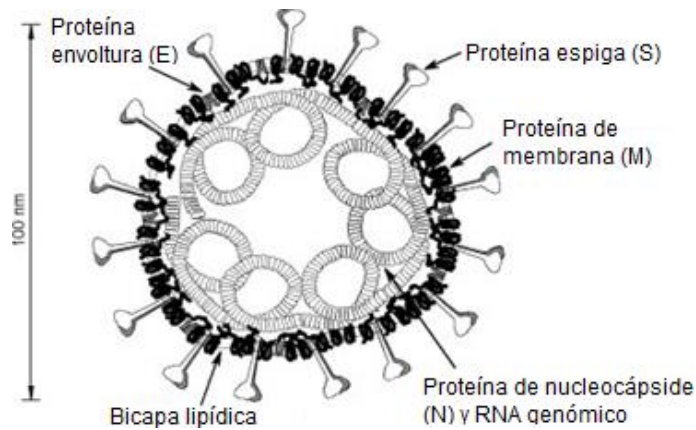
### 1.1. Coronavirus

El primer reporte de los coronavirus (CoV) se realizó en la década de 1930, cuando Baudette y Hudson describieron una infección respiratoria grave presente en pollos causada por el virus de la bronquitis infecciosa (IBV). Años más tarde, en 1965, Tyrrell y Bynoe descubrieron el primer coronavirus patógeno para los humanos al que denominaron B814, el cual fue aislado de un adulto con síntomas de resfriado común. A partir de estos descubrimientos, se han identificado otros tipos circulantes de coronavirus como el virus de la hepatitis del ratón y el coronavirus humano 229E (HCoV-229E). Este grupo de virus presenta una morfología similar cuando se observan bajo el microscopio electrónico, en los que destacan las proyecciones en forma de picos que corresponden a la proteína espiga (S) y que dan a las partículas del virus la apariencia de una corona, debido a esto, en 1968 fueron designados con el nombre de Coronavirus. Posteriormente en 1975, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) nombró la nueva familia de coronavirus como *Coronaviridae*<sup>1</sup>.

La familia *Coronaviridae*, se caracteriza por infectar a humanos y otros mamíferos, incluido ganado y animales de compañía; además de algunas especies de aves, causando enfermedades respiratorias y/o entéricas de carácter agudo o persistente y de diversa gravedad. Por lo tal razón, no solo representan un desafío para la salud pública, sino también una preocupación veterinaria y económica<sup>2</sup>.

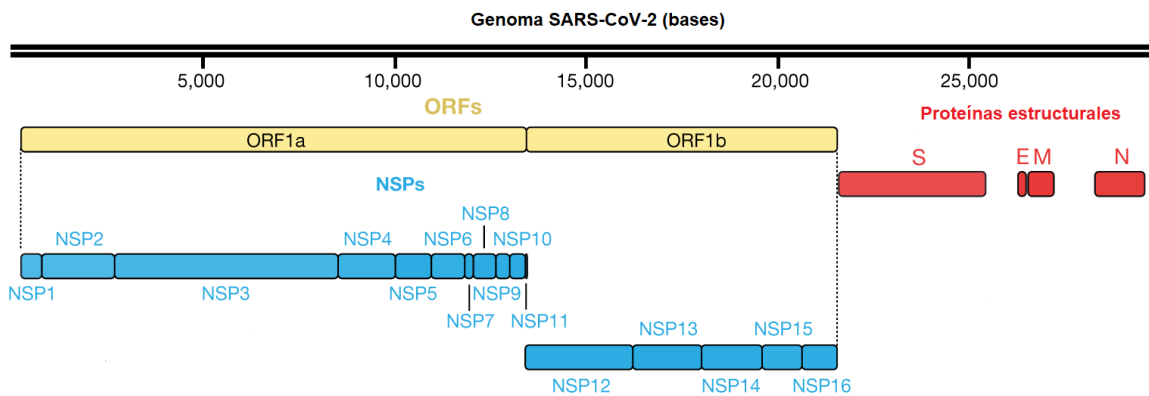
#### 1.1.1. Morfología

Los coronavirus (Fig. 1) son virus envueltos de 80 a 220 nm de tamaño, de forma esférica, que poseen un genoma de RNA de cadena sencilla y sentido positivo de aproximadamente 26 a 32 kilobases<sup>3,4</sup>.



**Figura 1.** Estructura de un virión de coronavirus y sus proteínas estructurales. Tomado y modificado de Masters, P. (2006)<sup>3</sup>.

El genoma viral (Fig. 2) codifica a 16 proteínas no estructurales (NSP 1-16) y 4 proteínas estructurales que son la proteína S, la proteína de la nucleocápside (N), la proteína de membrana (M) y la proteína de envoltura (E); en conjunto, todas estas proteínas son necesarias para la producción de un virión<sup>4,5</sup>.



**Figura 2.** Genoma del coronavirus SARS-CoV-2. Tomado y modificado de Gordon, D. et al., (2020)<sup>5</sup>.

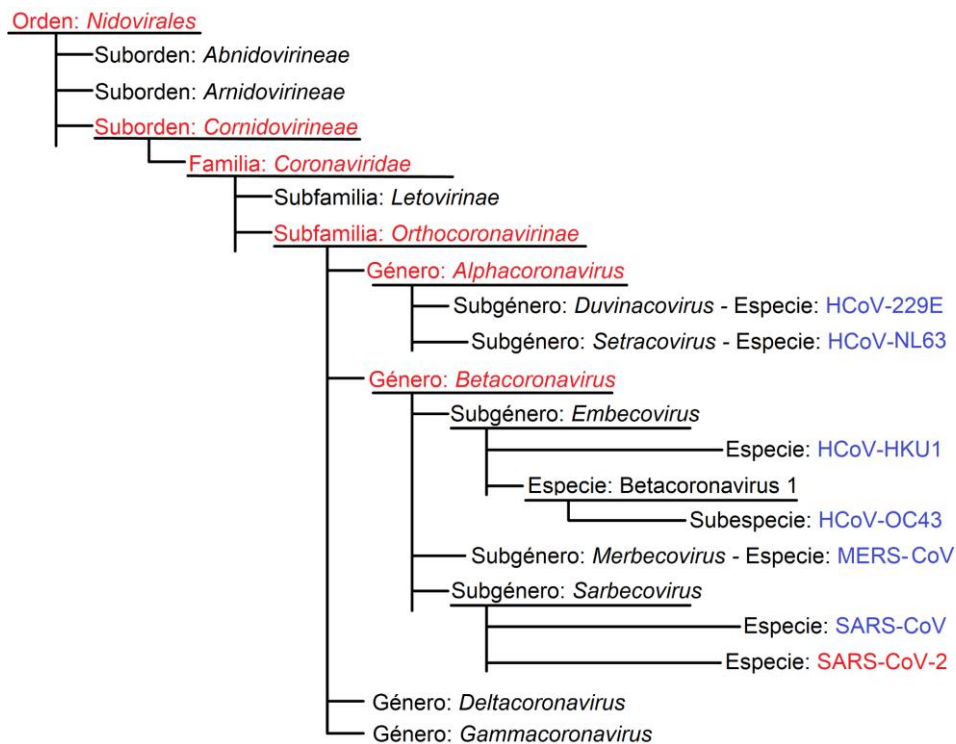
La proteína S es una proteína homotrimérica que sobresale de la superficie del virus, su función es mediar la unión del virus con el receptor y la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula blanco. La proteína M se asocia con otras proteínas estructurales, incluida la nucleocápside, para facilitar el ensamblaje molecular de las partículas virales, además de estar involucrada en la patogénesis viral. La proteína E, la más pequeña entre todas las proteínas estructurales, desempeña un papel importante en el ensamblaje, la liberación y patogénesis del virus. Por último, la proteína N participa en la organización y empaquetamiento del

genoma viral, también facilita el ensamblaje del virión y mejora la eficiencia de la transcripción del virus, entre otras cosas<sup>4</sup>.

Por otra parte, las proteínas no estructurales (NSPs) componen el complejo de replicación y transcripción (RTC) que desempeña un papel importante en la síntesis y el procesamiento del RNA, además de mantener su integridad, lo que ayuda a la supervivencia del virus<sup>4,5</sup>.

### 1.1.2. Clasificación

Mediante estudios filogenéticos, los coronavirus (CoV) se han clasificado dentro del orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Orthocoronavirinae*; esta última se divide en cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (Fig. 3)<sup>4</sup>.



**Figura 3.** Clasificación taxonómica de los coronavirus de acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). Tomado de <https://thenativeantigencompany.com/the-endemic-coronaviruses-and-what-they-might-tell-us-about-covid-19/>



Los géneros alfa y betacoronavirus infectan principalmente a los mamíferos, mientras que los gammacoronavirus infectan a las aves y los deltacoronavirus infectan tanto a mamíferos como a aves<sup>4</sup>.

## **1.2. Coronavirus humanos (HCoV)**

Hasta la fecha, se han identificado siete diferentes tipos de coronavirus que son patógenos para los humanos, conocidos como coronavirus humanos (Human Coronaviruses, HCoV) pertenecientes a los géneros Alphacoronavirus y Betacoronavirus. En el género Alphacoronavirus se encuentran los HCoVs 229E y NL63; mientras que el género Betacoronavirus incluye los HCoVs OC43, HKU1, el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y el nuevo coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave tipo 2 (SARS-CoV-2), surgido a finales de 2019<sup>1,6,7</sup>.

Generalmente estos virus causan enfermedades leves a moderadas del tracto respiratorio superior, con síntomas similares al resfriado común. Sin embargo, en los últimos años se ha vuelto cada vez más evidente que los HCoV especialmente del género *Betacoronavirus* pueden desarrollar patologías respiratorias graves como bronquitis, neumonía e incluso el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), los cuales pueden ser potencialmente mortales y, hasta el momento, no existe un tratamiento específico para combatir la enfermedad. El desarrollo de una enfermedad grave es más común en personas que tienen comorbilidades como hipertensión o diabetes mellitus o personas con sistemas inmunitarios debilitados y adultos mayores<sup>8,9</sup>.

### **1.2.1. SARS-CoV-2**

A finales del año 2019, en la ciudad de Wuhan, China, se reportó la presencia de un nuevo coronavirus en un grupo de personas que presentaban casos de neumonía y que ahora se conoce formalmente como el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo tipo 2 (SARS-CoV-2). Más tarde, el 22 de enero de 2020,

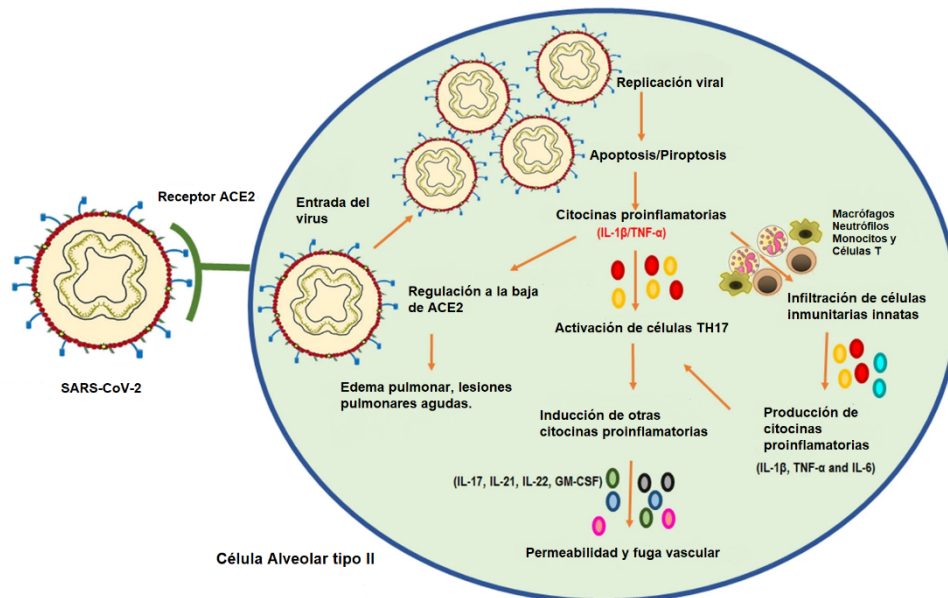
se informó por primera vez la transmisión de persona a persona de este nuevo virus y el 11 de marzo de este mismo año la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que la infección por SARS-CoV-2 se había convertido en una pandemia.

El virus se transmite a través de microgotas respiratorias o aerosoles generados al toser o estornudar; por estrechar la mano de una persona enferma o al tocar un objeto o superficie contaminada y llevarse las manos a la boca, la nariz o los ojos. También se puede transmitir durante procedimientos médicos y manipulación de muestras<sup>10</sup>. La enfermedad que desencadena el SARS-CoV-2 se denomina enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) y se caracteriza por la presencia de signos y síntomas similares a los que ocasionan los virus gripales de tipo A y B como fiebre, tos, dificultad para respirar y cambio o pérdida del gusto o del olfato. Por lo tanto, no es posible diferenciar entre la gripe y el COVID-19 solo por los síntomas, se requieren pruebas específicas para confirmar un diagnóstico<sup>10,11</sup>.

### **1.2.2. Patogénesis**

Las primeras células que infecta el virus son las células multiciliadas en la nasofaringe o la tráquea, en las cuales inicia su replicación. Si el virus no se elimina mediante la respuesta inmunitaria innata o adaptativa en esta etapa, puede propagarse a las vías respiratorias inferiores por la aspiración de las partículas virales que se generan en las vías respiratorias superiores<sup>12,13</sup>. En los casos más graves, se ha demostrado que el SARS-CoV-2 infecta principalmente las células alveolares de tipo 2 (AEC2) de los pulmones a través de la unión de la proteína S (Espiga o Spike) al receptor de la enzima conversiva de angiotensina 2 (ECA2) donde la replicación activa y la liberación del virus induce la apoptosis en la célula huésped (Fig. 4), liberando patrones moleculares asociados a daño (DAMP), estos son reconocidos por las células epiteliales vecinas, las células endoteliales y los macrófagos alveolares, lo que desencadena la generación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (incluidas IL-6, IP-10, proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$  (MIP1 $\alpha$ ), MIP1 $\beta$  y MCP1). Estas proteínas atraen monocitos, macrófagos y células T al sitio de la infección, promoviendo una mayor inflamación (con la adición de IFN $\gamma$  producido por las células T) y estableciendo una

retroalimentación pro inflamatoria, lo que eventualmente daña la estructura pulmonar provocando disnea (dificultad para respirar) y en consecuencia hipoxemia, poco después del inicio de la disnea y la hipoxemia, se desarrolla insuficiencia respiratoria progresiva que tiene como consecuencia el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA)<sup>14,15</sup>.



**Figura 4.** Inmunopatogénesis iniciada por la replicación del SARS-CoV-2 en las vías respiratorias inferiores. Tomado y modificado de Asrani, P. & Hassan, M. (2021)<sup>15</sup>.

### 1.3. Métodos de diagnóstico para la detección del virus SARS-CoV-2

Durante la pandemia por SARS-CoV-2, se han utilizado diferentes métodos de diagnóstico para la detección del virus, que se pueden clasificar principalmente en dos categorías: (1) pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) y (2) pruebas serológicas para la detección de antígenos/anticuerpos<sup>16</sup>.

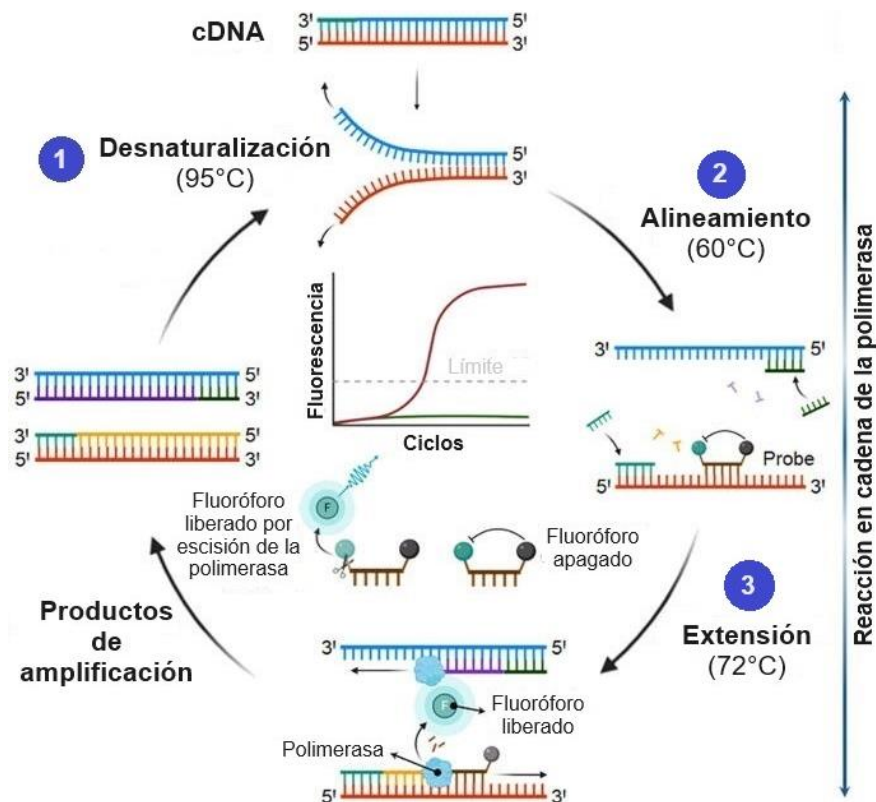
#### 1.3.1. Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) empleadas para detectar el virus SARS-Cov-2

Debido a su alta sensibilidad y especificidad, las NAAT son las pruebas principales para la detección del SARS-CoV-2. Este tipo de pruebas se basan en la identificación del material genético (RNA) del SARS-CoV-2. La mayoría de estas deben realizarse en un laboratorio y el tiempo para obtener los resultados varía de 1 a 3 días aproximadamente<sup>16</sup>.

Dentro de esta categoría se encuentran las siguientes pruebas:

A) Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

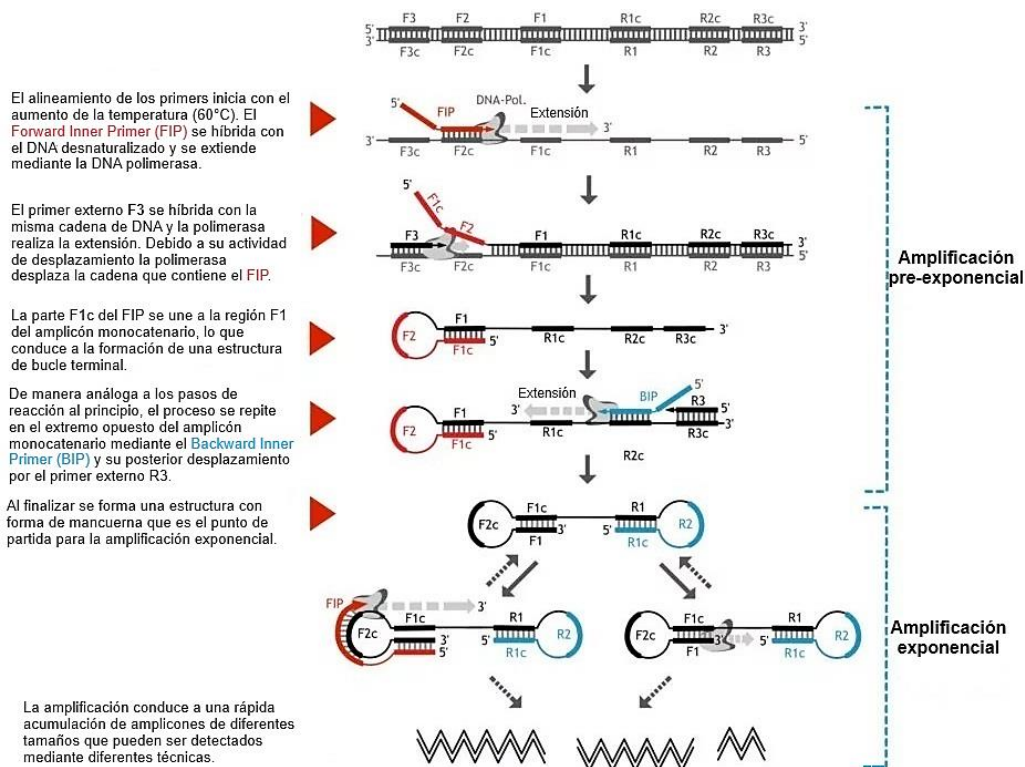
La RT-PCR consiste en primer lugar de la transcripción inversa para producir un DNA complementario (cDNA) a partir del RNA viral y luego la amplificación del cDNA a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Durante la amplificación, se incluye en la reacción de PCR una sonda fluorescente como un colorante fluorogénico, que responderá al DNA amplificado para producir señales fluorescentes (Fig. 5). Como resultado, la amplificación puede detectarse en tiempo real utilizando una máquina de PCR cuantitativa. Con este tipo de prueba, el virus puede detectarse al menos 48 horas antes del inicio de los síntomas y hasta 12-14 días después<sup>17,18</sup>.



**Figura 5.** Ilustración del principio de la reacción RT-PCR. Tomado y modificado de Afzal A. (2020)<sup>19</sup>.

## B) Amplificación isotérmica mediada por bucle con transcripción inversa (RT-LAMP)

Al igual que en la técnica de RT-PCR el primer paso es obtener cDNA a partir del RNA viral mediante transcripción inversa, posteriormente la amplificación del DNA se realiza a una temperatura constante de 65°C durante 30 minutos empleando 4 a 6 oligonucleótidos diseñados específicamente para reconocer de 6 a 8 regiones en la secuencia de DNA. Durante el inicio de la amplificación se genera una estructura de DNA en forma de mancuerna (Fig. 6) en la que los bucles terminales son el punto de partida para la amplificación exponencial, con cada dNTP que se incorpora a las cadenas en crecimiento se libera un protón, esto conduce a una disminución del pH que se puede detectar visualmente mediante indicadores de pH como el rojo de fenol. Este último en condiciones alcalinas presenta una coloración rosa mientras que en condiciones ácidas cambia de color a amarillo por lo tanto una detección positiva del virus SARS-CoV-2 estaría indicada por un color amarillo, en tanto que un resultado negativo estaría indicado por un color rosa, los resultados se pueden obtener en un tiempo estimado entre 30 minutos a 1 hora aproximadamente<sup>20,21</sup>.

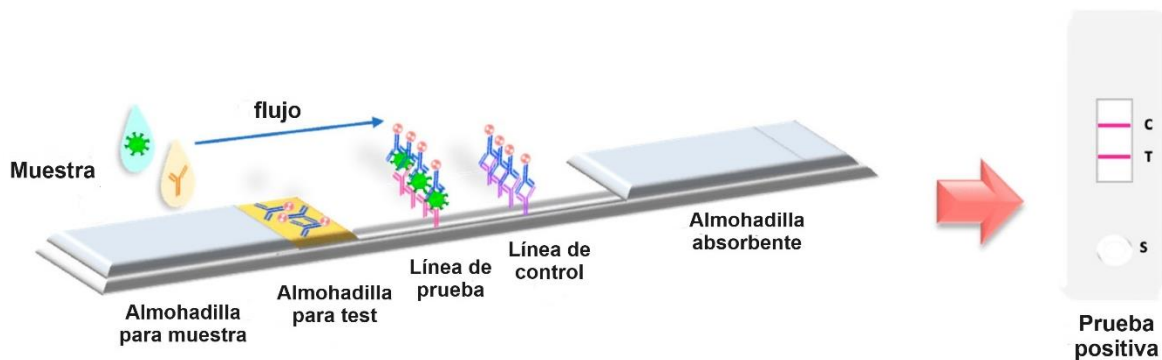


**Figura 6.** Ilustración del mecanismo de la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). Tomado y modificado de [https://www.milenia-biotec.com/uploads/2021/06/LAMP\\_Mechanism-927x1024.jpg.webp](https://www.milenia-biotec.com/uploads/2021/06/LAMP_Mechanism-927x1024.jpg.webp)

### 1.3.2. Pruebas serológicas para la detección de antígenos y anticuerpos anti-SARS-CoV-2

Las pruebas de antígenos son inmunoensayos que detectan la presencia de un antígeno viral específico, generalmente tienen una especificidad similar, aunque menos sensibles que la mayoría de las NAAT. Pueden proporcionar resultados en minutos lo que las hace útiles para identificar rápidamente a las personas que probablemente tengan COVID-19 y en su mayoría son menos costosas. Hay pruebas disponibles para realizarse en el punto de atención o en un laboratorio, sin embargo, en ocasiones puede ser necesario confirmar los resultados con una NAAT de laboratorio en los casos de una prueba negativa en personas con síntomas o una prueba positiva en personas sin síntomas.

También es posible la detección de anticuerpos (IgM e IgG) anti-SARS-CoV-2 en muestras de sangre. Aunque este procedimiento no identifica el virus de manera directa, determina si un individuo ha estado infectado mediante la identificación de estas inmunoglobulinas producto de una respuesta inmunitaria contra la infección. Dado que no es posible la detección en una fase temprana debido a que los anticuerpos IgM e IgG son detectables alrededor de 5 y 14 días, respectivamente, después del inicio de los síntomas, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) recomiendan este tipo de pruebas sólo para fines epidemiológicos<sup>16,22</sup>. Estas pruebas incluyen el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y el ensayo inmunocromatográfico o pruebas de flujo lateral.



**Figura 7.** Ilustración de los inmunoensayos de flujo lateral. Tomado y modificado de Castrejón, N., *et al.* (2022)<sup>23</sup>.

**Tabla 1. Tipos de metodologías empleadas en la detección de SARS-CoV-2.** Comparación de las diferentes metodologías empleadas para la detección del virus SARS-CoV-2 y la enfermedad de COVID-19.

Metodología	Prueba	Analito detectado	Muestra	Tiempo Resultados	Ventajas	Desventajas
<b>Amplificación de ácidos nucleicos (NAAT)</b>	RT-PCR <sup>17,19,24,28</sup>	DNA amplificado a partir del cDNA obtenido mediante transcripción inversa del RNA de coronavirus.	Hisopado nasofaríngeo u orofaríngeo	1 a 3 días	Alta especificidad y sensibilidad	Requiere equipos especializados costosos y analistas capacitados.  Requiere de entre 4 a 6 horas para procesar las muestras.  Alto costo
	RT-LAMP <sup>19,24,25,28</sup>	RNA	Hisopado nasofaríngeo	30 a 60 minutos	Más rápido que el ensayo de RT-PCR.  Alta especificidad y sensibilidad.  No requiere un termociclador.	Dificultad en el diseño de los oligos.
<b>Detección de antígenos</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) <sup>29,30</sup>	Antígenos virales (Proteínas S y N)	Hisopado nasofaríngeo	3 a 5 horas	Alta especificidad.	Menor sensibilidad en comparación con PCR.
	Ensayos de flujo lateral <sup>17,26,28</sup>	Antígenos virales (Proteínas S y N)	Hisopado nasofaríngeo	15 a 30 minutos	Rápidos y baratos  Alta especificidad	Baja sensibilidad  Los resultados negativos deben confirmarse con una prueba como la RT-PCR.
<b>Detección de anticuerpos</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) <sup>24,25,27,29</sup>	Anticuerpos IgG e IgM	Suero o plasma sanguíneo	1.5 a 2.5 horas	Alta sensibilidad, más rápida y económica que la RT-PCR	El ensayo tarda un par de horas.  Requiere de equipos específicos.  Riesgo de reactividad cruzada
	Ensayo de flujo lateral <sup>24,25,27,28,29</sup>	Anticuerpos IgG e IgM	Sangre o plasma sanguíneo	10 a 15 minutos	Más rápida y económica que la RT-PCR	Riesgo de reactividad cruzada.  Resultados falsos negativos si la concentración de anticuerpos está por debajo del límite de detección.

#### **1.4. Métodos de purificación de ácidos nucleicos para su posterior uso en las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT).**

Como se mencionó anteriormente, durante la pandemia las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) se establecieron como las más utilizadas para el diagnóstico del virus SARS-CoV-2. Por lo tanto, la purificación de ácidos nucleicos es un paso previo importante en la realización de este tipo de pruebas debido a que la presencia de materiales celulares u otros contaminantes como proteínas o carbohidratos en las muestras biológicas impiden que se lleven a cabo correctamente<sup>31,32</sup>.

El DNA o RNA de interés se puede aislar utilizando una variedad de métodos diferentes. Entre los más utilizados se encuentran:

- **Extracción Fenol-Cloroformo**

Esta técnica emplea dodecilsulfato de sodio (SDS) y proteinasa K para la digestión enzimática de proteínas y componentes celulares distintos de los ácidos nucleicos. Luego se agrega una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se centrifuga para promover la partición de lípidos y desechos celulares en la fase orgánica, dejando el DNA aislado en la fase acuosa, esta última se transfiere a un tubo limpio para posteriores aplicaciones<sup>33</sup>.

- **Centrifugación en gradiente de cloruro de cesio (CsCl) con bromuro de etidio (EtBr)**

En este método las muestras lisadas se mezclan con CsCl y EtBr para, posteriormente, centrifugarlas a alta velocidad. Como el cloruro de cesio es una sal extremadamente densa se establecerá un gradiente de densidad que va disminuyendo desde el fondo del tubo hasta la parte superior, en tanto que el bromuro de etidio se intercalará en los ácidos nucleicos permitiendo localizar y extraer las bandas formadas al aplicar luz ultravioleta. Generalmente la separación de ácidos nucleicos depende principalmente de su peso molecular<sup>34</sup>.



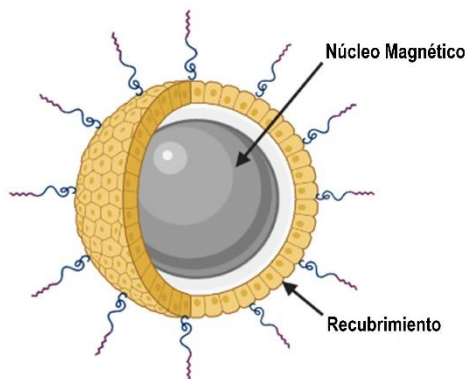
- **Extracción en fase sólida**

En la técnica de extracción en fase sólida los ácidos nucleicos se unen selectivamente a una superficie sólida, como una columna o nanopartículas recubiertas de sílice, en presencia de una alta concentración de sales lo que permite que los restos celulares y otros contaminantes sean separados mediante centrifugación. Una vez aislados los ácidos nucleicos estos se separan de la superficie empleando agua libre de nucleasas o un buffer alcalino Tris-EDTA<sup>33</sup>.

#### **1.4.1. Purificación de ácidos nucleicos mediante nanopartículas magnéticas**

Recientemente la purificación de ácidos nucleicos mediante nanopartículas magnéticas ha tomado mayor relevancia ya que involucra un procedimiento más simple y un menor tiempo de procesamiento, además de otras ventajas, por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden aislar directamente a partir de las muestras biológicas, como sangre, homogeneizados de tejidos, etc. Se evitan los pasos de centrifugación que pueden conducir a la degradación de los ácidos nucleicos y, por lo tanto, la pérdida total de utilidad en las aplicaciones posteriores, incluida la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>32,35,36</sup>.

Las nanopartículas magnéticas (MNP) son nanomateriales con rangos de tamaño entre las escalas nano a micro y que generalmente se conforman por dos partes principales: un núcleo y el recubrimiento (Fig. 8).



**Figura 8.** Componentes de una nanopartícula magnética (MNP). Tomado y modificado de Dasari, A. et al. (2022)<sup>37</sup>.

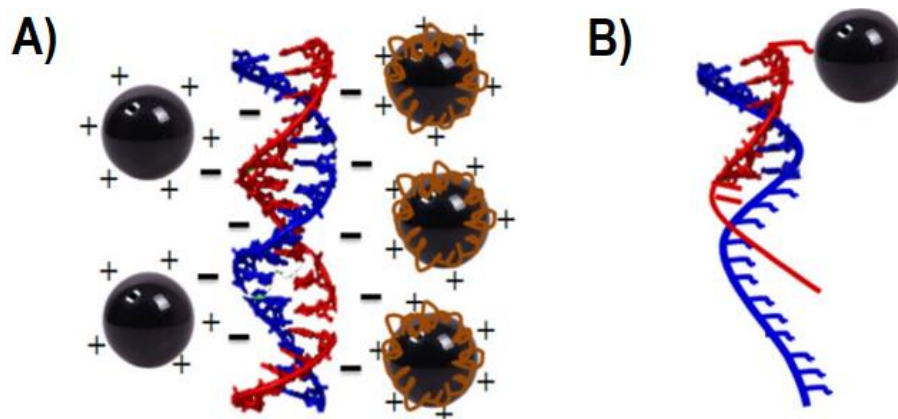
El núcleo contiene elementos magnéticos como hierro, níquel o cobalto, así como los óxidos correspondientes, lo que les otorga una propiedad conocida como superparamagnetismo en la que, al aplicarse un campo magnético externo sobre las MNP, muestran sensibilidad magnética y pueden interactuar con estos campos magnéticos. Sin embargo, en ausencia de campo magnético externo no presentan interacciones magnéticas<sup>38</sup>.

Por otra parte, el recubrimiento es responsable de estabilizar y proteger el núcleo de los efectos químicos del medio, además de desempeñar un papel fundamental aportando funciones específicas, por ejemplo, los materiales inorgánicos utilizados como recubrimiento permiten que a la superficie de las nanopartículas se unan ligandos biológicos<sup>38,39</sup>.

Para la purificación de DNA, los núcleos metálicos generalmente compuestos de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) son recubiertos con diferentes tipos de materiales como: polímeros (sílice) u oligonucleótidos. Los principales tipos de interacción que ocurren entre las nanopartículas y el DNA son de 2 tipos (Fig. 9)<sup>36,40,41</sup>.

I) Atracción electrostática entre la superficie cargada positivamente de la nanopartícula y los grupos fosfato del DNA.

II) Formación de enlaces de hidrógeno complementarios entre los oligonucleótidos inmovilizados covalentemente en las MNP y el DNA.



**Figura 9.** Tipos principales de interacciones entre el DNA y las nanopartículas magnéticas. A) Interacción electrostática utilizando nanopartículas no modificadas y/o funcionalizadas. B) Formación de enlaces de hidrógeno complementarios entre oligonucleótidos inmovilizados covalentemente en las MNP y el DNA. Tomado y modificado de Acosta, J. et al. (2020)<sup>40</sup>.

## 1.5. Detección de los productos amplificados por PCR en las pruebas NAAT.

Las principales técnicas utilizadas para realizar la detección del DNA que se ha amplificado en las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son:

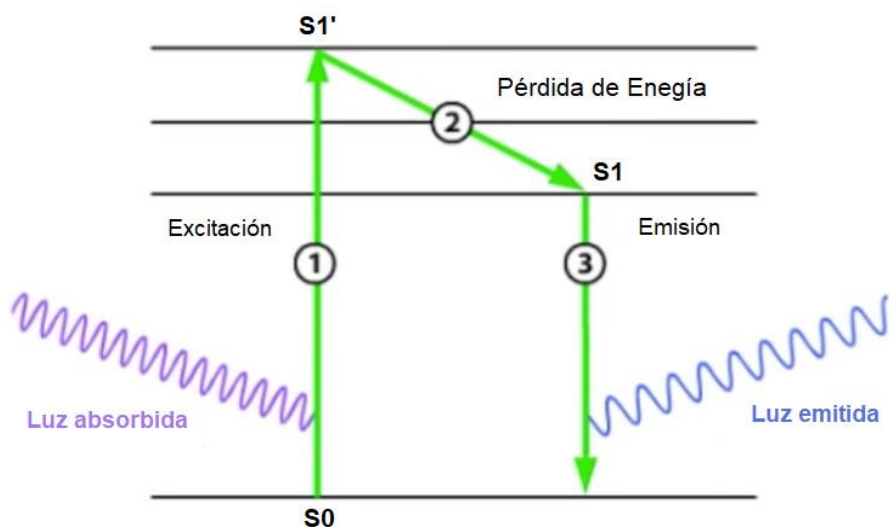
**Electroforesis en gel de agarosa:** Este método separa el DNA amplificado según su tamaño y carga, para su observación el DNA amplificado se tiñe con un colorante químico como el bromuro de etidio el cual se intercala entre las dos hebras<sup>42</sup>.

**Marcaje de oligonucleótidos o nucleótidos utilizados en PCR con fluoróforos:** Este método permite incorporar oligonucleótidos o nucleótidos que se encuentran marcados con un fluoróforo durante la reacción de PCR, posteriormente la señal de fluorescencia es detectada por un equipo como los que se emplean en la PCR en tiempo real.

Este último método representa una ventaja respecto a la detección mediante gel de agarosa ya que permite la detección del DNA amplificado en tiempo real mientras se sintetiza<sup>42,43</sup>.

### 1.5.1. Fluorescencia

La fluorescencia es la luz emitida por las moléculas a través del decaimiento espontáneo de un estado electrónico excitado generado por absorción de luz<sup>44</sup>. Consiste en un proceso de tres etapas que ocurre en ciertas moléculas (generalmente hidrocarburos poliaromáticos o heterociclos) llamadas fluoróforos o colorantes fluorescentes y esto se ilustra mediante un diagrama de estado electrónico simple también conocido como diagrama de Jablonski (Fig. 10)<sup>44,45</sup>.



**Figura 10.** Diagrama de Jablonski que ilustra los procesos involucrados en el fenómeno de fluorescencia. Tomado y modificado de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/molecular-probes-the-handbook/introduction-to-fluorescence-techniques.html>

En la etapa 1 (Excitación) un fotón generado por una fuente externa como una lámpara incandescente o un láser es absorbido por el fluoróforo, creando un estado electrónico excitado ( $S1'$ )<sup>45</sup>.

El estado excitado existe por un tiempo finito (típicamente de 1 a 10 nanosegundos), durante este tiempo el fluoróforo sufre cambios conformacionales y también una multitud de posibles interacciones con su entorno molecular, lo cual provoca que la energía de  $S1'$  se disipe parcialmente, esto se observa en la Etapa 2: Tiempo de vida del estado excitado, produciéndose un estado excitado relajado ( $S1$ ) a partir del cual se origina la emisión de fluorescencia<sup>45</sup>.

En la tercera etapa (Emisión de fluorescencia) se emite un fotón, devolviendo el fluoróforo a su estado fundamental  $S0$ . Debido a la disipación parcial de energía durante el tiempo de vida del estado excitado, la energía de este fotón emitido es menor y, en consecuencia, de mayor longitud de onda que el fotón de excitación<sup>45</sup>.

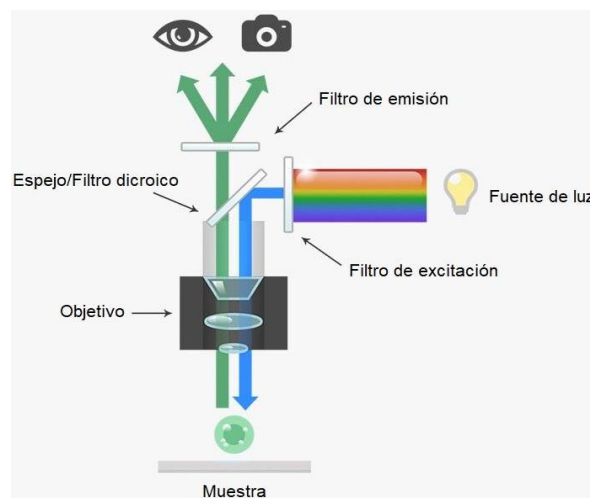
### 1.5.2. Microscopía de Epifluorescencia

La microscopía de epifluorescencia es una modalidad de microscopía de campo amplio que utiliza el fenómeno de la fluorescencia para generar imágenes. En este tipo de microscopía tanto la luz de excitación como la de emisión viajan a través del mismo objetivo<sup>46</sup>.

La mayoría de las imágenes de fluorescencia se realizan utilizando microscopios que tienen estos componentes esenciales:

- a) Una fuente de luz (lámpara)
- b) Un filtro de cubo que contiene un juego de filtros de fluorescencia: incluye un filtro de excitación, un espejo dicroico/divisor de haz y un filtro de emisión.
- c) Una cámara CCD

La luz generada por una lámpara viaja hacia el filtro de excitación en donde se reducen las longitudes de onda de la luz entrante a solo aquellas utilizadas para excitar la muestra. Las longitudes de onda seleccionadas se reflejan luego desde un espejo dicroico o un divisor de haz a través del objetivo del microscopio hasta la muestra. Si la muestra emite fluorescencia, la luz de emisión captada por el objetivo vuelve a pasar a través del espejo dicroico y posteriormente es filtrada por el filtro de emisión, que bloquea las longitudes de onda de excitación no deseadas. La luz emitida luego es recolectada por un detector como una cámara CCD la cual está conectada a una pantalla de computadora, que muestra la imagen (Fig. 11)<sup>47,48</sup>.



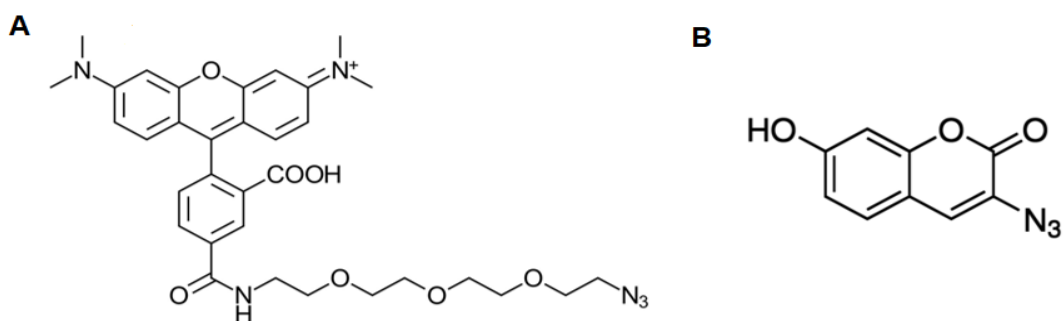
**Figura 11.** Trayectoria del rayo de luz en un microscopio de epifluorescencia. La línea azul ilustra la trayectoria del haz de luz de excitación y la línea verde, muestra la trayectoria del haz de luz de emisión resultante. Tomado y modificado de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/fundamentals-of-fluorescence-microscopy/epifluorescence-microscope-basics.html>

## 1.6. Fluoróforos utilizados en el marcaje de oligonucleótidos o nucleótidos (bioconjugación)

La bioconjugación implica la unión de moléculas mediante enlaces químicos, en los cuales al menos uno de los reactivos es una biomolécula (anticuerpos, proteínas u oligonucleótidos). Los bioconjugados se utilizan en la detección, análisis o identificación y seguimiento de biomoléculas en los campos de la biotecnología, la medicina y la nanotecnología. Entre sus aplicaciones se cuentan la unión de fluoróforos a anticuerpos para citometría de flujo, unión de fluoróforos a oligonucleótidos y la obtención de imágenes por microscopía<sup>49</sup>.

Los avances en la química de la fluorescencia han impulsado el desarrollo de muchos tipos diferentes de fluoróforos proporcionando una mayor utilidad y diversidad de estos para aplicaciones en investigación bioquímica, en el desarrollo de biosensores o como detectores de moléculas específicas<sup>50</sup>.

Los colorantes orgánicos sintéticos, como la fluoresceína, fueron los primeros compuestos fluorescentes utilizados en la investigación biológica. A partir de estos compuestos se han producido derivados para mejorar su fotoestabilidad. Entre los ejemplos más destacados se encuentran las variantes de la rodamina y cumarinas (Fig. 12) que por su pequeño tamaño son útiles para las estrategias de bioconjugación por que pueden entrecruzarse con macromoléculas sin interferir con la función biológica<sup>50</sup>.



**Figura 12.** Fluoróforos orgánicos Rodamina y Cumarina. (A) compuesto 5-TAMRA-PEG3-Azida, el cual es un derivado de la rodamina. B) compuesto 3-azido-7-hidroxycumarina el cual deriva de la cumarina<sup>51</sup>.

### **1.6.1. Estrategias para el marcaje de oligonucleótidos/nucleótidos.**

Para la unión de los fluoróforos a los oligonucleótidos se utilizan dos estrategias principales. El primer método y el más común es el método de las fosforamiditas (nucleósidos modificados con grupos químicos de protección en los grupos reactivos de la molécula, cuya función es evitar reacciones no deseadas durante la síntesis de oligonucleótidos). Este método hace posible incorporar uno o más fluoróforos en uno o en ambos extremos 5' y/o 3' del oligonucleótido. La segunda estrategia, se basa en la reacción de un grupo éster presente en la molécula del fluoróforo con un grupo amino en el oligonucleótido. La principal desventaja de estas estrategias es que tienen un bajo rendimiento cuando se requieren múltiples adiciones de fluoróforos<sup>52</sup>.

Sin embargo, recientemente se ha empleado la “química de click” como una opción más efectiva para marcar oligonucleótidos o también nucleótidos con moléculas fluorescentes. La amplia gama de aplicaciones de bioconjugación de la química click se ha atribuido a su cinética de reacción rápida, rendimientos cuantitativos, formación mínima de subproductos y una alta quimioespecificidad y regioselectividad<sup>52,53</sup>.

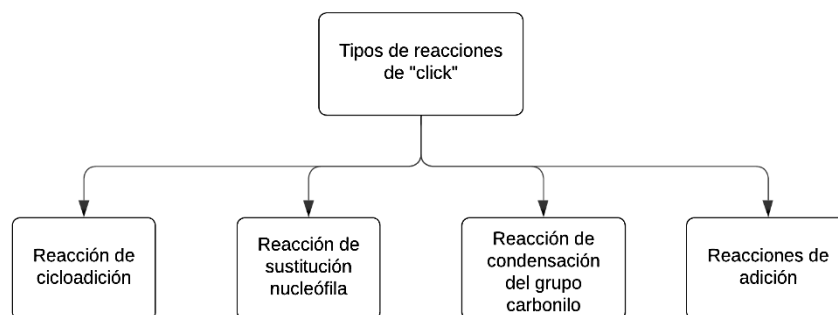
### **1.7. Química “click”**

El término “Química click” fue acuñado por el Dr. Karl Barry Sharpless<sup>53,54</sup> en el año 2001 para definir un conjunto de reacciones químicas que son versátiles para unir diversas moléculas en condiciones ambientales; entre sus características se encuentran:

- a) Requieren condiciones de reacción simples
- b) El no uso de solventes o el uso de un solvente benigno (como el agua) que se elimina fácilmente
- c) El producto debe ser estable en condiciones fisiológicas además de que su aislamiento debe ser sencillo.

Por lo anterior, tienen aplicaciones importantes en el campo del descubrimiento de fármacos, la química médica y la investigación con DNA.

Hasta la fecha se pueden clasificar en cuatro tipos diferentes (Fig. 13), siendo las más conocidas las reacciones de cicloadición, en especial la reacción de cicloadición 1,3-dipolar azida/alquino catalizada con cobre (I) (CuAAC)<sup>53</sup>.

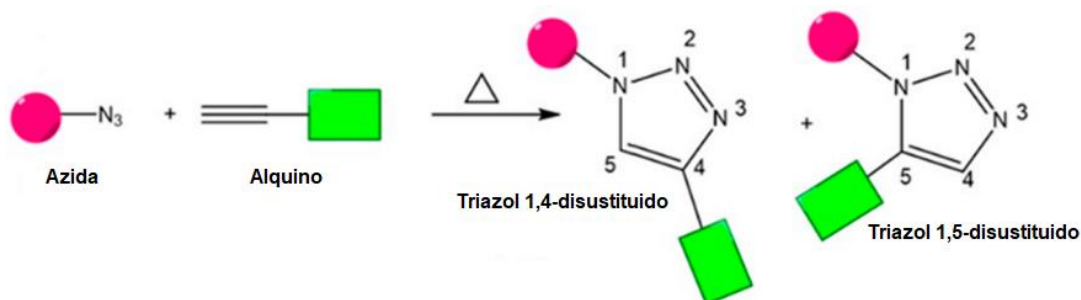


**Figura 13.** Reacciones de tipo "click". Es una reacción que se compone de un solo paso. Tomado y modificado de Kaur J. et al. (2021)<sup>53</sup>.

### 1.7.1. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar azida/alquino catalizada con cobre(I) (CuAAC)

Las reacciones de cicloadición se conocen desde 1888, sin embargo, fue Rolf Huisgen quien, a partir de 1957, estableció las cicloadiciones 1,3-dipolares como un nuevo campo de la síntesis orgánica<sup>53</sup>.

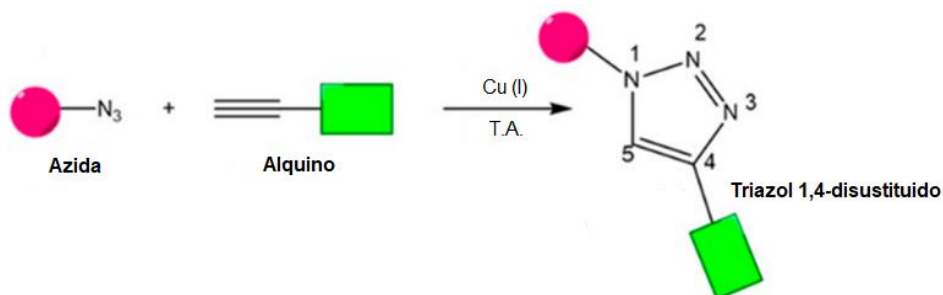
La reacción entre azidas y alquinos para dar derivados de triazol se conoce como cicloadición de Huisgen. A pesar de su gran relevancia, tiene algunas limitaciones como requerir de temperaturas elevadas y carecer de regioselectividad produciendo mezclas de triazoles 1,4- y 1,5-disustituídos; lo que hace que en la mayoría de los casos sea poco práctica (Fig. 14)<sup>54</sup>.



**Figura 14.** Reacción de Huisgen. Consiste en la cicloadición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas. Kaur J. et al. (2021)<sup>53</sup>.



En 2002, los grupos de investigación de Meldal y Sharpless reportaron simultáneamente que en presencia de Cu (I), la reacción de Huisgen se acelera en hasta 7 órdenes de magnitud, adicionalmente se convierte en regioselectiva a favor del isómero 1,4-disustituido (Fig. 15) y puede llevarse a cabo en condiciones acuosas, incluso a temperatura ambiente.



**Figura 15.** Reacción de cicloadición alquino-azida catalizada por cobre (I) (CuAAC). Kaur J. et al. (2021)<sup>53</sup>.

La catálisis por cobre facilitó el empleo generalizado de la reacción de Huisgen en todos los campos de la síntesis orgánica, cuando se necesita unir dos fragmentos estructurales en una sola molécula<sup>54</sup>.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos 20 años han surgido tres nuevos coronavirus (CoV) implicados en enfermedades graves para los humanos: el coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV), el coronavirus del Síndrome Respiratorio de Medio Oriente (MERS-CoV) y el coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2). Este último, el más reciente de los coronavirus, causa la enfermedad respiratoria llamada COVID-19, responsable de la actual pandemia que inició a principios del año 2020 y perdura hasta la fecha en que se redacta esta tesis y que ha dejado hasta el momento más de 700 millones de contagios y alrededor de 6 millones de muertes en el mundo<sup>55,56</sup>.

Para realizar la detección del virus SARS-CoV-2, hay dos tipos principales de pruebas de diagnóstico: A) las que informan la presencia de una infección actual y B) las que confirman una infección previa. En la primera categoría encontramos las pruebas aprobadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que son pruebas moleculares que amplifican fragmentos de RNA viral, también conocidas como pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) y pruebas serológicas para la detección de antígenos; en tanto que, en la segunda categoría, tenemos las pruebas de detección de anticuerpos (Fig. 16)<sup>25,57</sup>.

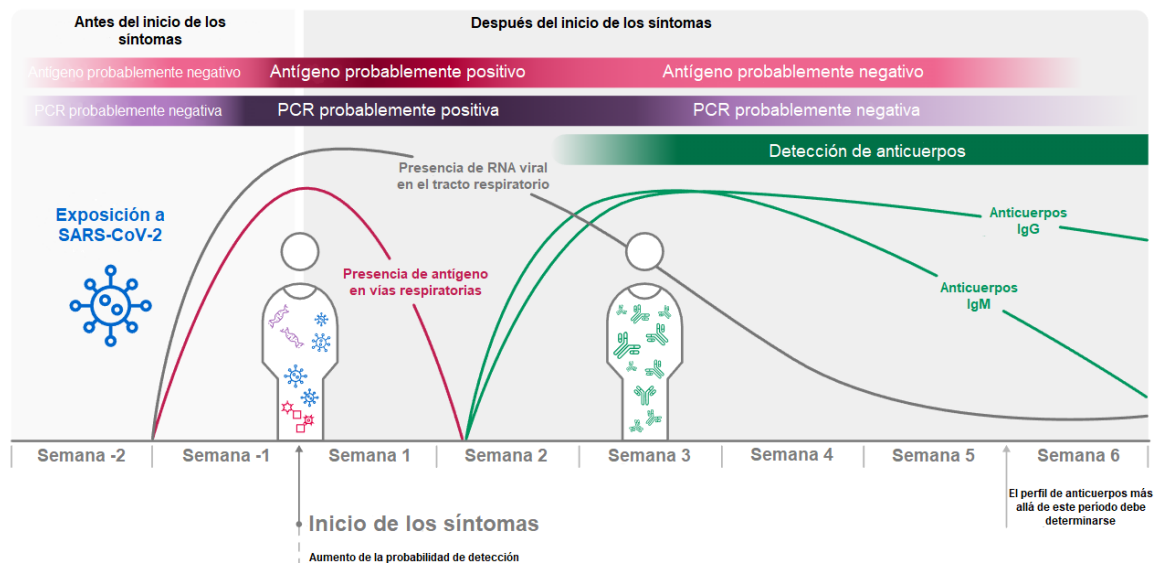


**Figura 16.** Tipos de pruebas para el diagnóstico de la enfermedad de COVID-19. Las pruebas de diagnóstico permiten detectar el virus SARS-CoV-2 o los anticuerpos generados por la infección derivada del virus. Tomado y modificado de <https://www.roche.com/stories/3-factors-decide-on-appropriate-sars-cov-2-test/><sup>57</sup>.

Dentro de las pruebas NAAT, la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR), es el estándar de oro en el diagnóstico de COVID-19 por su alta especificidad y sensibilidad. Sin embargo, presenta algunas desventajas como son: equipo de laboratorio costoso, requiere de personal capacitado y toma varias horas obtener un resultado (aproximadamente 4 a 6 horas)<sup>25,56</sup>.

Por otro lado, las pruebas serológicas son económicas, portátiles, rápidas y pueden usarse para diagnosticar pacientes en la etapa temprana de la infección viral, no obstante, la sensibilidad de dichas pruebas difiere de un 34% a 80%, con un mayor número de falsos positivos<sup>25,56</sup>.

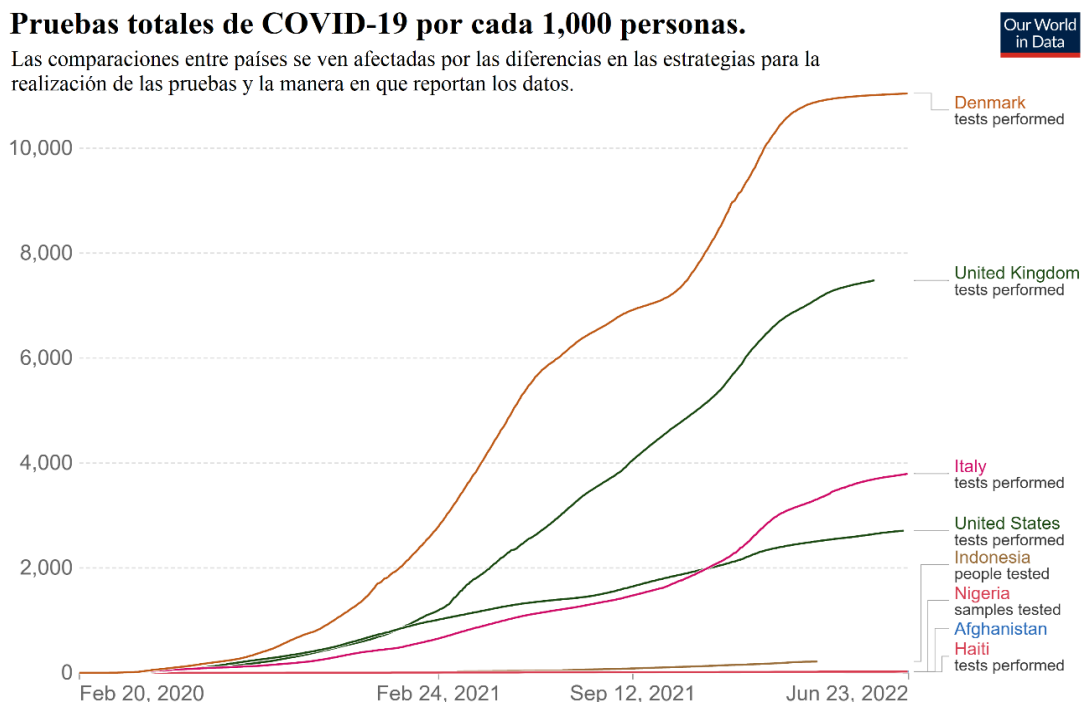
Adicionalmente, en investigaciones realizadas recientemente, se ha observado que una gran parte de las personas infectadas no desarrollan respuestas de anticuerpos hasta el decimocuarto día después del inicio de los síntomas. En consecuencia, las pruebas que se basan en la detección de anticuerpos no se utilizan para diagnosticar una infección actual de SARS-CoV-2 (Fig. 17), sin embargo, son útiles para la vigilancia de salud pública<sup>56</sup>.



**Figura 17.** Selección del tipo de prueba de diagnóstico apropiada de acuerdo con la progresión de la infección por SARS-CoV-2. Tomado y modificado de <https://www.roche.com/stories/3-factors-decide-on-appropriate-sars-cov-2-test/><sup>57</sup>.

Hasta el 11 de marzo de 2022 la cantidad total de pruebas realizadas fue de aproximadamente 6 mil millones. En países de ingresos altos como Estados Unidos,

Inglaterra, Austria y Dinamarca se realizaban entre 2000 y 15000 pruebas por cada 1000 personas; mientras que en muchos países de ingresos bajos como Haití, Afganistán y Nigeria se realizaron menos de 20 pruebas por cada 1000 personas (Fig. 18)<sup>25</sup>.



**Figura 18.** Pruebas de diagnóstico realizadas en relación con el tamaño de la población. Este mapa muestra cómo se compara el número total de pruebas por cada mil personas en diferentes países del mundo. Tomada de <https://ourworldindata.org/coronavirus>

El aumento continuo de los casos de COVID-19 causó graves problemas en los sistemas de salud quienes se vieron incapaces de brindar la atención suficiente que requería la población; resultando insuficientes la cantidad de pruebas realizadas para ayudar en la contención del virus<sup>24</sup>. Las estadísticas que aparecen en la figura 18 demostraron claramente la necesidad de desarrollar nuevos métodos de detección económicos y rápidos<sup>25,56</sup>.

En este proyecto se propone el desarrollo de una nueva metodología, usando la sensibilidad y especificidad de una RT-PCR, pero optimizada en términos de rapidez. Utilizando secuencias sintéticas de DNA obtenidas a partir regiones específicas del genoma del virus SARS-CoV-2 y de regiones conservadas del genoma de los virus pertenecientes a la familia de los Betacoronavirus.

Empleando las secuencias sintéticas de DNA y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se reemplazará el nucleótido timina por un análogo, que corresponde a la molécula 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU); posteriormente el producto amplificado se unirá a nanopartículas magnéticas (MNP) en donde se realizará el marcaje del nucleótido EdU con una molécula fluorescente, 5-TAMRA-PEG3-azida por medio de una reacción “click” conocida como reacción de cicloadición azida-alquino catalizada con cobre(I) (CuAAC) y se detectará por medio de microscopía de epifluorescencia.

### **3. HIPÓTESIS**

La incorporación del nucleótido 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) a la secuencia de DNA de SARS-CoV-2 durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permitirá determinar la presencia del virus mediante epifluorescencia.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo General**

Determinar la presencia del nucleótido 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) en las secuencias de SARS-COV-2 mediante fluorescencia, usando la química “click”.

#### **4.2. Objetivos Particulares**

- Determinar las condiciones de amplificación del DNA de Betacoronavirus (BC) y SARS-CoV-2 (SC2).
- Establecer la cantidad de nanopartículas magnéticas necesarias para la visualización del DNA.
- Probar diferentes concentraciones del fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-Azida (TAMRA).
- Establecer los tiempos de reacción óptimos para la amplificación y marcaje.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Diagrama de flujo

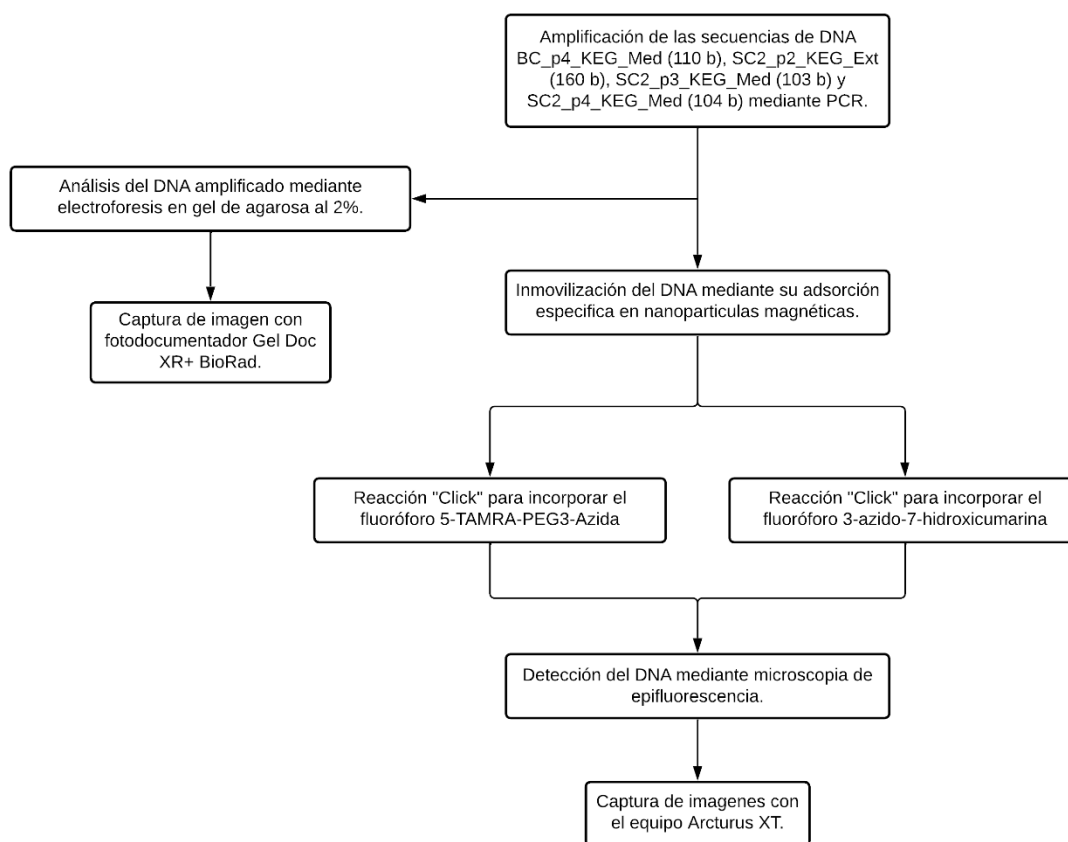


Figura 19. Diagrama de flujo de la metodología empleada en este trabajo.

### 5.2. Secuencias sintéticas de DNA de Betacoronavirus (BC) y SARS-CoV-2 (SC2) para la reacción de PCR.

Las secuencias de DNA BC\_p4\_KEG\_Med, SC2\_p2\_KEG\_Ext, SC2\_p3\_KEG\_Med y SC2\_p4\_KEG\_Med, fueron diseñadas por el Dr. Marco Tulio Solano De la Cruz (Instituto de Ecología, UNAM) y el M.C. Karel Johan Estrada Guerra (Instituto de Biotecnología, UNAM), y sintetizadas a través de la compañía Merck®.

Las secuencias se encontraban liofilizadas y libres de sales. Para su uso se resuspendieron en 100 µL de agua libre de nucleasas (W4502, Sigma-Aldrich); a partir de estas soluciones stock se llevó a cabo una dilución para obtener una

concentración final aproximada de 4.78 ng/μL (BC\_p4), 6.89 ng/μL (SC2\_p2), 5.40 ng/μL (SC2\_p3) y 5.04 ng/μL (SC2\_p4), como se describe en la tabla 2:

**Tabla 2.** Concentración de DNA control de las secuencias de Betacoronavirus y SARS-CoV-2. Los datos representan las concentraciones de DNA de las secuencias empleadas para los ensayos realizados en este trabajo.

Secuencia	Concentración inicial (μM)	Alícuota (μL)	Vol. H <sub>2</sub> O (μL)	Vol. Final (μL)	Concentración final (ng/μL)
BC_p4_KEG_Med	86	1	999	1000	4.78
SC2_p2_KEG_Ext	125	1	999	1000	6.89
SC2_p3_KEG_Med	97	1	999	1000	5.40
SC2_p4_KEG_Med	90	1	999	1000	5.04

Las muestras de cada secuencia se colocaron en microtubos de 1 mL y se guardaron a -20°C hasta su uso.

### 5.3. Oligonucleótidos BC\_p4\_KEG, SC2\_p2\_KEG, SC2\_p3\_KEG y SC2\_p4\_KEG para la reacción de PCR.

Para realizar los ensayos de PCR, se emplearon las siguientes secuencias de oligonucleótidos forward (FW) y reverse (RV):

**Tabla 3.** Secuencia de los oligonucleótidos y su respectiva temperatura de fusión (T<sub>m</sub>).

Oligonucleótido	Secuencia	T <sub>m</sub> (°C)
BC_p4_KEG_RV	5'-CAACTACAGCCATAACCTTTCCACA-3'	66.7
BC_p4_KEG_FW	5'-AAGCTGGTAATGCAACAGAAGTG-3'	64.2
SC2_p2_KEG_RV	5'-GTGAAAGAATTAGTGTATGCAGGG-3'	65.3
SC2_p2_KEG_FW	5'-CAGAACATTCTTGGGAATGCTGA-3'	62.9
SC2_p3_KEG_RV	5'-GTGCCCGCCGAGGAGAATTAGTCTG-3'	74.7
SC2_p3_KEG_FW	5'-GACATTGCTGACACTACTGATGC-3'	63.6
SC2_p4_KEG_RV	5'-GATTGTCCTCACTGCCGTCTTGTTG-3'	71.6
SC2_p4_KEG_FW	5'-GGCATTGATTTAGATGAGTGGAG-3'	63.5

Al encontrarse en forma liofilizada se resuspendieron en 100 μL de agua libre de nucleasas obteniendo las siguientes concentraciones:

**Tabla 4.** Oligonucleótidos usados para la reacción de PCR. Datos de las concentraciones de los diferentes oligos usadas para realizar los ensayos de PCR.

Oligonucleótido	nMol	Concentración final (μM)
BC_p4_KEG_RV	64.3	643
BC_p4_KEG_FW	67.5	675
SC2_p2_KEG_RV	59.1	591
SC2_p2_KEG_FW	72.4	724
SC2_p3_KEG_RV	56.9	569
SC2_p3_KEG_FW	66.2	662
SC2_p4_KEG_RV	59.4	594
SC2_p4_KEG_FW	72.7	727

Partiendo de las soluciones stock de los oligonucleótidos se realizaron diluciones para obtener una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  como se describe en la tabla 5:

**Tabla 5.** Preparación de los oligos para la reacción de PCR.

Oligonucleótido	Concentración inicial ( $\mu\text{M}$ )	Alícuota ( $\mu\text{L}$ )	Vol. H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	Vol. Final ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final ( $\mu\text{M}$ )
BC_p4_KEG_RV	675	1.48	98.52	100	10
BC_p4_KEG_FW	643	1.55	98.45	100	10
SC2_p2_KEG_RV	724	1.38	98.62	100	10
SC2_p2_KEG_FW	591	1.69	98.31	100	10
SC2_p3_KEG_RV	662	1.51	98.49	100	10
SC2_p3_KEG_FW	569	1.76	98.24	100	10
SC2_p4_KEG_RV	727	1.37	98.63	100	10
SC2_p4_KEG_FW	594	1.68	98.32	100	10

Las muestras de cada oligonucleótido se colocaron en microtubos de 1 mL y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **5.4. Mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) para la reacción de PCR.**

En un microtubo de 0.2 mL se colocó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los dNTP, dATP, dCTP, dTTP y dGTP (R0181, Thermo Fiser), los cuales se encontraban en una concentración inicial de 100 mM, después, se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (W4502, Sigma-Aldrich) para obtener un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  con una concentración final de 10 mM y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **5.5. Mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) con el nucleótido EdU para la reacción de PCR.**

En un microtubo de 0.2 mL se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los siguientes dNTP: dATP, dCTP y dGTP (R0181, Thermo Fiser) y 5  $\mu\text{L}$  del nucleótido EdU (900584, Sigma-Aldrich), posteriormente, se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (W4502, Sigma-Aldrich) para obtener un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  con una concentración final de 10 mM y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.



## 5.6. Obtención de las secuencias de DNA sintético de BC y SC2 con el nucleótido EdU, secuencias control de BC y SC2 sin EdU, y muestra sin DNA.

La incorporación del nucleótido EdU a las secuencias de DNA se llevó a cabo mediante la amplificación de las secuencias de DNA sintético de BC y SC2 en la reacción de PCR, utilizando el kit Taq DNA Polymerase Recombinant (#10342-053, Invitrogen), preparando 3 conjuntos de 5 microtubos, de acuerdo con la tabla siguiente:

**Tabla 6.** Componentes para la reacción de PCR. En la tabla se indican los componentes y los volúmenes empleados para la realización de la reacción de PCR para todas las secuencias con ciclos de 25, 20, 15, 10 y 1.

	BC	BC	SC2	SC2	Sin DNA
Reactivo	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
Agua (libre de nucleasas)	17.55 µL	17.55 µL	17.55 µL	17.55 µL	18.55 µL
10X PCR Buffer-Mg	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75 µL	0.75 µL	0.75 µL	0.75 µL	0.75 µL
10 mM dNTP mix (EdU)	0.5 µL	-	0.5 µL	-	0.5 µL
10 mM dNTP mix (Sin EdU)	-	0.5 µL	-	0.5 µL	-
10 µM FW Primer	1.25 µL	1.25 µL	1.25 µL	1.25 µL	1.25 µL (SC2)
10 µM RV Primer	1.25 µL	1.25 µL	1.25 µL	1.25 µL	1.25 µL (SC2)
Template DNA	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	-
Taq DNA polymerase	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL
<b>Vol. Total</b>	<b>25 µL</b>	<b>25 µL</b>	<b>25 µL</b>	<b>25 µL</b>	<b>25 µL</b>

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (AKC961300610, ThermoFisher) bajo las condiciones que se muestran en la tabla 7, de acuerdo con el protocolo del kit, ajustando la temperatura de alineamiento (T<sub>m</sub>) a 68°C.

**Tabla 7.** Condiciones del termociclador para la reacción de PCR.

Paso		Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial		94	3 minutos
Ciclos 25, 20, 10 y 1	Desnaturalización	94	45 segundos
	Alineamiento	68	30 segundos
	Extensión	72	90 segundos
Extensión Final		72	10 minutos

## **5.7. Análisis del producto de DNA amplificado, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.**

Después de la reacción de PCR, los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% para confirmar que se llevó a cabo correctamente la amplificación.

### **5.7.1. Preparación del buffer de carga.**

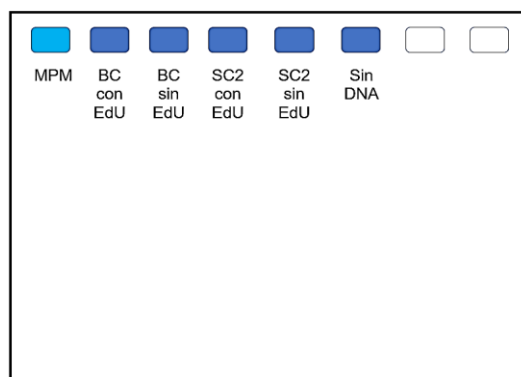
Se pesaron en una balanza analítica (PX84, Pioneer Ohaus) 0.025 gramos de azul de bromofenol (114391, Sigma-Aldrich) y 0.025 gramos de xileno cianol (335940, Sigma-Aldrich), estos se colocaron en un tubo de centrifuga de 15 mL, se añadieron 3 mL de glicerol (G5516, Sigma-Aldrich) y 7 mL de agua libre de nucleasas (W4502, Sigma-Aldrich). Se agitó con ayuda de un vórtex (88882012, Thermo Scientific™) para mezclar; se tomaron dos alícuotas de 500 µL que se colocaron en microtubos de 1 mL y se guardaron a -20°C hasta su uso.

### **5.7.2. Preparación del marcador de peso molecular (MPM).**

En un microtubo de 0.2 µL se colocaron 5 µL del DNA ladder 1 kb plus (10787018, Invitrogen), 5 µL del buffer de carga preparado en la sección anterior (5.7.1.) y 40 µL de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 50 µL, se mezclaron suavemente y se guardó a -20°C.

Para la preparación del gel de agarosa al 2% se pesaron 0.800 gramos de agarosa (PC0701-500G, Vivantis), los cuales se colocaron en un matraz de 250 mL, a continuación, se agregaron 40 mL de TBE 0.5X y se calentó en una parrilla (MS7-H550.S, DLAB) a una temperatura de 120°C agitando constantemente para disolver la agarosa, una vez disuelta se dejó enfriar hasta una temperatura tolerable y se agregó 4 uL del tinte fluorescente GelRed (41002, Biotium) para ácidos nucleicos, agitándose para homogenizar. Posteriormente se vació la agarosa en una charola de electroforesis y se colocó el peine para formar 8 pocillos, se dejó solidificar durante 5 minutos y se colocó en la cámara de electroforesis, llenando con buffer

TBE 0.5X hasta cubrir el gel. Se colocaron 25  $\mu$ L de las muestras del producto de amplificación (amplicón) de cinco microtubos de la reacción de PCR (SC2 con EdU y sin EdU, BC con EdU y sin EdU y control sin DNA) y 5  $\mu$ L del marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder; Invitrogen). como se muestra en la siguiente imagen.



**Figura 20.** Imagen que ejemplifica la distribución de las muestras en un gel para realizar el análisis de los productos amplificados por PCR en el gel de agarosa al 2%.

Las condiciones de electroforesis usando el equipo de electroforesis (LI-EE-300V, ENDURO E0303 300V Power Supply) fueron las siguientes: 60 minutos, 90 V y 22 mA. Posteriormente, el gel se observó en un fotodocumentador Gel Doc XR+ (1708195EDU, Bio-Rad) y se capturaron las imágenes mediante el software software Image Lab™.

### 5.8. Inmovilización del DNA amplificado en nanopartículas magnéticas.

Los 25  $\mu$ L de cada uno de los 5 microtubos de la reacción de PCR con los productos amplificados se transfirieron a nuevos microtubos de 1.5 mL, a los cuales previamente se les había agregado diferentes cantidades de nanopartículas magnéticas ( $\approx$ 700 nm de tamaño) del kit Pure DNA Plant (98050496, Kingfisher), dependiendo del número de ciclos de PCR. Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ L de etanol al 100% (E7023, Sigma-Aldrich) a cada microtubo y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos, después se mezclaron en el vortex por 5 minutos a 1100 revoluciones por minuto (rpm), se centrifugaron durante 30 segundos y se colocaron los microtubos en un rack magnético MagRack™6 (GE28-9489-64, Cytiva) durante 2 minutos o hasta que las muestras se clarificaron y se

eliminó el sobrenadante. Una vez retirada la mayor cantidad de etanol se realizaron dos lavados utilizando los buffers de lavado del kit Pure DNA Plant, el primero agregando 100  $\mu$ L del buffer de lavado 1 a cada uno de los microtubos, después se mezclaron en vortex (88882012, Thermo Scientific™) durante 1 minuto a 1100 rpm y se centrifugaron durante 30 segundos; nuevamente se colocaron en el MagRack™6 durante 2 minutos o hasta que las muestras se clarificaron y se eliminó el sobrenadante. El segundo lavado se realizó agregando a cada uno 100  $\mu$ L del buffer de lavado 2, repitiendo el mismo procedimiento que en el primer lavado. Finalmente, se suspendieron las nanopartículas en 10  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.

### 5.9. Detección del nucleótido EdU incorporado al DNA amplificado de BC y SC2 empleando el fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-Azida mediante química “click”

El procedimiento para la detección de EdU incorporado en las secuencias de DNA fue optimizado considerando el protocolo del kit BaseClick EdU Flow Cytometry® (#BCK-FC555-50, Baseclick); todos los pasos de la reacción click se realizaron a temperatura ambiente.

Se ajustaron las cantidades de cada componente de la solución de marcaje para la preparación de 50  $\mu$ L y se agregaron en el orden que se indica en la siguiente tabla:

**Tabla 8.** Componentes de la solución de marcaje con el fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-azida.

Material	Cantidad ( $\mu$ L)
PBS	43.8
Solución Catálisis	1
Fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-Azida (10 mM)	0.25
Buffer aditivo (10x)	5
<b>Volumen total</b>	<b>50</b>

**IMPORTANTE:** Si los componentes no se agregan en el orden indicado, la reacción no se desarrollará de manera óptima: una vez preparado se debe utilizar inmediatamente o al menos en los próximos 15 minutos.

Se agregaron 10  $\mu$ L de la solución preparada con anterioridad a cada tubo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente protegiendo de la luz, transcurrido este tiempo y con la menor exposición a la luz posible, se realizó un

lavado, agregando 500  $\mu$ L de PBS 10 mM (806552, Sigma-Aldrich), posteriormente se mezclaron en vortex durante 1 minuto a 1100 rpm, se centrifugaron por 30 segundos y se colocaron en el MagRack™6 por 2 minutos para eliminar el sobrenadante. Los lavados se repiten tres veces. Al finalizar, las nanopartículas se suspendieron en 10  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.

#### **5.9.1. Preparación del fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina (cumarina)**

Trabajando con la menor exposición a la luz, se pesó 1 mg del fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina (#A3306, TCI) y se depositó en un microtubo de 1.5 mL, a continuación, se agregaron 500  $\mu$ L de DMSO (#D8418, Sigma-Aldrich) y se agitó hasta disolver el reactivo, obteniéndose una concentración de 10 mM. El microtubo se cubrió con papel aluminio y se guardó a -20°C hasta su uso.

#### **5.10. Visualización mediante microscopía óptica y microscopía epifluorescente**

En un cubreobjeto, se colocó 1  $\mu$ L de solución con nanopartículas tomado de cada ensayo, se eliminó el líquido (agua) en el cual estaban suspendidas las nanopartículas y se observaron en el microscopio tanto en campo claro como con epifluorescencia. Las imágenes en campo claro y fluorescencia se obtuvieron utilizando una lente 100x Nikon CFI60 (con aceite de inmersión) en un microscopio invertido Nikon Eclipse ® Ti-E equipado con un sistema de Microdissección por captura láser ArcturusXT™.

## **6. RESULTADOS**

En este trabajo de tesis se desarrolló una nueva metodología que permitirá detectar al virus SARS-CoV-2 de una manera más rápida y eficiente, empleando técnicas novedosas para la detección de DNA marcado.

Para realizar los ensayos, se utilizaron diferentes secuencias sintéticas de ssDNA (DNA de cadena sencilla) tanto de secuencias específicas del virus SARS-CoV-2, como de secuencias comunes conservadas en la familia de los Betacoronavirus. Utilizando estas secuencias como molde, se realizó la reacción de PCR y se incorporó un nucleótido análogo de la timina (EdU). Posteriormente, el producto amplificado se inmovilizó en nanopartículas magnéticas y se realizó el marcaje del nucleótido EdU, presente en las secuencias de DNA, con el kit EdU Flow Cytometry 555. Por último, utilizando un microscopio de epifluorescencia se realizaron las observaciones para identificar las moléculas de DNA marcadas.

Durante el desarrollo de la metodología se probaron y establecieron diferentes variables como: 1) las condiciones óptimas de amplificación de las secuencias de DNA, 2) la cantidad de nanopartículas magnéticas necesarias para una óptima inmovilización del DNA que permitan su correcta visualización en el microscopio, 3) el ajuste de los tiempos de amplificación y de marcaje de las secuencias de DNA y 4) la concentración óptima de los fluoróforos.

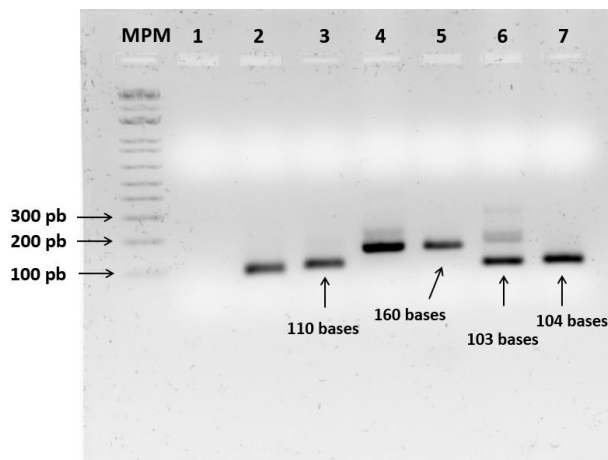
### **6.1. Condiciones de amplificación de las secuencias de DNA**

Previamente, en el laboratorio de Microscopía y Microdissección Láser del Instituto de Ecología, UNAM, se realizaron pruebas con cada una de las secuencias de ssDNA de 180 bases y sus respectivos oligos, para determinar la temperatura óptima de alineamiento ( $T_a$ ) mediante una PCR de gradiente. Las temperaturas de alineamiento probadas fueron entre 60 a 66°C, con variaciones de temperatura de aproximadamente 2°C (datos sin publicar). Con estas temperaturas había una correcta amplificación de los fragmentos correspondientes al tamaño esperado (Tabla 9). Sin embargo, nosotros observamos que en estos ensayos también había fragmentos correspondientes a ampliaciones inespecíficas.

**Tabla 9.** Tamaño de los fragmentos amplificados por PCR. Los datos de la tabla muestran los tamaños esperados para los productos de amplificación usando las secuencias de DNA control y su respectivos oligonucleótidos.

<b>Secuencia</b>	<b>Fragmento amplificado (pb)</b>
BC_p4_KEG_Med	110
SC2_p2_KEG_Ext	160
SC2_p3_KEG_Med	103
SC2_p4_KEG_Med	104

En anteriores trabajos sobre la optimización de un conjunto de oligos utilizados en los protocolos para la detección del virus SARS-CoV-2 mediante PCR y PCR en tiempo real, se reportó la aparición de amplificaciones inespecíficas cuando la temperatura de alineamiento es menor a la ideal<sup>58</sup>. De igual manera, en una publicación reciente donde reportan una metodología para la detección del virus mediante PCR en tiempo real usando SYBR green, también se reportó que una baja  $T_a$  podría estar relacionada con la obtención de amplificaciones inespecíficas, por lo que se recomienda incrementar la temperatura de alineamiento<sup>58,59</sup>. Por lo anterior, basándonos en las condiciones probadas previamente y con la intención de eliminar la amplificación de los fragmentos correspondientes a los tamaños no esperados, se decidió realizar ensayos con una temperatura de alineamiento de 68°C en todas las secuencias utilizando las condiciones de amplificación mencionadas previamente en materiales y métodos (sección 5.6). Para el análisis de los productos de amplificación se utilizó un gel de agarosa al 2% elaborado de acuerdo con la sección 5.7. Los resultados mostraron que con esta temperatura ya no se observaban los fragmentos correspondientes a las amplificaciones inespecíficas en las secuencias de BC\_p4, SC2\_p2 y SC2\_p4, y había una disminución en la secuencia correspondiente a SC2\_p3 (Fig. 21).

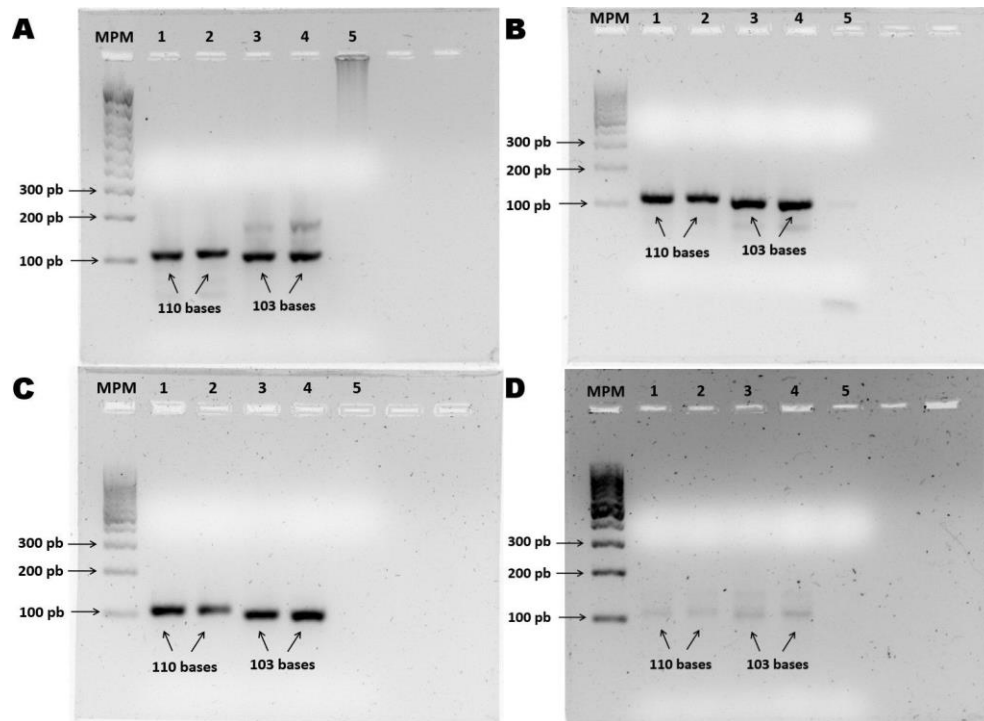


**Figura 21.** Amplificación mediante PCR con 25 ciclos de las secuencias de DNA de BC y SC2 a una Ta de 68°C. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR. Los carriles corresponden, de izquierda a derecha, a: **MPM:** Marcador de Peso Molecular, **1:** Control negativo de SC2\_p4, **2:** BC\_p2, **3:** BC\_p4, **4:** SC2\_p1, **5:** SC2\_p2, **6:** SC2\_p3 y **7:** SC2\_p4.

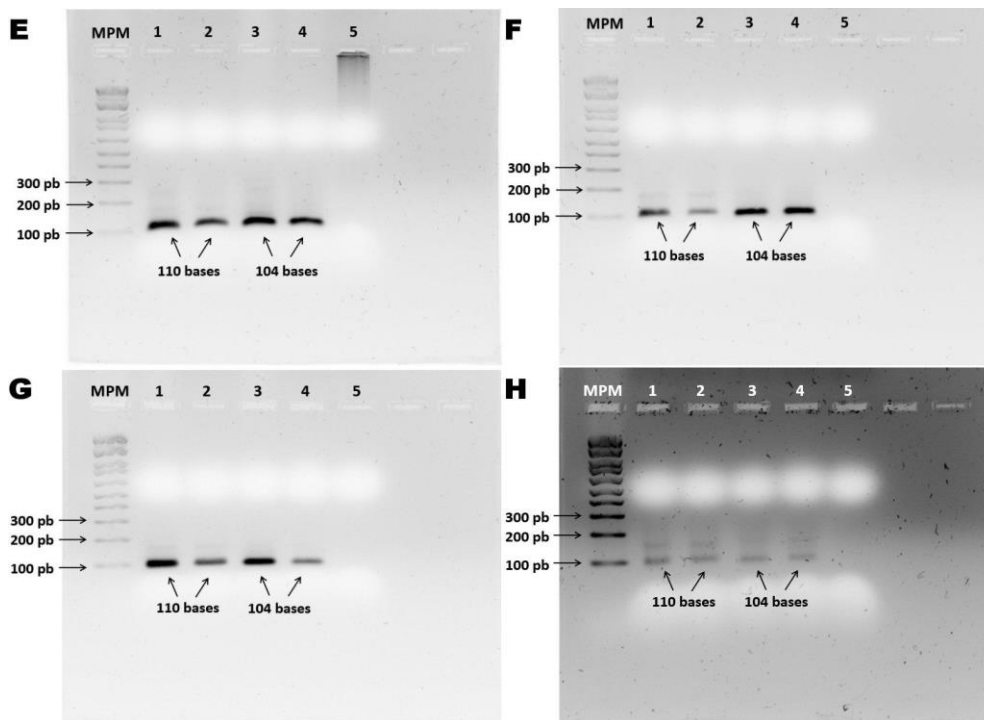
Una vez que se estableció la Ta adecuada para la reacción de PCR, con las secuencias utilizadas para la realización de esta tesis, correspondientes a BC\_p4\_KEG\_Med, SC2\_p2\_KEG\_Ext, SC2\_p3\_KEG\_Med y SC2\_p4\_KEG\_Med, se realizaron ensayos modificando la cantidad de ciclos en la reacción de PCR con la finalidad de determinar el menor número posible en que se logra detectar la amplificación. Para ello, se probaron 25, 20, 10 y 1 ciclos con las secuencias SC2\_p3 y SC2\_p4 (Fig. 22 y 23) y de 25 y 1 ciclo para la secuencia SC2\_p2 (Fig. 24). Los resultados mostraron que en todos los ciclos probados se obtienen productos de amplificación observables, incluso con un ciclo de amplificación. Esto permitirá que el desarrollo de la metodología sea más rápido, ya que esperamos que la cantidad de DNA amplificada en 1 ciclo pueda ser detectable cuando se realicen las observaciones en el microscopio.

Además, se encontró que al reducir la cantidad de ciclos también se disminuye la aparición de las bandas correspondientes a los fragmentos inespecíficos en las secuencias usadas en esta tesis, descartando la posibilidad de observar falsos positivos en las observaciones en el microscopio de epifluorescencia<sup>59</sup>.

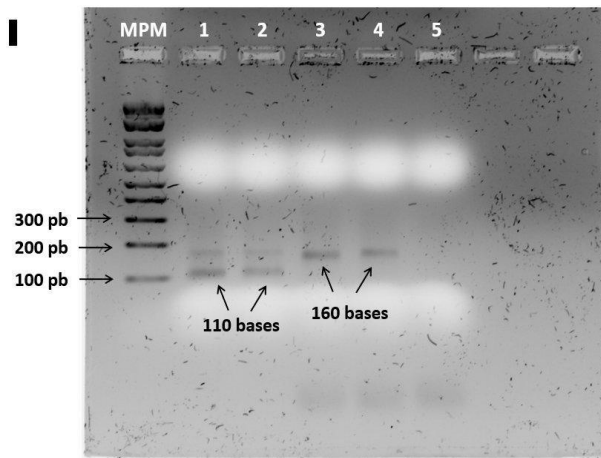




**Figura 22.** PCR de 25, 20, 10 y 1 ciclos de las secuencias de DNA de BC\_p4 y SC2\_p3. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados con 25 ciclos (A), 20 ciclos (B), 10 ciclos (C) y 1 ciclos (D). Los carriles de izquierda a derecha corresponden a: **MPM:** Marcador de peso molecular, **1:** BC\_p4 con EdU, **2:** BC\_p4 sin EdU, **3:** SC2\_p3 con EdU, **4:** SC2\_p3 sin EdU y **5:** Control sin DNA (oligos SC2\_p3).

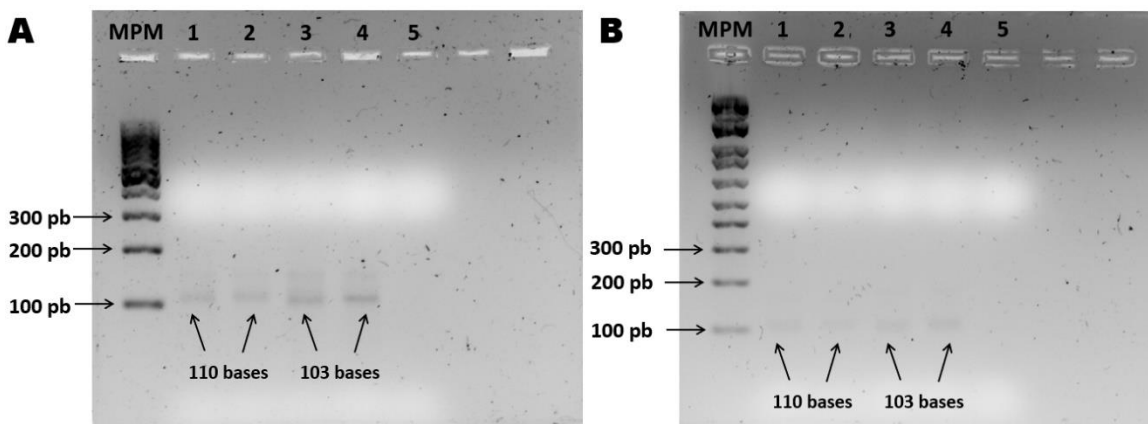


**Figura 23.** PCR de 25, 20, 10 y 1 ciclos de las secuencias de DNA de BC\_p4 y SC2\_p4. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados con 25 ciclos (E), 20 ciclos (F), 10 ciclos (G) y 1 ciclos (H). Los carriles de izquierda a derecha corresponden a: **MPM:** Marcador de Peso Molecular, **1:** BC\_p4 con EdU, **2:** BC\_p4 sin EdU, **3:** SC2\_p4 con EdU, **4:** SC2\_p4 sin EdU y **5:** Control sin DNA (oligos SC2\_p4).



**Figura 24.** PCR de 1 ciclo de las secuencias de DNA de BC\_p4 y SC2\_p2. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados con 1 ciclo. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a: **MPM:** Marcador de Peso Molecular, **1:** BC\_p4 con EdU, **2:** BC\_p4 sin EdU, **3:** SC2\_p2 con EdU, **4:** SC2\_p2 sin EdU y **5:** Control sin DNA (oligos SC2\_p2).

Por otra parte, con el objetivo de optimizar el tiempo de la reacción de PCR y comprobar si el paso de extensión final en la reacción tenía un efecto significativo en la amplificación de los fragmentos cuando se realiza con 1 ciclo, se eliminó este paso del protocolo de PCR correspondiente a 10 minutos. Se observó que el cambio en este parámetro muestra una disminución considerable de las bandas correspondientes a los productos amplificados, hasta el punto de que prácticamente no son visibles en el gel de agarosa (Fig. 25). Esto coincide con el reporte de que las reacciones de PCR con un tiempo de extensión final menor a 3 minutos tienden a fallar porque no se completa la replicación del DNA<sup>60</sup>. Por lo tanto, este paso es importante para la amplificación y no debe ser omitido y proponemos que en futuros trabajos se hagan ensayos reduciendo el tiempo de extensión final.



**Figura 25.** PCR de 1 ciclo de las secuencias de DNA de BC\_p4 y SC2\_p3 modificando la extensión final. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados con 1 ciclo. La imagen A corresponde a la reacción de PCR con los pasos de acuerdo con el protocolo del kit y la imagen B corresponde a la reacción donde se eliminó el paso de extensión final. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a: **MPM:** Marcador de Peso Molecular, **1:** BC con EdU, **2:** BC sin EdU, **3:** SC2 con EdU, **4:** SC2 sin EdU y **5:** Control sin DNA.

Con base en los resultados, se estableció que la Ta ideal para realizar las reacciones de PCR es de 68°C, además, se logró la amplificación de los fragmentos esperados con 1 ciclo bajo las condiciones descritas en la sección 5.6. La preparación de los microtubos para la reacción de PCR y el tiempo que tarda está programando 1 ciclo en el termociclador es de aproximadamente 45 minutos.

## 6.2. Inmovilización de los productos amplificados por PCR en nanopartículas magnéticas

Una vez establecidas las condiciones de amplificación para las secuencias de DNA, los productos de amplificación se inmovilizaron mediante su adsorción en nanopartículas magnéticas siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.8., posteriormente se realizó el marcaje del DNA y se observó al microscopio acorde a la metodología detallada en los apartados 5.9. y 5.10.

Con el objetivo de determinar la cantidad apropiada de nanopartículas que permitan detectar adecuadamente el DNA en el microscopio, se probaron las diferentes cantidades que se indican en las siguientes tablas:

**Tabla 10.** Cantidad de nanopartículas empleadas para las secuencias de BC\_p4 y SC2\_p3.

Ciclos de PCR	Cantidad de nanopartículas ( $\mu\text{L}$ )
25	10
20	1
10	1
1	1 (dilución 1:10)

**Tabla 11.** Cantidad de nanopartículas empleadas para las secuencias BC\_p4 y SC2\_p4.

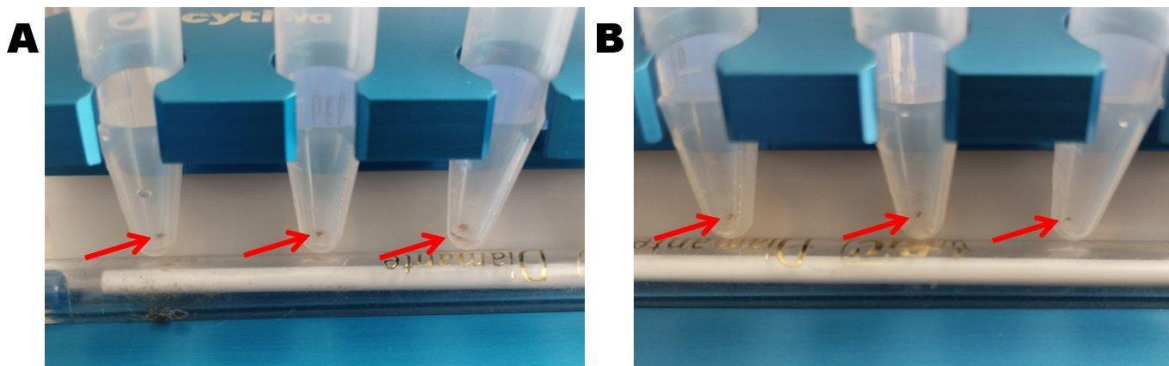
Ciclos de PCR	Cantidad de nanopartículas ( $\mu\text{L}$ )
25	1
20	1
10	1
1	1 (dilución 1:10)

**Tabla 12.** Cantidad de nanopartículas empleadas para las secuencias BC\_p4 y SC2\_p2.

Ciclos de PCR	Cantidad de nanopartículas ( $\mu\text{L}$ )
25	1
1	1 (dilución 1:10)

Cuando se agregan 10 y 1  $\mu\text{L}$  de las nanopartículas tomadas directamente de la solución original al DNA obtenido de 25, 20 y 10 ciclos, se logra la observación de las secuencias de DNA marcadas en el microscopio (Fig. 34, 35 y 36), sin embargo, cuando se utiliza 1  $\mu\text{L}$  de nanopartículas con el DNA obtenido de 1 ciclo, se dificulta la observación, esto probablemente se debe a que la cantidad de nanopartículas es mayor a la cantidad de DNA; por lo que para 1 ciclo se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/10 a partir de la solución original de nanopartículas, con la cuál fue posible realizar las observaciones en el microscopio (Fig. 37).

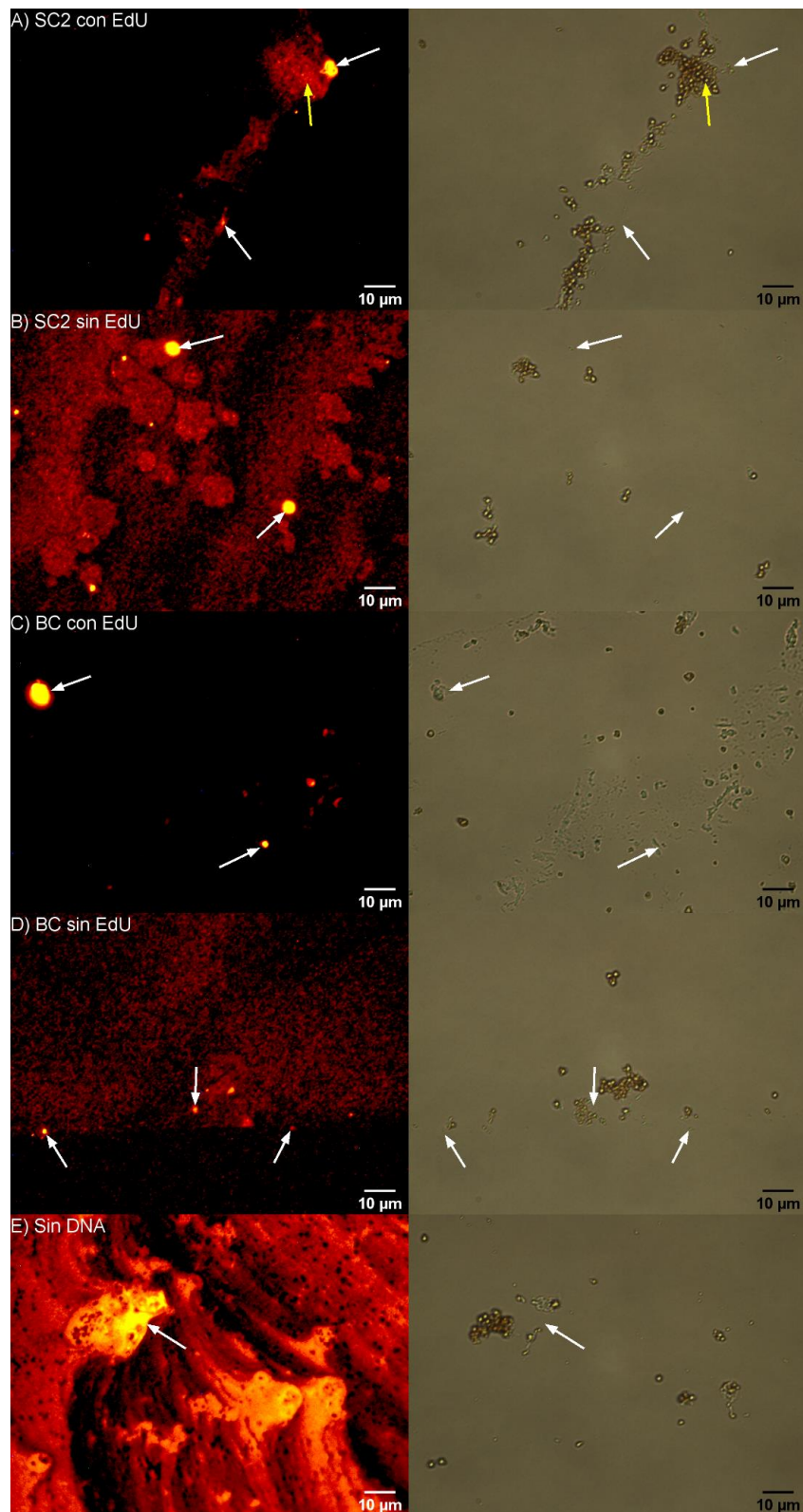
Aunque con una dilución 1/10 se lograba detectar el DNA en las nanopartículas al observarse en el microscopio, se probaron otras dos diluciones, 1/100 y 1/50, con el objetivo de concentrar una mayor cantidad de DNA, ya que, al tener menor cantidad de nanopartículas, se esperaba que el DNA se acumulara en estas y se favoreciera aún más su detección (Fig. 27 y 28). Sin embargo, debido a la cantidad tan reducida de nanopartículas que se encontraban en 1  $\mu\text{L}$  de las diluciones 1/100 y 1/50, cuando se realizaban los lavados después de realizar el marcaje de las secuencias de DNA había una pérdida de nanopartículas en cada lavado (Fig. 26), al punto de que en el último lavado prácticamente no se observaban a simple vista, teniendo una pérdida casi total de las nanopartículas.



**Figura 26.** Ejemplo de la visualización de las nanopartículas magnéticas con el DNA amplificado inmovilizado. En la imagen A se observan las nanopartículas magnéticas en una dilución 1/50 en 500  $\mu\text{L}$  de PBS, mientras que en la imagen B se observa la pérdida de las nanopartículas después de realizar el primer lavado.

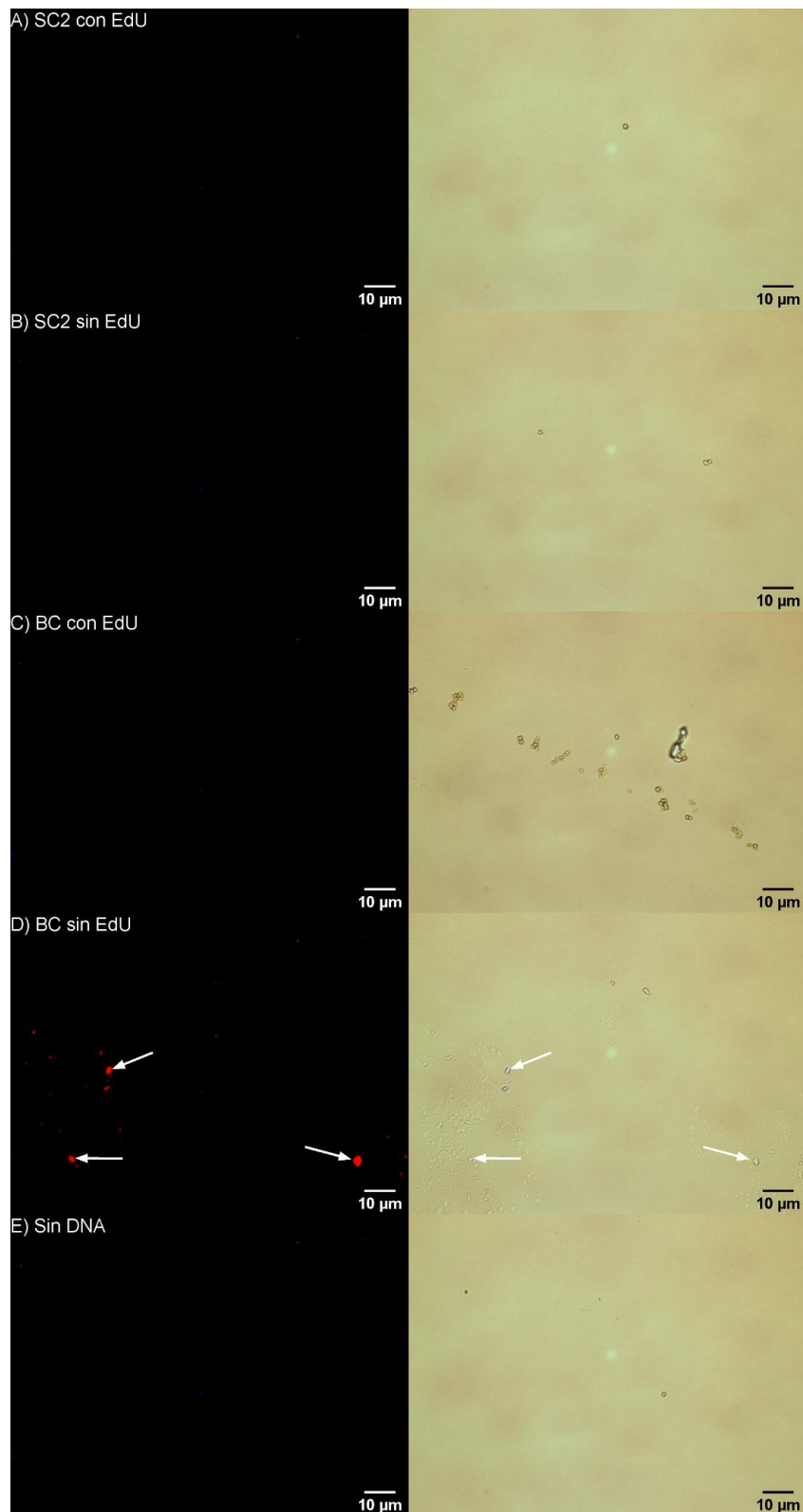
En el primer ensayo con la dilución 1/100, para evitar perder por completo las nanopartículas en los lavados, se dejó una cantidad aproximada de 5  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, en cada lavado. Sin embargo, como se observa en la figura 27, al no eliminar por completo el sobrenadante de los lavados, quedan muchos residuos de fluoróforo por esta razón se observa con mayor intensidad la fluorescencia de fondo en todas las muestras, de modo que esta concentración de nanopartículas no es recomendable. Cabe señalar que la pérdida de partículas sólo se observó durante los lavados para eliminar los residuos del fluoróforo, en cambio, cuando se realizaron los lavados para eliminar los residuos del nucleótido EdU no se presentó pérdida alguna.

En un estudio sobre el marcaje de proteínas neuronales, se encontró que los diversos marcadores utilizados emiten diferentes niveles de fondo que pueden reducirse realizando varios pasos de lavado exhaustivos<sup>61</sup>. En consecuencia, para tratar de eliminar los residuos dejados por el fluoróforo, en el siguiente ensayo utilizando una dilución 1/50 de nanopartículas, se agregó un lavado extra con agua libre de nucleasas (cuarto lavado).



**Figura 27.** Detección mediante epifluorescencia del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 amplificado por PCR de 1 ciclo y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1 µL de nanopartículas en una dilución 1/100 y una concentración final del fluoróforo de 0.25 µM. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

Empleando 1  $\mu$ L de una dilución 1/50 de nanopartículas se esperaba que la cantidad de nanopartículas fuera suficiente para obtener una mejor visualización de las secuencias de DNA marcadas sin que se perdieran durante los lavados y que, además, se pudieran eliminar los residuos del fluoróforo. No obstante, como se aprecia en la figura 28, no se detecta fluorescencia ni se observan nanopartículas en las imágenes correspondientes a SC2\_p3 (Fig. 28 A y B), en tanto que en las de BC\_p4 se puede ver que solo hay pocas nanopartículas en la imagen respectiva a las secuencias con EdU (Fig. 28 C) pero no hay fluorescencia; en cuanto a la secuencia sin EdU (Fig. 28 D) se detectó la fluorescencia ocasionada por los residuos del fluoróforo (flechas blancas), aunque a simple vista pareciera que son nanopartículas, no corresponden al tamaño ( $\approx 700$  nm), además que en esta muestra no se recuperaron nanopartículas después de los lavados, por lo que la fluorescencia se puede deber a la formación de cristales por el uso del PBS 10 mM, por otra parte, en el control sin DNA (Fig. 28 E) tampoco se logran visualizar nanopartículas, evidenciando que al añadir un lavado extra (cuarto lavado) prácticamente se eliminan las nanopartículas.

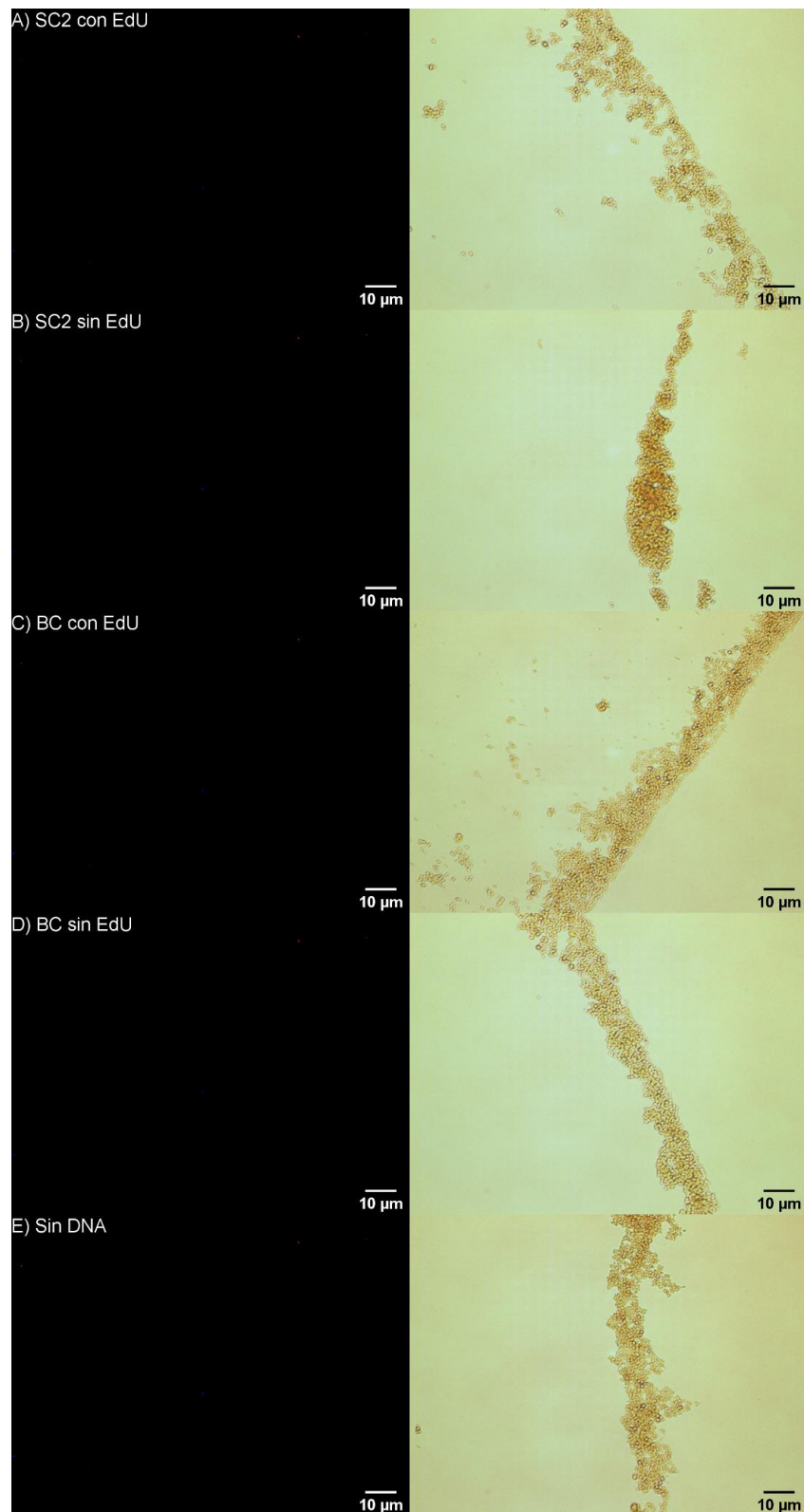


**Figura 28.** Detección del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 amplificado por PCR de 1 ciclo y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1 µL de nanopartículas en una dilución 1/50 y una concentración final del fluoróforo de 0.25 µM. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.



Por lo tanto, para realizar las observaciones de los experimentos con 1 ciclo de PCR se recomienda utilizar 1  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/10 de nanopartículas y hacer solo 3 lavados luego del marcaje (dos con PBS 10 mM y uno con agua libre de nucleasas). Debido a que cuando se usan cantidades menores de nanopartículas, es muy probable que estas se pierdan durante la metodología, impidiendo su observación en el microscopio.

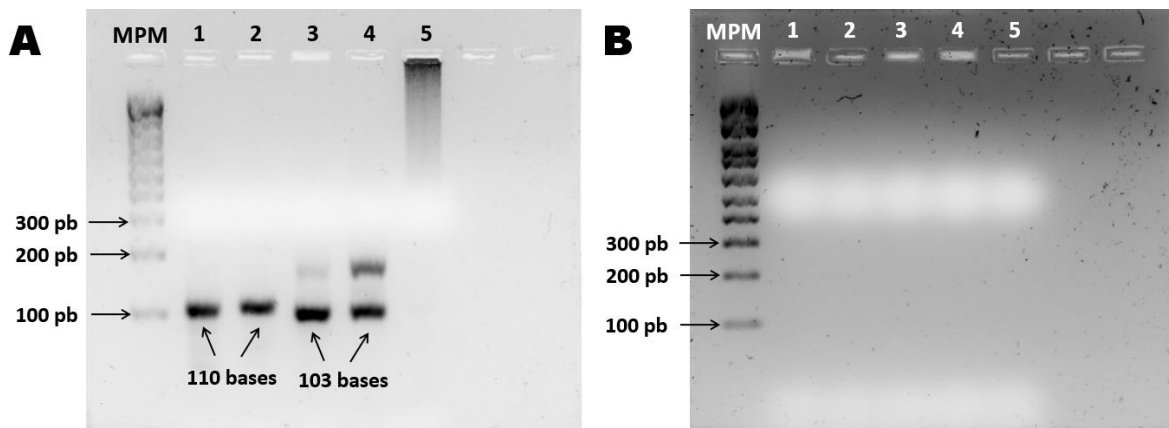
Por otra parte, para comprobar si la adhesión del DNA a las nanopartículas depende del uso de etanol, se realizaron experimentos utilizando los productos de la amplificación por PCR de 1 y 25 ciclos de las secuencias de SC2\_p3 y BC\_p4 en presencia y ausencia de etanol. Los 25  $\mu\text{L}$  de la reacción de PCR de 1 ciclo se colocaron en microtubos de 1.5 mL que contenían 1  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/10 de nanopartículas magnéticas, posteriormente se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y se realizaron los lavados para eliminar los residuos del nucleótido EdU, luego se llevó a cabo el marcaje de las secuencias para observarse en el microscopio (Fig. 29).



**Figura 29.** Detección del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 amplificado por PCR de 1 ciclo y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de nanopartículas en una dilución 1/10, 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y una concentración final del fluoróforo de 0.25  $\mu\text{M}$ . A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

Como se observa en la figura 29 no se percibe fluorescencia en la secuencia marcada de SC3\_p3 (Fig. 29 A) y tampoco en la de BC\_p4 (Fig. 29 C). Con la finalidad de comprobar que la ausencia de fluorescencia se debe a la sustitución del etanol con el agua libre de nucleasas, y que, esto impide que se lleve a cabo la unión de las secuencias de DNA en las nanopartículas, se realizó un experimento utilizando el DNA amplificado por PCR de 25 ciclos.

En microtubos de 1.5 mL que contenían 1  $\mu$ L de nanopartículas magnéticas se depositaron los 25  $\mu$ L de la reacción de PCR, a algunas muestras se les añadieron 100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, mientras que a otras se les añadieron 100  $\mu$ L de etanol 100% de acuerdo con el protocolo. Se agitaron en el vortex durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante utilizando el magnetismo de las nanopartículas empleando un MagRack para realizar la separación. Se recuperaron los sobrenadantes correspondientes a 100  $\mu$ L de agua y 100  $\mu$ L de etanol, respectivamente y se colocaron en microtubos de 1.5 mL, con la finalidad de analizar si había DNA en las muestras recuperadas del etanol 100%. En el caso de las muestras de sobrenadante con etanol, éstas se concentraron usando un equipo Savant SPEED VAC DNA 120 (Thermo Scientific) durante dos horas para eliminar la mayor cantidad de etanol posible. Después de este tiempo, quedaron en los microtubos alrededor de 10  $\mu$ L de etanol a los cuales se les agregó 100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y se agitó brevemente en el vortex. Posteriormente se realizó un gel de agarosa con todas las muestras (Fig. 30), tanto las recuperadas del etanol como de las de agua libre de nucleasas para comprobar si había presencia de DNA en los sobrenadantes recuperados cuando se utiliza etanol para la adhesión y cuando se utilizó agua libre de nucleasas.



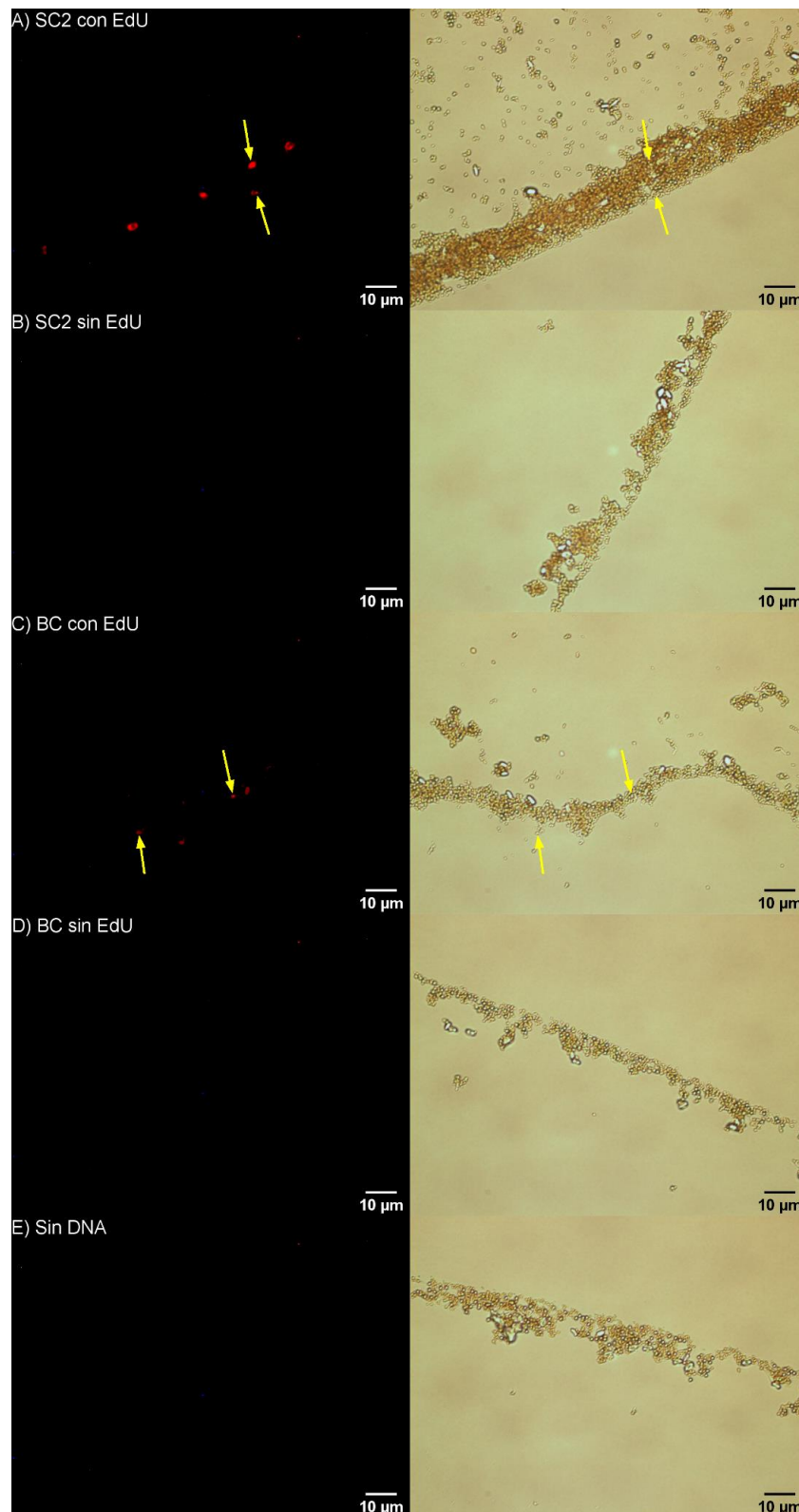
**Figura 30.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las muestras recuperadas de los lavados. En la imagen A que corresponde a las muestras obtenidas después de sustituir el etanol con agua libre de nucleasas se observan las bandas correspondientes a los fragmentos esperados. En la imagen B que corresponde a las muestras obtenidas cuando se utiliza etanol, no se perciben las bandas correspondientes a los tamaños esperados.

Con el protocolo empleado para la inmovilización del DNA en las nanopartículas magnéticas, en el cual se emplea etanol 100%, se esperaba que el DNA quedara unido a las nanopartículas y no lo encontremos en los lavados, sin embargo, cuando agregamos agua libre de nucleasas y no etanol 100% como se indica en la sección 5.8., se observa que el DNA no se adhiere a las nanopartículas, por lo tanto se recupera en el sobrenadante de los lavados (Fig. 30 A), mientras que en el caso del etanol, éste si permite la adhesión del DNA en las nanopartículas y por esta razón no se recupera DNA en el sobrenadante (Fig. 30 B), lo cual es lo que se espera.

Aunque en la información del kit Pure DNA Plant no se especifica el material con el que están recubiertas las nanopartículas y que permite la adhesión del DNA, como se mencionó en los antecedentes, la superficie es recubierta con diferentes tipos de polímeros como silica o con grupos funcionales apropiados que pueden adsorber ácidos nucleicos, entre los más utilizados se encuentran los grupos carboxilo y grupos hidroxilo<sup>32,62</sup>. Los kit comerciales generalmente contienen nanopartículas recubiertas de silica en las que en presencia de una sal y alcohol se unen selectivamente las moléculas de DNA/RNA, mientras que otras impurezas no se adsorben, esto explicaría por qué el etanol no debe ser sustituido en el protocolo de la metodología<sup>63</sup>.

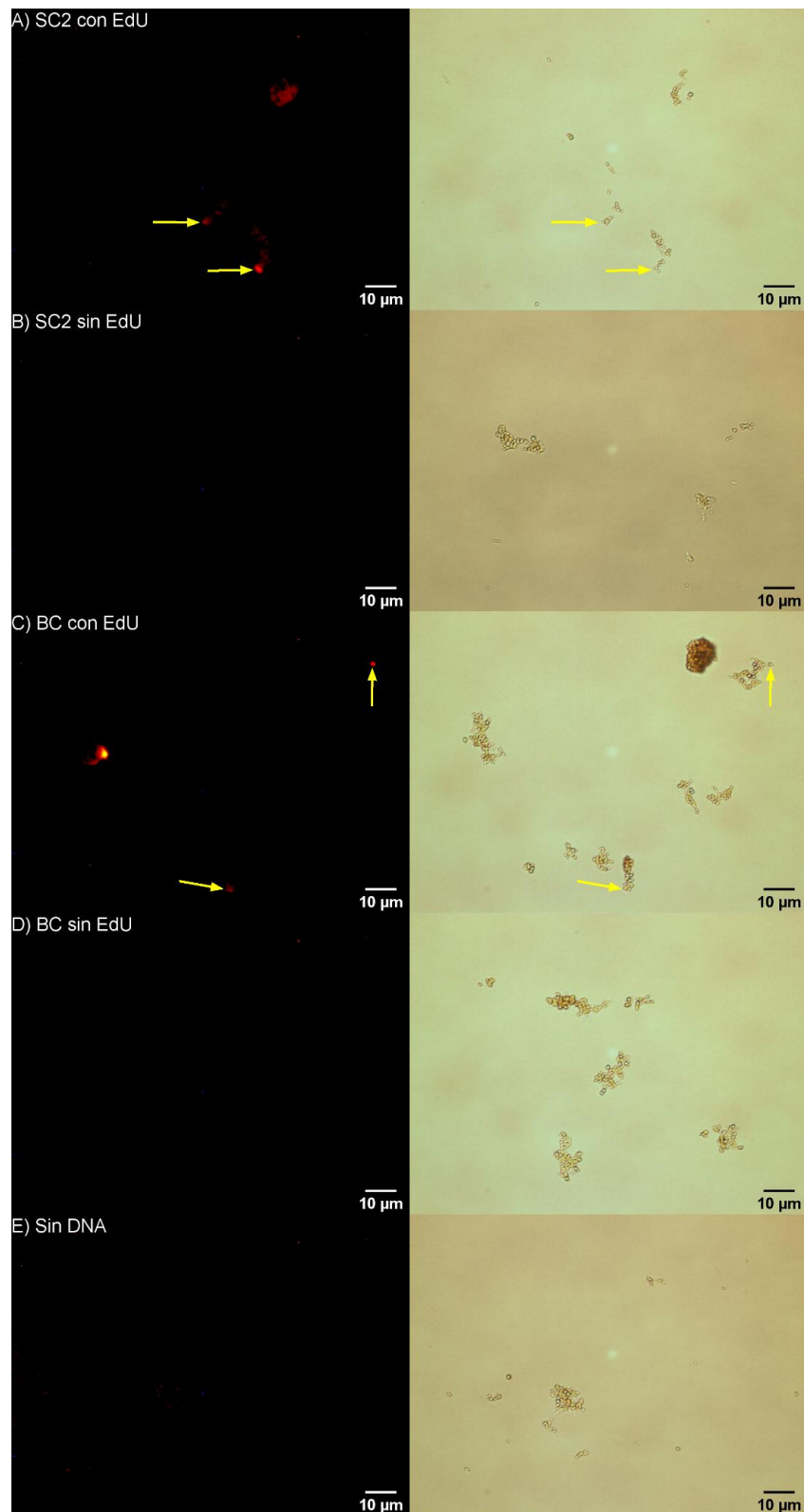
Luego de comprobar que el etanol es irremplazable en el proceso de adhesión del DNA a las nanopartículas, se realizaron dos experimentos utilizando 50 µL de etanol

100% con tiempos de agitación en vortex de 5 y 3 minutos, con la finalidad de comprobar que con tiempos menores se logra inmovilizar el DNA en las nanopartículas de manera adecuada y suficiente para ser detectado y que los tiempos del protocolo sean cortos (Fig. 31 y 32).



**Figura 31.** Detección mediante epifluorescencia del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 amplificado por PCR de 1 ciclo y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1 µL de nanopartículas en una dilución 1/10, 50 µL de etanol 100% con un tiempo en vortex de 5 minutos y una concentración final del fluoróforo de 0.25 µM. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

En el primer experimento con un tiempo de agitación en vortex de 5 minutos, los resultados muestran que bajo estas condiciones también se logra la detección de las secuencias que contienen el nucleótido EdU de SC2\_p3 (Fig. 31 A) y BC\_p4 (Fig. 31 C), mientras que, en el segundo experimento con un tiempo de agitación de 3 minutos, también se logra la detección de las secuencias que contienen el nucleótido EdU SC2\_p3 (Fig. 32 A) y BC\_p4 (Fig. 32 C). Sin embargo, es posible notar que aun usando la misma concentración de nanopartículas (1/10) en ambos ensayos, en un tiempo de agitación de 3 minutos, se observa una menor cantidad de estas, esto se debe probablemente a la variabilidad en el número de nanopartículas que se toman en la muestra de 1  $\mu$ L para su observación en el microscopio.



**Figura 32.** Detección del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 amplificado por PCR de 1 ciclo y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1 µL de nanopartículas en una dilución 1/10, 50 µL de etanol 100% con un tiempo en vortex de 3 minutos y una concentración final del fluoróforo de 0.25 µM. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.



De acuerdo con los resultados anteriores, la cantidad recomendada de nanopartículas para su observación en el microscopio cuando se trabaja con los productos amplificados por PCR con 25, 20 y 10 ciclos es de 1  $\mu\text{L}$  sin diluir, en cambio para los productos amplificados con 1 ciclo se sugiere usar 1  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/10 de las nanopartículas, además queda demostrado que en la metodología para la inmovilización de las secuencias de DNA en las nanopartículas no debe ser reemplazado el etanol 100% y que el procedimiento puede llevarse a cabo ya sea con 100 o 50  $\mu\text{L}$  de etanol, así como en un tiempo de 5 o 3 minutos, requiriendo un tiempo total aproximado de 15 minutos para llevar a cabo la inmovilización.

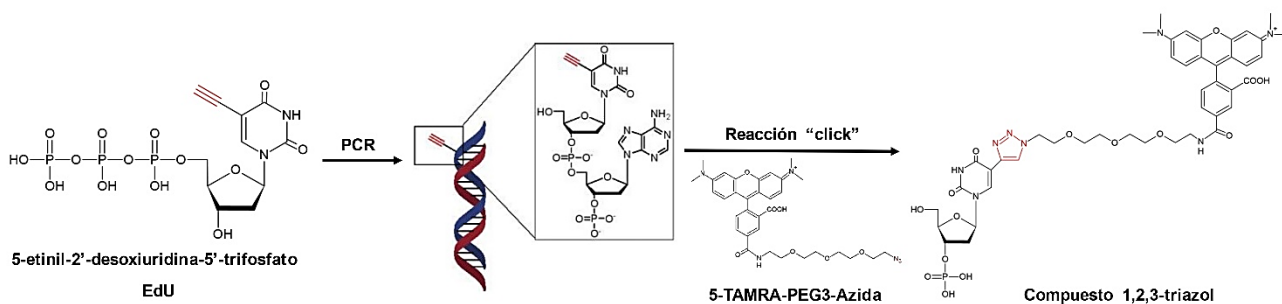
### **6.3. Detección del nucleótido EdU en las secuencias de Betacoronavirus y SARS-CoV-2 mediante el fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-azida**

La mayoría de los métodos utilizados para la detección del DNA durante su replicación se basan en la incorporación de nucleótidos modificados y su posterior detección. Entre los primeros nucleótidos que se usaron se encuentran la [3H]timidina y 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). La [3H]timidina incorporada en el DNA suele detectarse mediante autorradiografía, mientras que la detección de BrdU se realiza inmunológicamente, a través de anticuerpos específicos anti-BrdU. Las principales desventajas de trabajar con estas moléculas son que durante el proceso de detección de la [3H]timidina se requiere la manipulación de material radioactivo y, por lo tanto, seguir una serie de normas de seguridad, mientras que en el caso del BrdU se requieren fuertes condiciones desnaturalizantes para permitir el acceso de los anticuerpos anti-BrdU a la doble cadena de DNA<sup>64</sup>.

En 2008, Salic y Mitchinson publicaron un método alternativo para detectar la síntesis de DNA *in vivo* en células en proliferación, basado en la incorporación del nucleótido 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) y su posterior detección mediante una molécula fluorescente (Alexa-azida), a través de una reacción de cicloadición alquino-azida (CuAAC) catalizada por Cu (I), en la que el grupo alquínico libre en EdU reacciona con el grupo azida presente en el fluoróforo. La principal ventaja de

este método es que los grupos alquino y azida son de tamaño muy pequeño y tienen una reactividad altamente selectiva. Además, en comparación con otros análogos de timidina, el EdU se puede considerar como un reactivo alternativo ideal, ya que no requiere condiciones de desnaturalización y tampoco requiere radiomarcado seguido de métodos de detección complejos. Por lo tanto, la reacción CuAAC es ideal para unir biomoléculas en entornos complejos, como dentro de las células, con alta eficiencia y quimioselectividad<sup>65,66</sup>.

Después de realizar el marcaje del DNA unido a las nanopartículas conforme a la metodología de la sección 5.9., se realizaron las observaciones de las nanopartículas marcadas en un microscopio Nikon Eclipse® Ti-E equipado para epifluorescencia. Se utilizó un set de filtros ópticos que permiten el paso de luz a distintas longitudes de onda. El filtro de excitación de luz verde ( $\lambda = 503 - 548 \text{ nm}$ ) permitirá la excitación de la molécula 5-TAMRA-PEG3-azida cuya longitud de onda de excitación máxima es a 546 nm, emitiendo fluorescencia en una longitud de onda de 579 nm que corresponde a un color amarillo – anaranjado<sup>67</sup>. La presencia de fluorescencia en las nanopartículas indica la formación de un compuesto 1,2,3-triazol en las secuencias de DNA (Fig. 33), con lo que comprobamos la incorporación del nucleótido EdU de tal manera que podemos detectar la presencia del DNA amplificado en los diferentes ciclos.



**Figura 33.** Reacción "click" para el marcaje de EdU incorporado en las secuencias de DNA con el fluoróforo TAMRA. El grupo etinilo presente en la estructura del nucleótido EdU que se encuentra en las secuencias de DNA reacciona con el grupo azida del fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-azida para la formación de un compuesto 1,2,3-triazol que es detectado por microscopía de epifluorescencia. Tomado y modificado de Li, et. al. (2010)<sup>66</sup>.

Todos los ensayos se realizaron, como ya se mencionó anteriormente, utilizando el DNA control y los oligonucleótidos de BC\_p4, SC2\_p3, SC2\_p4 y SC2\_p2, utilizando las mismas condiciones de amplificación variando los ciclos en 25, 20, 10

y 1 según el caso. Luego, se procedió con la inmovilización y marcaje, ajustando la concentración de fluoróforo de acuerdo con el número de ciclos de PCR utilizados, y se realizaron las observaciones al microscopio como se describió anteriormente (sección 5.10.). En todos los casos se realizaron experimentos con una secuencia conservada de la familia de los Betacoronavirus con y sin el nucleótido EdU, una secuencia específica del virus SARS-CoV-2 con y sin el nucleótido EdU y un control al cual no se le agregó DNA.

En los experimentos con las secuencias de SC\_p3 y BC\_p4 se utilizaron las concentraciones de fluoróforo que se indican en la siguiente tabla:

**Tabla 13.** Concentraciones del fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-Azida utilizadas para los experimentos con las secuencias de DNA de BC\_p4 y SC2\_p3.

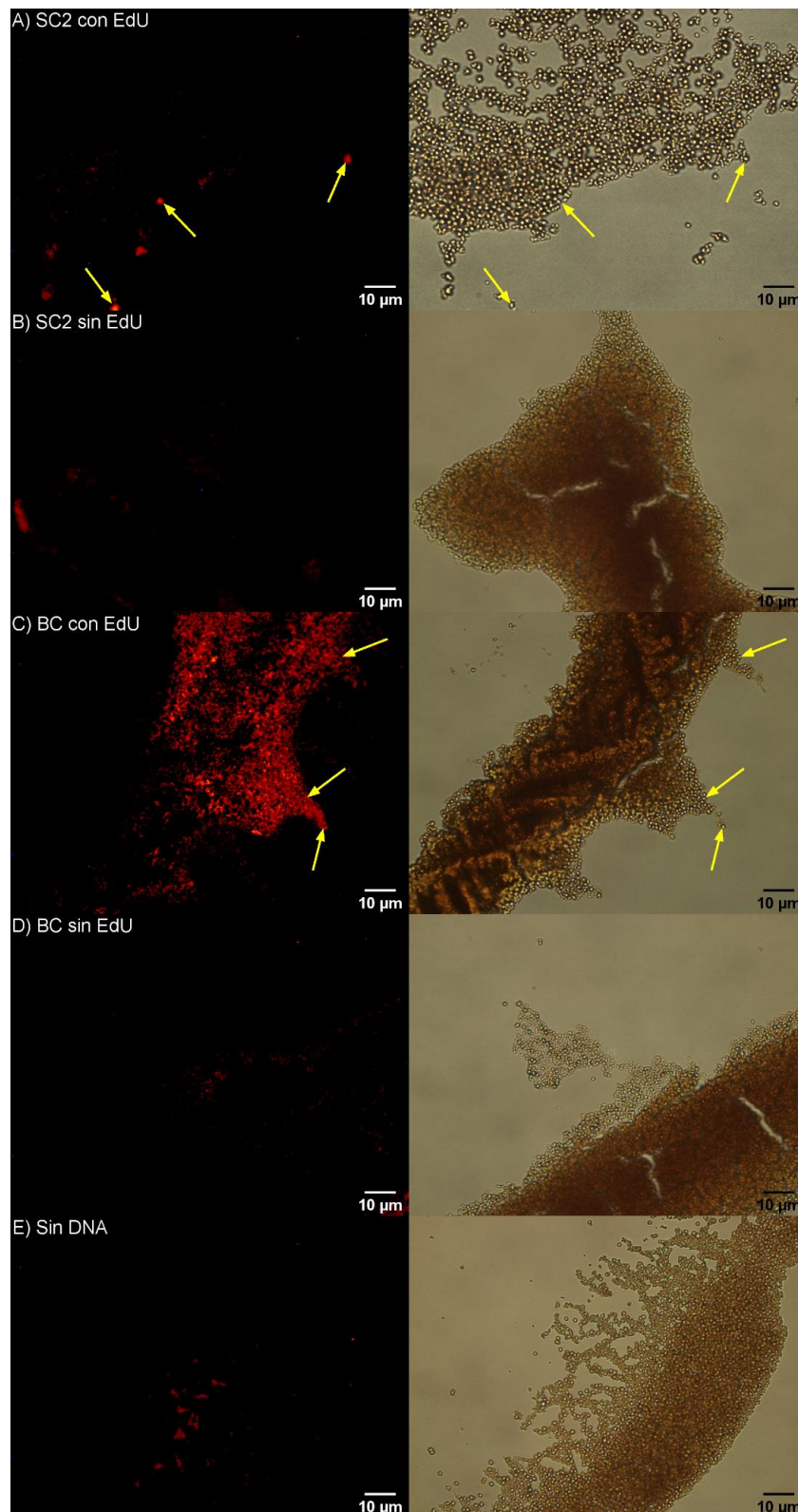
	<b>Concentración stock 5-TAMRA-PEG3-azida (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Concentración final en la reacción (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
PCR 25 ciclos	1	3.6
PCR 20 ciclos	1	2.5
PCR 10 ciclos	0.1	0.25
PCR 1 ciclo	0.1	0.25

En el experimento donde se realizó la amplificación mediante PCR con 25 ciclos y utilizando una concentración final del fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-azida de  $3.6 \mu\text{M}$ , se logró visualizar fluorescencia en las nanopartículas donde se encuentra inmovilizado el DNA que tiene incorporado el nucleótido EdU tanto para SC\_p3 (Fig. 34 A), como para BC\_p4 (Fig. 34 C), estos resultados nos indican que es posible realizar la detección del DNA marcado con EdU con 25 ciclos. Por otra parte, la ausencia de fluorescencia en las secuencias sin EdU (Fig. 34 B y D) demuestra que el marcador fluorescente no se une inespecíficamente a las nanopartículas, evitando resultados falso-positivos, mientras que con el control sin DNA (Fig. 34 E) se verificó que el nucleótido EdU por sí solo no se une a las nanopartículas y, por lo tanto, no reacciona con el fluoróforo, evitándose también un falso positivo.

Aun cuando se obtienen resultados favorables en la detección del DNA durante las observaciones, notamos fluorescencia en el fondo, incluso se observa en los alrededores de las nanopartículas que contienen las secuencias sin el nucleótido EdU (Fig. 34 B, D y E), esto tal vez es provocado por un exceso del fluoróforo y posiblemente, a que es necesario realizar un mayor número de lavados que

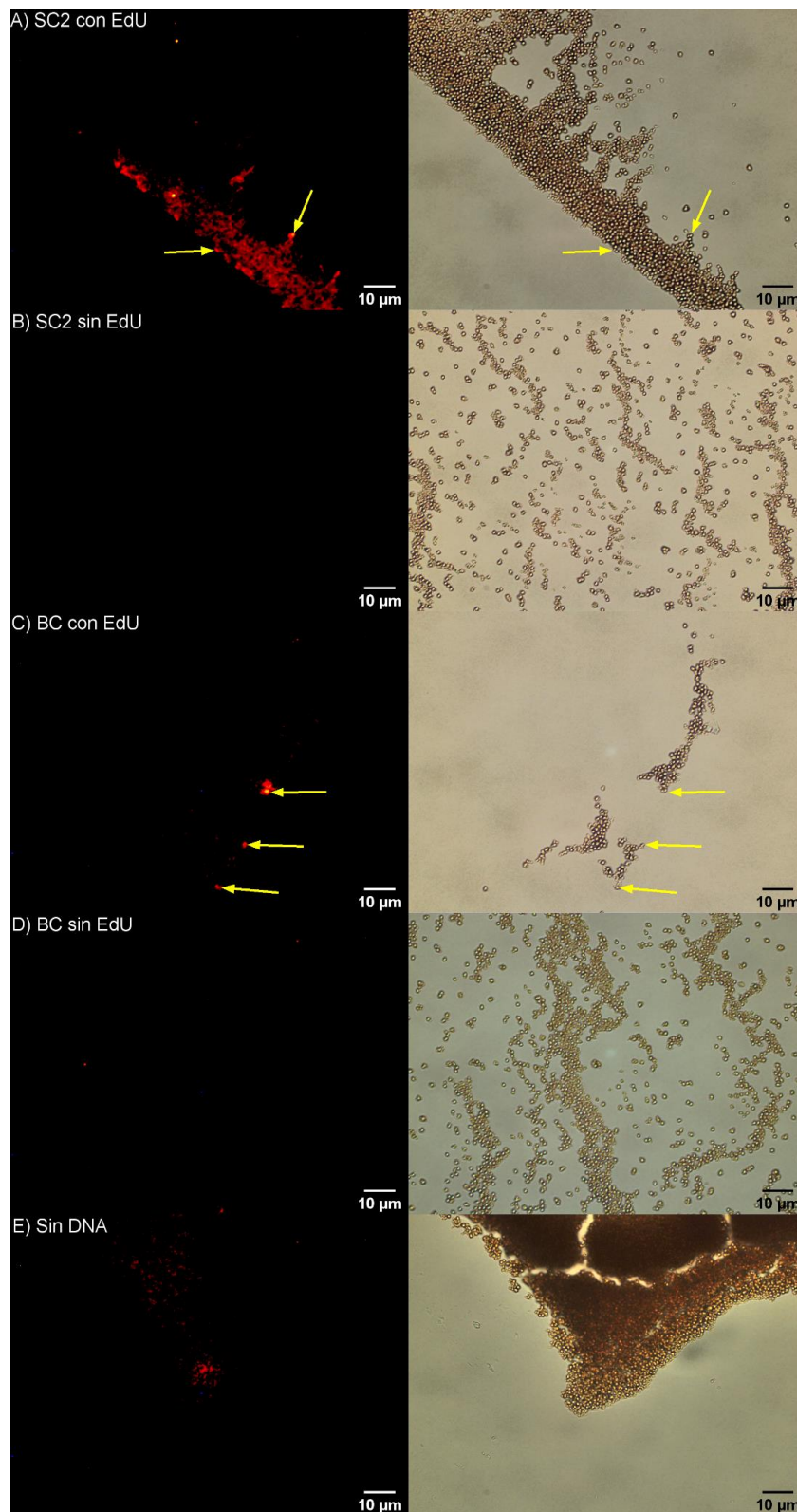
permitan eliminar por completo los residuos de éste, sin embargo, como se mencionó en la sección anterior, un aumento en el número de lavados significa la pérdida de nanopartículas.

Adicionalmente, se realizaron pruebas de detección de fluoróforo en el microscopio sin las nanopartículas y se pudo detectar en concentraciones de 1 pM (datos no mostrados), lo que indica la sensibilidad del fluoróforo y la dificultad de eliminar la fluorescencia de fondo. Por lo anterior, en los siguientes experimentos se utilizó una concentración menor del fluoróforo y se realizó el tercer lavado utilizando agua libre de nucleasas sustituyendo el PBS 10 mM.



**Figura 34.** Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la detección del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 amplificado por PCR de 25 ciclos y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizaron 10  $\mu$ L de nanopartículas sin diluir y una concentración final del fluoróforo de 3.6  $\mu$ M. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

Para los experimentos realizados con el PCR de 20 ciclos, se utilizó una concentración final del fluoróforo de 2.5  $\mu\text{M}$ , después de realizar el marcaje se realizaron dos lavados con PBS 10 mM y un tercer lavado con agua libre de nucleasas. Con estas condiciones, nuevamente se logró detectar fluorescencia en las nanopartículas donde se encuentra inmovilizado el DNA que tiene incorporado el nucleótido EdU en SC\_p3 (Fig. 35 A) y BC\_p4 (Fig. 35 C), por lo cual, confirmamos que también es posible la detección del DNA marcado con EdU con 20 ciclos. Además, se reafirma que el fluoróforo no se une inespecíficamente a las nanopartículas que contienen las secuencias sin EdU debido a la falta de fluorescencia en éstas (Fig. 35 B y D) y que el nucleótido EdU tampoco es capaz de unirse a las nanopartículas sin DNA y reaccionar con el fluoróforo (Fig. 35 E). Sin embargo, a pesar de las modificaciones realizadas en la concentración del marcador y los lavados, se siguió observando fluorescencia de fondo alrededor de las nanopartículas de la muestra sin DNA (Fig. 35 E), por esta razón, una vez más se modificó la concentración del fluoróforo.

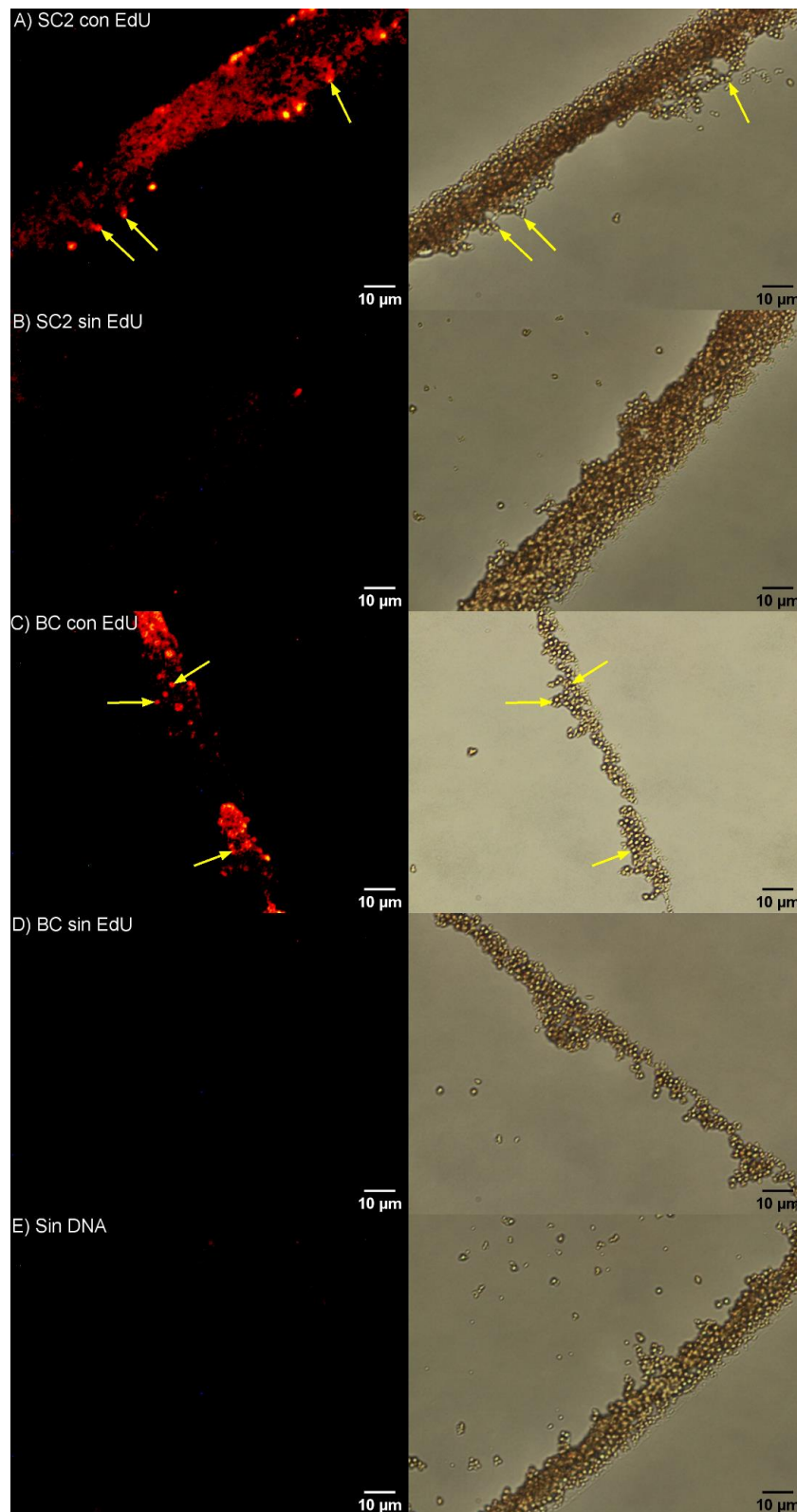


**Figura 35.** Detección mediante microscopía de epifluorescencia del DNA marcado con TAMRA de BC\_p4 y SC2\_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 amplificado por PCR de 20 ciclos y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1  $\mu$ L de nanopartículas sin diluir y una concentración final del fluoróforo de 2.5  $\mu$ M. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

Empleando las mismas condiciones que en el ensayo anterior con 20 ciclos, pero utilizando los productos de amplificación de 10 ciclos realizados por PCR y una concentración final del fluoróforo de 0.25  $\mu$ M, nuevamente se logró la detección de fluorescencia en las nanopartículas donde se encuentran inmobilizadas las secuencias de DNA marcadas de SC2\_p3 (Fig. 36 A) así como las de BC\_p4 (Fig. 36 C) y, como se esperaba, no se observó fluorescencia en las secuencias que no contienen el nucleótido EdU (Fig. 36 B y D). La fluorescencia que es perceptible en el panel B de la figura 36 no corresponde al tamaño de las nanopartículas por lo que podría tratarse de residuos del fluoróforo como se observó en la figura 27. Además, en el control sin DNA (Fig. 36 E) tampoco observamos fluorescencia que corresponda a la ubicación de las nanopartículas, únicamente se observa fluorescencia de fondo como en la figura 35 E aun cuando se modificó la concentración de fluoróforo.

Por otra parte, debido a que en las concentraciones del fluoróforo TAMRA anteriormente probadas no se logra eliminar por completo el fondo, en este experimento se utilizó una concentración 10 veces menor del fluoróforo, con respecto a la concentración utilizada en los ensayos con el PCR de 20 ciclos, con la finalidad de que los residuos del fluoróforo no interfieran con los resultados. Con esta concentración menor se observó la disminución de los residuos en el fondo y en consecuencia menor fluorescencia.

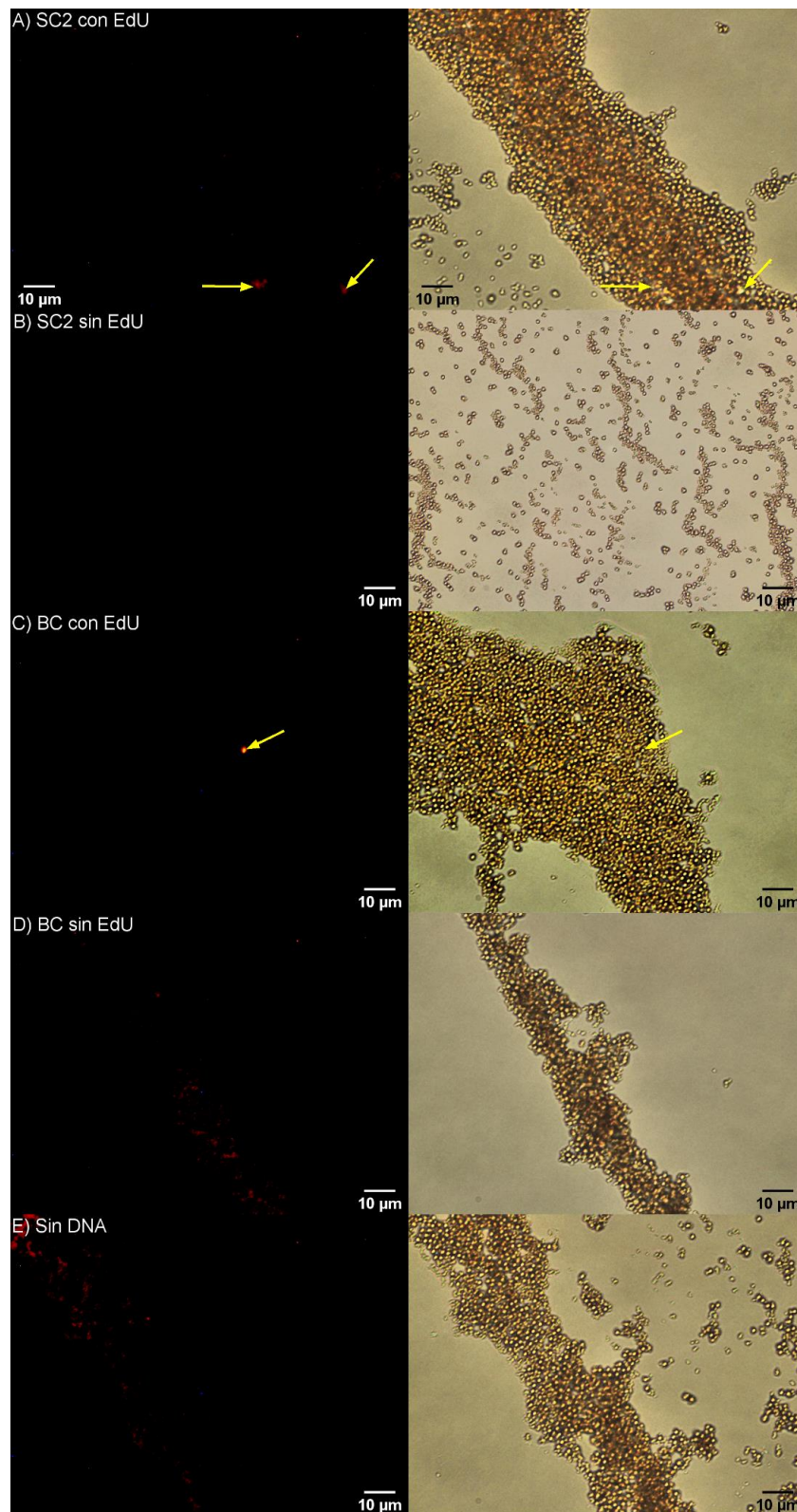




**Figura 36.** Detección del DNA marcado con TAMRA de BC\_p4 y SC2\_p3. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 amplificado por PCR de 10 ciclos, adsorbido en nanopartículas magnéticas y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1 µL de nanopartículas sin diluir y una concentración final del fluoróforo de 0.25 µM. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

Basándose en los resultados obtenidos en los experimentos con el PCR de 10 ciclos descritos anteriormente, en los ensayos realizados con las secuencias amplificadas por PCR de 1 ciclo usando las mismas condiciones, también se logró la detección del DNA marcado en las secuencias con EdU de SC2\_p3 (Fig. 37 A) y BC\_p4 (Fig. 37 C), de igual manera no se observa fluorescencia en las nanopartículas que contienen las secuencias de DNA control sin EdU de SC2\_p3 (Fig. 37 B) y BC\_p4 (Fig. 37 D), así como en el control sin DNA (Fig. 37 E), obteniéndose resultados similares a los experimentos con 25, 20 y 10 ciclos, con lo que se confirma que el método es aplicable con poco DNA (un solo ciclo).

Además, se observó que menos nanopartículas exhiben fluorescencia, lo que se puede explicar con el hecho de que se amplifica menos DNA durante el único ciclo en la reacción de PCR, comparado con las amplificaciones de 10, 20 y 25 ciclos (ver tablas en anexo).

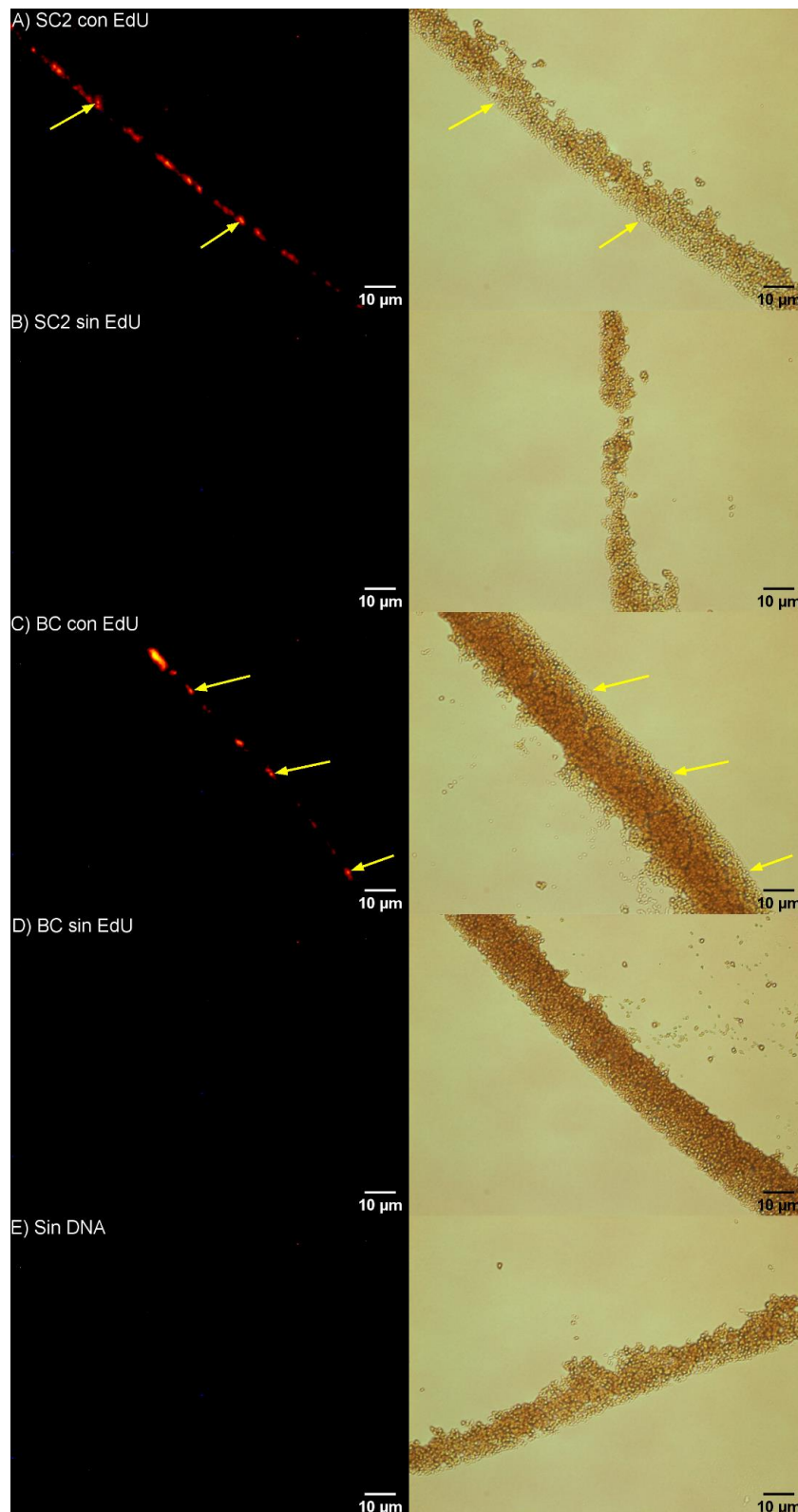


**Figura 37.** Detección del DNA marcado con TAMRA de BC\_p4 y SC2\_p3 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p3 amplificado por PCR de 1 ciclo y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1 µL de nanopartículas en una dilución 1/10 y una concentración final del fluoróforo de 0.25 µM. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la concentración de fluoróforo adecuada es de 0.25  $\mu\text{M}$  debido a que con esta concentración es posible la detección de las secuencias de DNA obtenidas con 1 ciclo de PCR y también se observa menor fluorescencia de fondo. En el caso de los lavados posteriores al marcaje, como se mencionó anteriormente, lo ideal es realizar solo tres lavados, dos con PBS 10 mM y uno con agua libre de nucleasas.

Con las condiciones establecidas anteriormente para las secuencias de SC2\_p3 y BC\_p4, se realizaron experimentos replicando estas condiciones consideradas las adecuadas para llevar a cabo la metodología, pero utilizando otra secuencia diferente que es SC2\_p4 con la finalidad de establecer si estas condiciones son ideales usando diferentes secuencias. Como se observa en la figura 38, utilizando 1  $\mu\text{L}$  de nanopartículas sin diluir para la inmovilización de las secuencias de DNA de SC2\_p4, se obtiene una mejor visualización al microscopio comparado con el experimento de la secuencia de SC2\_p3 realizado anteriormente (Fig. 34). También se observa que al disminuir la concentración final del fluoróforo se logra una mejor visualización de la fluorescencia en las nanopartículas en contraste con los resultados obtenidos previamente, además, al sustituir el tercer lavado con agua libre de nucleasas en lugar de PBS 10 mM se logró disminuir el fondo de forma que apenas era perceptible en las imágenes.

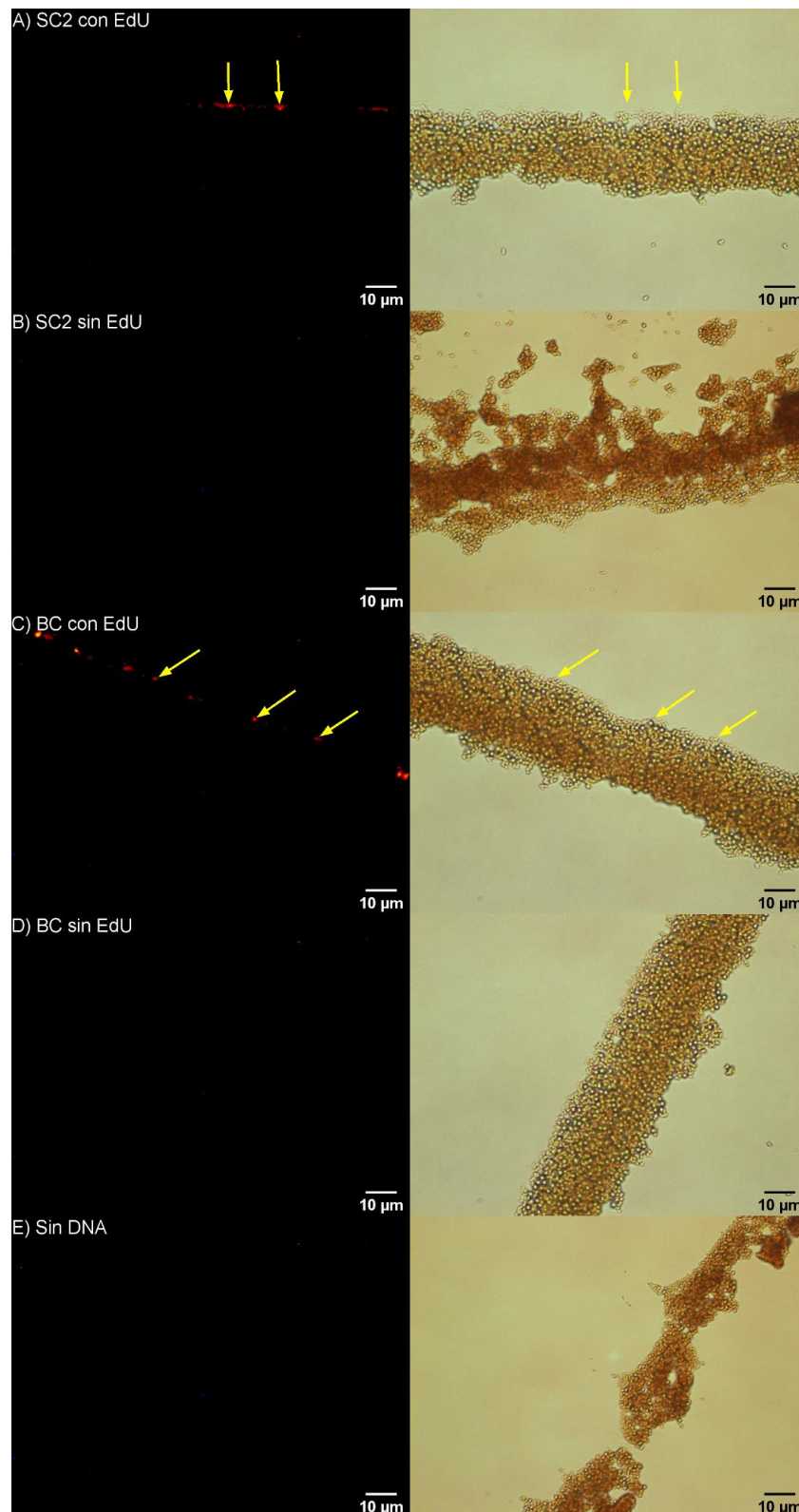
Como alternativa para eliminar la fluorescencia de fondo que todavía era visible, se probó lavar los portaobjetos con etanol 100% para remover cualquier componente que estuviera presente en la superficie y que pudiera estar interactuando con los residuos de las moléculas del fluoróforo, facilitando que se adhieran a su superficie. Con esta acción, se observa que hay una disminución de la fluorescencia inespecífica en el fondo.



**Figura 38.** Imágenes de epifluorescencia de la detección del DNA de BC\_p4 y SC2\_p4 adsorbido a nanopartículas magnéticas y marcado con el fluoróforo TAMRA. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p4 amplificado por PCR de 25 ciclos y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1 µL de nanopartículas sin diluir y una concentración final del fluoróforo de 0.25 µM. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

De igual manera, en los experimentos realizados con el PCR de 20 ciclos bajo las mismas condiciones, se obtuvieron resultados similares siendo más claramente visibles las nanopartículas donde se encuentra inmovilizado el DNA que tiene incorporado el nucleótido EdU marcado (Fig. 39 A y C), mientras que en las nanopartículas que contienen las secuencias sin EdU no se percibe fluorescencia (Fig. 39 B y D) así como en el control sin DNA (Fig. 39 E). Aunque el lavado con etanol 100% de los portaobjetos no elimina por completo la fluorescencia de fondo, se nota una disminución en comparación con los experimentos anteriores donde no se realizaba ningún tratamiento.

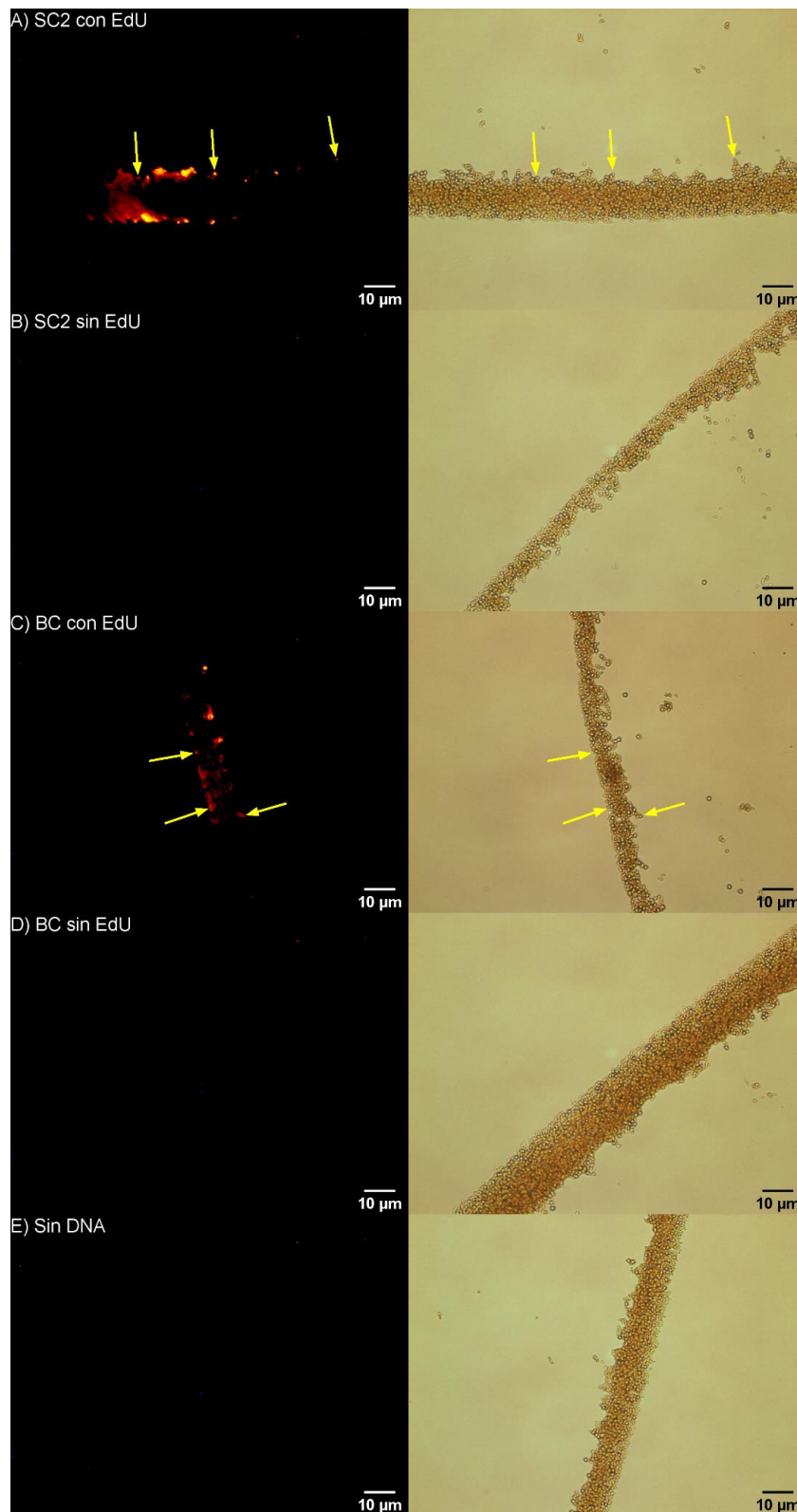




**Figura 39.** Detección mediante microscopía de epifluorescencia del DNA marcado con TAMRA de BC\_p4 y SC2\_p4 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p4 amplificado por PCR de 20 ciclos y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de nanopartículas sin diluir y una concentración final del fluoróforo de 0.25  $\mu\text{M}$ . A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

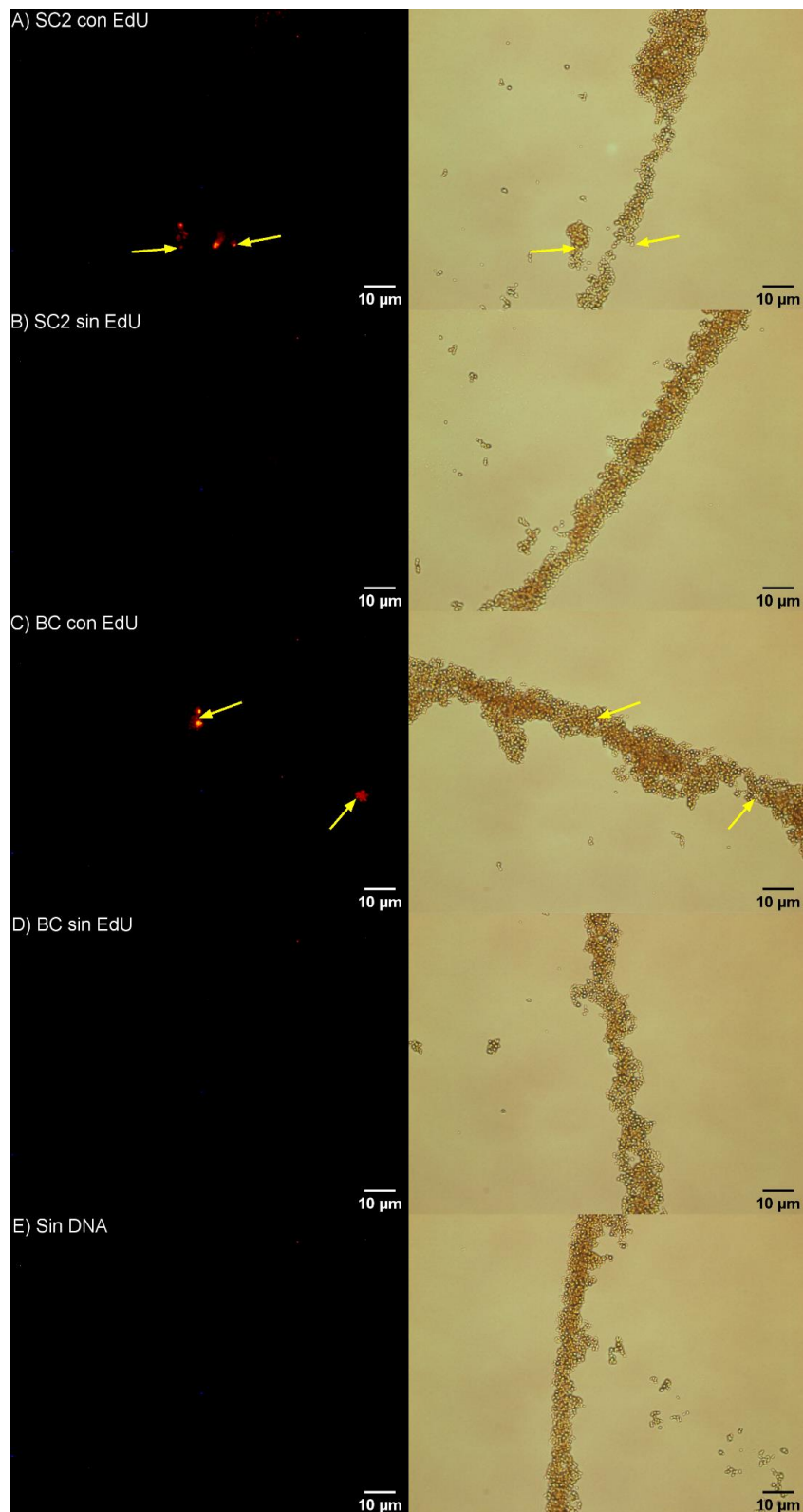
Como se esperaba, en los experimentos usando los productos de amplificación de PCR obtenidos con 10 ciclos y las mismas condiciones probadas anteriormente, pero con una concentración final de fluoróforo de 0.25  $\mu\text{M}$ , se logró nuevamente la detección de fluorescencia en las nanopartículas que tienen inmovilizadas las secuencias de DNA marcada de SC2\_p3 (Fig. 40 A) y BC\_p4 (Figura 40 C). Así mismo, las secuencias sin el nucleótido EdU y el control sin DNA no mostraron fluorescencia (Figura 40 B, D y E).





**Figura 40.** Detección del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p4 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p4 amplificado por PCR de 10 ciclos y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de nanopartículas sin diluir y una concentración final del fluoróforo de 0.25  $\mu\text{M}$ . A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

Para la detección de los productos de amplificación de PCR de 1 ciclo, se utilizó una concentración de 1/10 de nanopartículas magnéticas, así como una concentración final de fluoróforo de 0.25  $\mu\text{M}$ , con estas condiciones se pudo detectar la presencia de fluorescencia en las nanopartículas que tienen inmovilizadas las secuencias de DNA marcada de SC2\_p3 (Fig. 41 A) y BC\_p4 (Figura 41 C), no así en las secuencias sin el nucleótido EdU y el control sin DNA no mostraron fluorescencia (Figura 41 B, D y E), obteniendo resultados semejantes a los experimentos anteriores.



**Figura 41.** Detección del DNA marcado con el fluoróforo TAMRA de BC\_p4 y SC2\_p4 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p4 amplificado por PCR de 1 ciclo y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de nanopartículas en una dilución 1/10 y una concentración final del fluoróforo de 0.25  $\mu\text{M}$ . A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

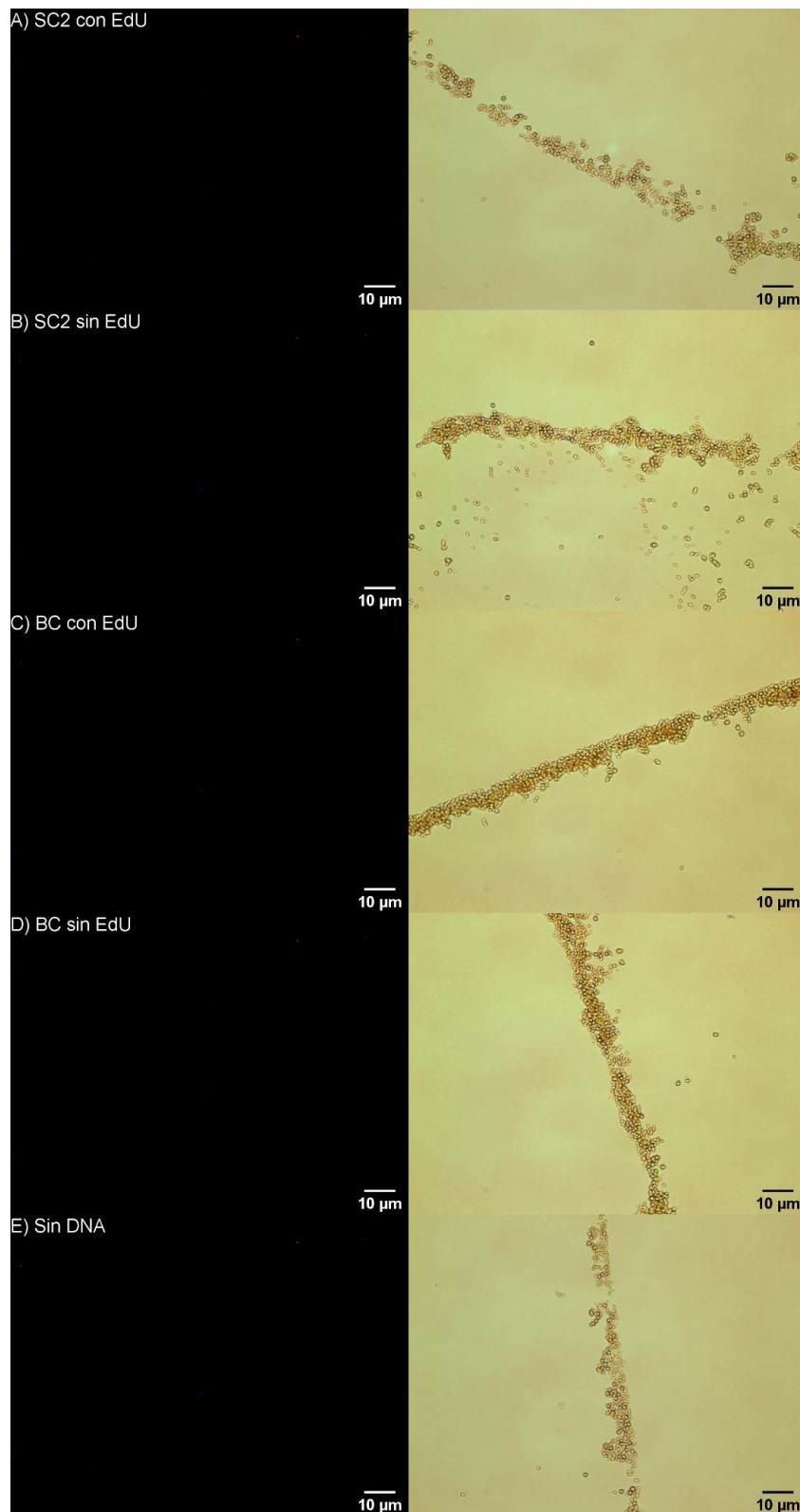
Con la finalidad de eliminar la fluorescencia de fondo que se ha mantenido a lo largo de todos los experimentos, se decidió modificar la forma en que se realizaban los lavados después de realizar el proceso de marcaje con el fluoróforo, por lo que al observar que después de realizar el último lavado (tercer lavado) con agua libre de nucleasas, la fluorescencia de fondo disminuye en comparación con los experimentos donde se realizan los tres lavados con PBS 10 mM, se realizaron ensayos efectuando los lavados únicamente con agua libre de nucleasas (Fig. 42).

Debido a que en los experimentos anteriores donde se realizaba el último y único lavado con agua se lograba la detección de las secuencias de DNA marcadas sin perderlo, se esperaba que esta modificación del protocolo no interfiriera en la detección del DNA marcado y al mismo tiempo permitiera que se eliminaran por completo los residuos del fluoróforo que no reaccionaron y que se detectan en el fondo como ruido. Sin embargo, aunque con los lavados únicamente con agua no se observa fluorescencia de fondo, tampoco se logró detectar la fluorescencia en las nanopartículas que contienen las secuencias marcadas (Fig. 42 A y C), lo que indica que hay una pérdida de DNA.

El DNA es soluble en una solución de baja fuerza iónica, como lo es el agua libre de nucleasas. Por lo que cuando se aplica este tipo de solución a una membrana de sílice, el DNA se libera de ésta<sup>32,68</sup>. Esto puede explicar porque se pierde el DNA cuando se lavan las nanopartículas con el DNA inmovilizado únicamente con agua después del marcaje.

Para evitar que el DNA se liberara de las nanopartículas cuando se realizan los 3 lavados con agua libre de nucleasas, se probó realizar los lavados con diferentes volúmenes de agua, en el primero se utilizaron 200  $\mu$ L y en los siguientes dos, 100  $\mu$ L.

Aunque con esta modificación se logra eliminar por completo la fluorescencia de fondo, nuevamente al realizar los lavados utilizando únicamente agua libre de nucleasas, sin importar el volumen, se pierden las secuencias de DNA, debido a lo cual, solo es recomendable realizar el último lavado con agua libre de nucleasas para disminuir los residuos del fluoróforo.



**Figura 42.** Imágenes de microscopía de epifluorescencia de las muestras de DNA de BC\_p4 y SC2\_p4 marcado con TAMRA después de los lavados con agua libre de nucleasas. Para la inmovilización del DNA se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de nanopartículas en una dilución 1/10, para el marcaje se utilizó una concentración final del fluoróforo de 0.25  $\mu\text{M}$  y se realizaron 3 lavados con agua libre de nucleasas. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

Después de realizar los experimentos con una nueva secuencia de SARS-CoV-2, con base en los resultados obtenidos con las dos secuencias SC2\_p3 y SC2\_p4, las condiciones que consideramos adecuadas para la detección de las secuencias amplificadas son: utilizar 1  $\mu$ L de nanopartículas magnéticas sin diluir para la inmovilización de las secuencias amplificadas por PCR con 25, 20 y 10 ciclos, mientras que en los productos amplificados con 1 ciclo se recomienda usar 1  $\mu$ L de una dilución 1/10. Asimismo, se sugiere emplear 100  $\mu$ L de etanol 100% para la adsorción del DNA a las nanopartículas magnéticas y para realizar el marcaje de las secuencias una concentración final de 0.25  $\mu$ M del fluoróforo TAMRA es adecuada para la detección del DNA de varias secuencias de forma que aun cuando se alcance a percibir fluorescencia de fondo, esta no interfiera.

El tiempo empleado para realizar los lavados después de la reacción (30 minutos) para el marcaje del nucleótido EdU fue de alrededor de 15 minutos, para un total de 45 minutos. Adicionalmente para la detección de las secuencias de DNA marcadas en el microscopio de epifluorescencia se necesitó un tiempo aproximado entre 10 a 15 minutos, por lo que, el tiempo total de la metodología usando el fluoróforo TAMRA desde la preparación de las secuencias hasta la detección de la muestra es de 1 hora 45 minutos a 2 horas.

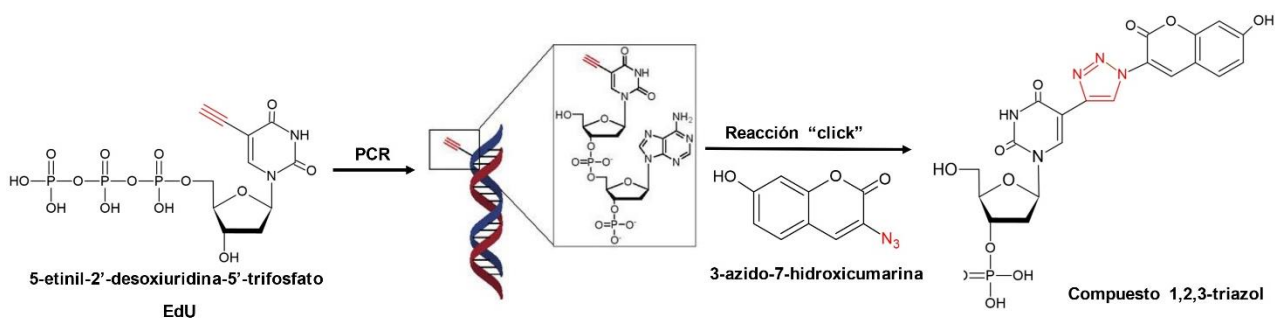
#### **6.4. Detección del nucleótido EdU en las secuencias de Betacoronavirus y SARS-CoV-2 mediante el fluoróforo Cumarina**

Aun cuando la metodología utilizando el fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-azida funciona con dos secuencias distintas de DNA de SARS-CoV-2 (SC2\_p3 y SC2\_p4) y con la secuencia conservada de la familia de los Betacoronavirus (BC\_p4), se exploraron diferentes alternativas que permitieran mejorar la metodología de detección optimizando los métodos lavado y, al mismo tiempo, buscando una forma de eliminar la fluorescencia de fondo que todavía era perceptible con diferentes modificaciones al protocolo. Después de investigar diferentes opciones se decidió utilizar un nuevo fluoróforo teniendo en cuenta, además, el optimizar el tiempo en

que se realiza el marcaje de las secuencias de DNA y usando las mismas condiciones ya establecidas para la amplificación y la inmovilización del DNA.

Li, K. et al.<sup>66</sup> en 2010 reportó que durante la proliferación celular se puede detectar el DNA a través de la incorporación del nucleótido EdU y su posterior marcaje utilizando el fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina (cumarina), un compuesto pro-fluorogénico que da origen a un producto 1,2,3-triazol fluorescente (Fig. 43) sólo después de la reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC).

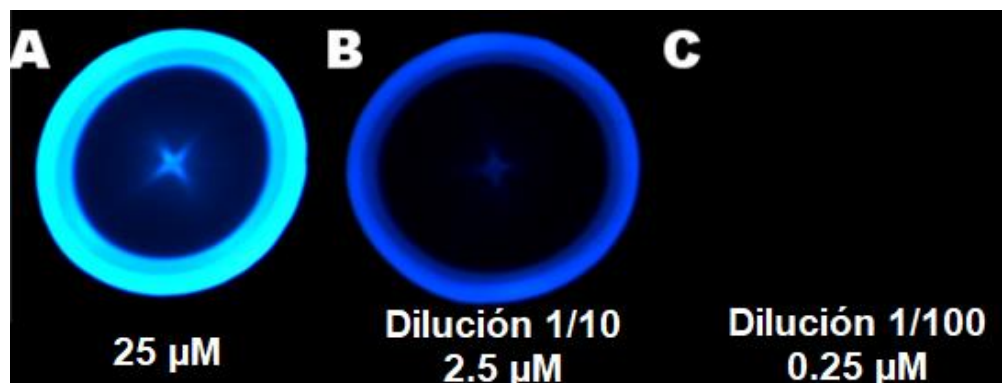
Con este nuevo método se elimina la fluorescencia residual ya que las moléculas del fluoróforo que no han reaccionado son ópticamente inactivas. Por lo tanto, el procedimiento no requiere extensos pasos de lavado para eliminar los residuos que no reaccionaron, lo que permite una visualización inmediata después de la reacción.



**Figura 43.** Reacción "click" para el marcaje de EdU incorporado en las secuencias de DNA con el fluoróforo cumarina. El grupo etinilo presente en la estructura del nucleótido EdU que se encuentra en las secuencias de DNA reacciona con el grupo azida del fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina para la formación de un compuesto 1,2,3-triazol que es detectado por microscopía de epifluorescencia. Tomado y modificado de Li, et. al. (2010)<sup>66</sup>.

En primer lugar, se realizaron ensayos para determinar la concentración mínima en la cual se podía detectar el fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina en el microscopio. En un microtubo de 1.5 mL se colocaron 10 µL del nucleótido EdU y 10 µL de la solución de marcaje, a continuación, se dejó incubando a temperatura ambiente protegido de la luz durante 30 minutos. Una vez terminado este tiempo, se colocó 1 µL de la mezcla del microtubo en un portaobjetos previamente lavado con etanol 100% y se observaron en el microscopio (Fig. 44 A), la concentración final del fluoróforo en la reacción fue de 25 µM. Después, con la menor exposición a la luz posible se realizó una dilución 1/10 de la muestra original para obtener una concentración del fluoróforo igual a 2.5 µM (Fig. 44 B) donde todavía es posible

observar fluorescencia. Posteriormente se realizó una segunda dilución 1/10 a partir de la primera dilución (Fig. 44 C) para una concentración igual a 0.25  $\mu\text{M}$ , en donde ya no se detectó fluorescencia, por lo tanto, de acuerdo con estos ensayos, la concentración mínima del fluoróforo cumarina que puede ser detectada en el microscopio es cercano a los 2.5  $\mu\text{M}$ .



**Figura 44.** Ensayos de concentración para la detección del fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina (cumarina). A) Concentración 25  $\mu\text{M}$ , B) Dilución 1/10 concentración 2.5  $\mu\text{M}$  y C) Dilución 1/100 concentración 0.25  $\mu\text{M}$ .

Una vez que se determinó la concentración de cumarina que puede detectarse en el microscopio, se realizaron los experimentos para determinar si el nuevo fluoróforo funciona bajo las condiciones ya establecidas de la metodología con TAMRA.

Para llevar a cabo los ensayos se utilizó una nueva secuencia de DNA de SC2, SC2\_p2, al igual que en los experimentos anteriores, los ensayos se realizaron usando la secuencia SC2\_p2 con y sin el nucleótido EdU, así como la secuencia de BC\_p4 con y sin el nucleótido EdU y el control sin DNA. La preparación de la mezcla se PCR se realizó como se indica en la tabla 6 y la amplificación de las secuencias de DNA se realizó bajo las siguientes condiciones de PCR:

**Tabla 14.** Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación de las secuencias de SC2\_p2 y BC\_p4.

Paso		Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
Desnaturalización inicial		94	3 minutos
Ciclos 25 y 1	Desnaturalización	94	45 segundos
	Alineamiento	68	30 segundos
	Extensión	72	90 segundos
Extensión Final		72	10 minutos



Al finalizar la reacción de PCR, los 25  $\mu\text{L}$  de la reacción con los productos de amplificación se colocaron en microtubos de 1.5 mL los cuales tenían 1  $\mu\text{L}$  de nanopartículas sin diluir para los productos amplificados por PCR con 25 ciclos y 1  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/10 para los productos obtenidos por PCR con 1 ciclo. A continuación, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de etanol 100% y se colocaron en el vortex por 5 minutos a 1100 rpm, se centrifugaron por 15 segundos y se colocaron en el MagRack™6 para eliminar el etanol. Posteriormente se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado 1 (incluido en el kit Pure DNA Plant), se colocaron en vortex por 1 minuto a 1100 rpm, se centrifugaron 15 segundos, se colocaron en el MagRack por 2 minutos para eliminar el sobrenadante, después se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado 2 (incluido en el kit Pure DNA Plant) y se repitió el procedimiento del primer lavado.

Para realizar el marcaje de las secuencias que se encuentran adsorbidas en las nanopartículas, se utilizó una concentración de 0.5 mM del fluoróforo cumarina, se decidió utilizar esta concentración debido a que es la adecuada para realizar la detección del DNA cuando tiene incorporado EdU (datos no mostrados). La solución de marcaje se preparó como se indica en la siguiente tabla:

**Tabla 15.** Componentes de la solución de marcaje con el fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina.

Material	Número de Ensayos: 1
PBS	43.8 $\mu\text{L}$
Solución Catálisis	1 $\mu\text{L}$
Fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina (10 mM)	0.5 $\mu\text{L}$
Buffer aditivo (10x)	5 $\mu\text{L}$
Volumen total	50 $\mu\text{L}$

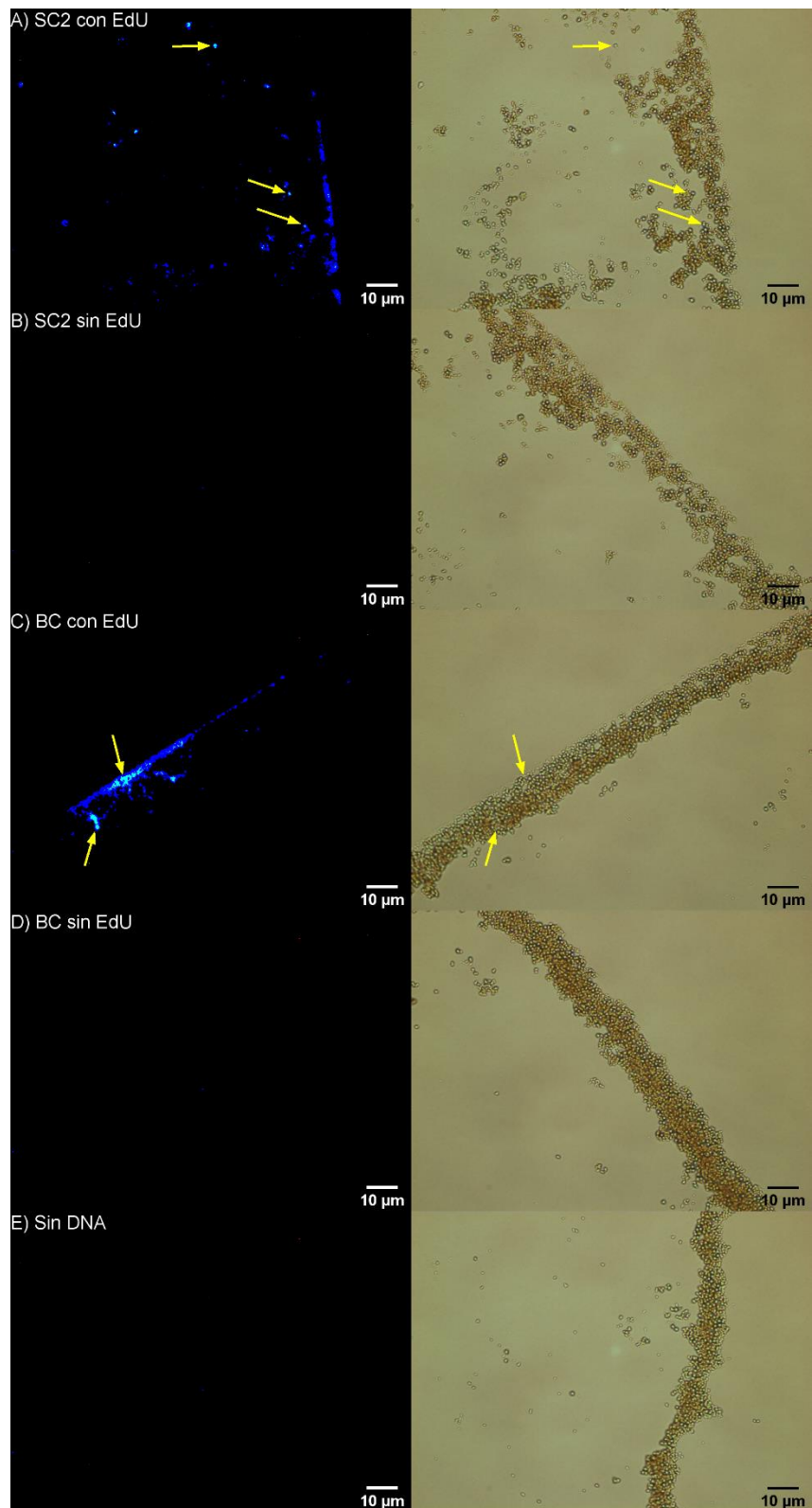
**IMPORTANTE:** Si los componentes no se agregan en el orden indicado, la reacción no se desarrollará de manera óptima: una vez preparado se debe utilizar inmediatamente o al menos en los próximos 15 minutos.

Se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución de marcaje preparada en cada microtubo y se incubó durante 30 minutos en el vortex a 500 rpm, a temperatura ambiente y protegido de la luz; transcurrido este tiempo y con la menor exposición a la luz, se colocaron nuevamente los microtubos en el MagRack™6 por 2 minutos para eliminar los 10  $\mu\text{L}$  de la solución de marcaje. No se realizaron lavados para eliminar los residuos del fluoróforo sin reaccionar. Para la observación en el microscopio Nikon Eclipse® Ti-E, las nanopartículas se resuspendieron en 10  $\mu\text{L}$  de agua libre

de nucleasas, a continuación, se tomó 1  $\mu$ L de cada uno de los microtubos y se colocó en un portaobjetos que previamente se lavó con etanol 100% y se eliminó el líquido (agua) en que se encontraban suspendidas.

En esta ocasión se utilizó un set de filtros ópticos para DAPI. El filtro de excitación de luz verde ( $\lambda = 370 - 420$  nm) permitirá la excitación de la molécula 3-azido-7-hidroxicumarina cuya longitud de onda de excitación máxima es a 404 nm, emitiendo fluorescencia en una longitud de onda de 477 nm que corresponde a un color azul.

Bajo las condiciones descritas, en el primer experimento utilizando los productos de amplificación por PCR con 25 ciclos y una concentración final del fluoróforo cumarina de 0.5 mM, se detectó fluorescencia en las nanopartículas que contienen las secuencias de DNA marcadas de SC2 y BC (Fig. 45 A y C), en el caso de las secuencias control, así como el control sin DNA no se detecta fluorescencia alguna (Fig. 45 B, D y E). Además, con el fluoróforo cumarina no se observó fluorescencia de fondo como se había visto en los experimentos utilizando el fluoróforo TAMRA, confirmando que no es necesario realizar los lavados para eliminar las moléculas del fluoróforo que no reaccionaron como ya lo había reportado Li, K. *et. al.*, en 2010<sup>66</sup>.



**Figura 45.** Detección mediante microscopía de epifluorescencia del DNA marcado con cumarina de BC\_p4 y SC2\_p2 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p2 amplificado por PCR de 25 ciclos y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1  $\mu$ L de nanopartículas sin diluir y una concentración final del fluoróforo de 0.5 mM. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

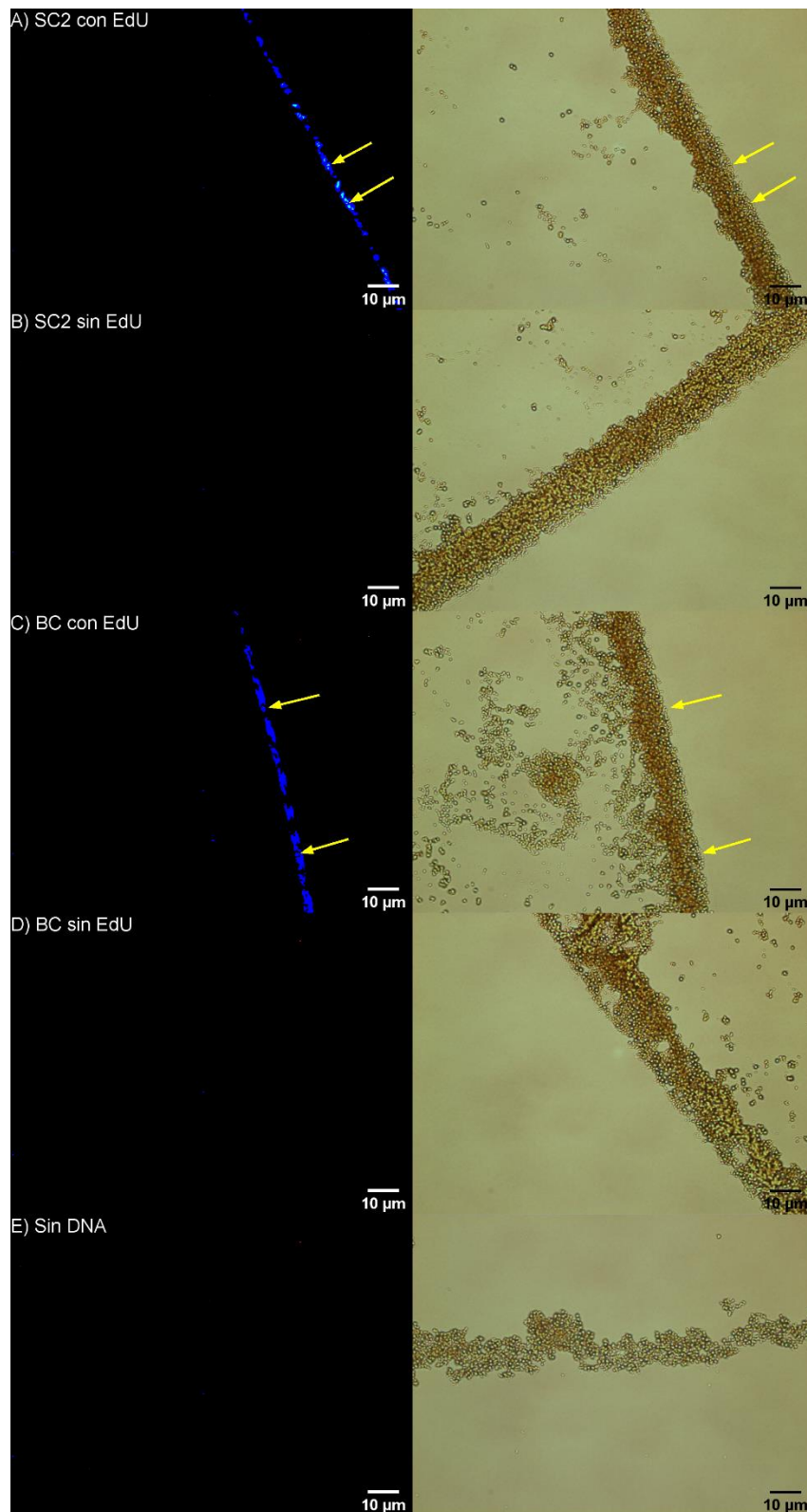
Con la confirmación de que la metodología también es aplicable con el fluoróforo cumarina, en los siguientes experimentos utilizando las secuencias amplificadas por PCR con 25 y 1 ciclo se empleó una concentración final del fluoróforo cumarina de 1 mM (tabla 16), esto con el propósito de mejorar la eficacia en el marcaje.

**Tabla 16.** Componentes de la solución de marcaje con el fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina para una concentración final de 1 mM.

<b>Material</b>	<b>Número de Ensayos: 1</b>
PBS	43.8 $\mu$ L
Solución Catálisis	1 $\mu$ L
Fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina (10 mM)	0.5 $\mu$ L
Buffer aditivo (10x)	5 $\mu$ L
Volumen total	50 $\mu$ L

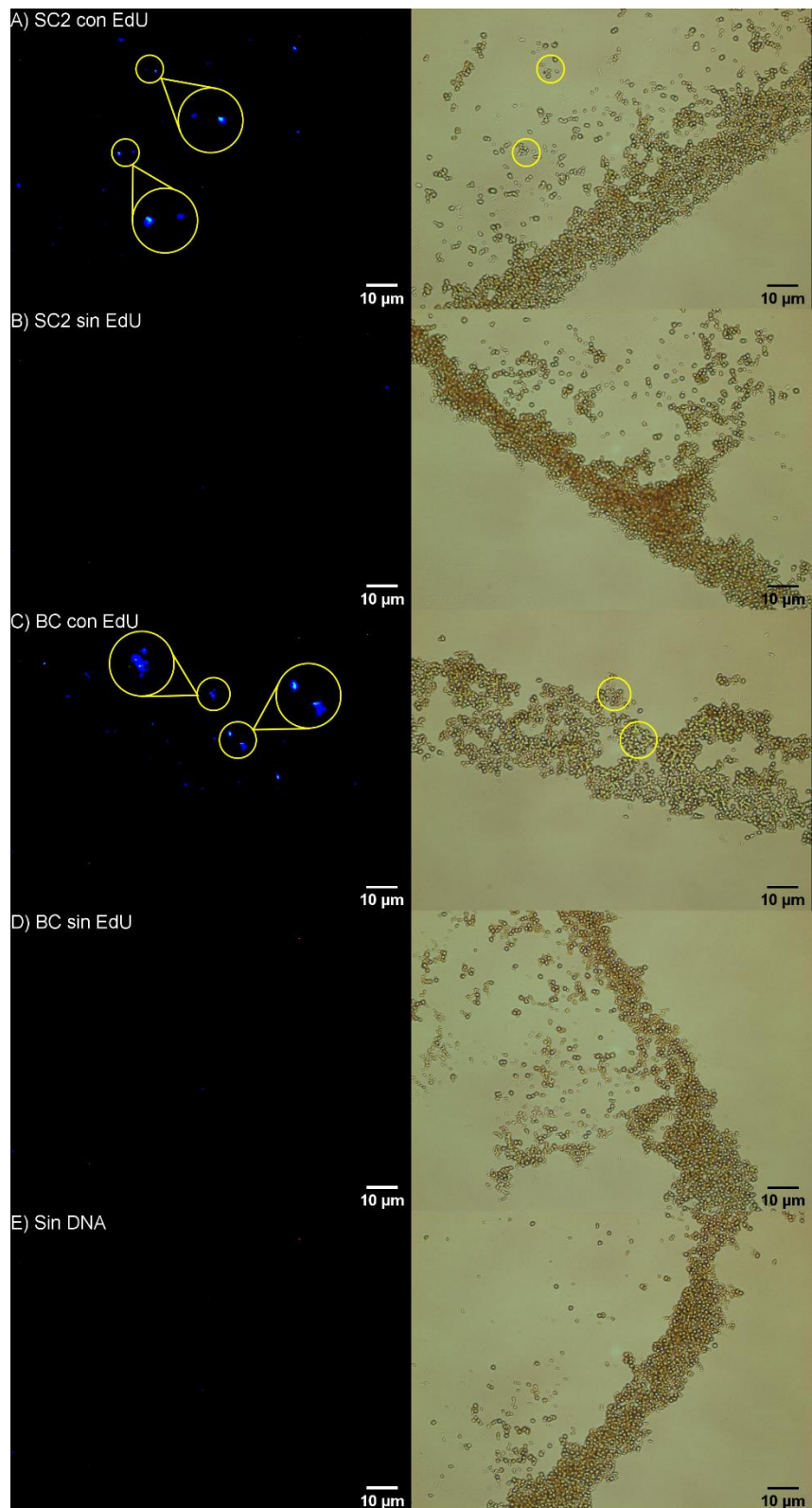
Los experimentos con los productos de PCR con 20 y 10 ciclos no se llevaron a cabo ya que el objetivo de este trabajo es lograr la detección del DNA amplificado con 1 ciclo al igual que con el fluoróforo TAMRA.

En el experimento con las secuencias amplificadas por PCR con 25 ciclos y una concentración final del fluoróforo cumarina de 1 mM, se logró observar fluorescencia en las nanopartículas donde se encuentra inmovilizado el DNA que tiene incorporado el nucleótido EdU tanto para SC2\_p2 (Fig. 46 A), como para BC\_p4 (Fig. 46 C), estos resultados nos indican que es posible realizar la detección del DNA marcado con EdU con 25 ciclos. Por otra parte, aún con el aumento en la concentración del fluoróforo no se logra detectar fluorescencia en las secuencias sin EdU (Fig. 46 B y D) así como en el control sin DNA (Fig. 46 E).



**Figura 46.** Imágenes de microscopía de epifluorescencia para la detección del DNA de BC\_p4 y SC2\_p2 adsorbido a nanopartículas magnéticas marcado con cumarina. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p2 amplificado por PCR de 25 ciclos y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1 µL de nanopartículas sin diluir y una concentración final del fluoróforo de 1 mM. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

En el experimento donde se utilizaron las secuencias amplificadas por PCR con 1 ciclo, se pudo observar fluorescencia en las nanopartículas donde se encuentra inmovilizado el DNA que tiene incorporado el nucleótido EdU tanto para SC2\_p2 (Fig. 47 A), como para BC\_p4 (Fig. 47 C), estos resultados nos indican que es posible realizar la detección del DNA marcado con EdU con 1 ciclo de amplificación. Además, aún con el aumento en la concentración del fluoróforo, no se logra detectar fluorescencia en las secuencias sin EdU (Fig. 47 B y D) y en el control sin DNA (Fig. 47 E) y al igual que en la metodología con el fluoróforo TAMRA, se observa una menor cantidad de nanopartículas que tiene adheridas las secuencias de DNA amplificadas por PCR con 1 ciclo (Fig. 47 A y C).



**Figura 47.** Detección del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p2 adsorbido a nanopartículas magnéticas. Imágenes representativas del DNA marcado de BC\_p4 y SC2\_p2 amplificado por PCR de 1 ciclo y observado por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó 1 µL de nanopartículas en una dilución 1/10 y una concentración final del fluoróforo de 1 mM. A y C, corresponden al DNA de SC2 y BC marcados con EdU; B y D a DNA sin marcaje con EdU y E, el control sin DNA.

Los resultados obtenidos demuestran que la metodología se lleva a cabo con éxito utilizando diferentes secuencias de DNA de SC2, al igual que se pueden emplear diferentes fluoróforos para realizar el marcaje, sin embargo, la principal ventaja de usar la cumarina como marcador es que no se requieren de lavados para eliminar las moléculas que no reaccionaron con el EdU incorporado a la secuencia de DNA y que tienen como resultado la fluorescencia en el fondo que si se observa en TAMRA, lo que permite un menor tiempo en la realización de la metodología. El eliminar los lavados para quitar los residuos del fluoróforo, permite que los tiempos empleados en la realización de la metodología sean más cortos, ya que con esta metodología se emplean aproximadamente 15 minutos menos que con la metodología empleando TAMRA.

**Tabla 17. Comparación de los tiempos requeridos en cada paso de la metodología empleando los fluoróforos TAMRA y Cumarina.**

	<b>TAMRA</b>	<b>CUMARINA</b>
<b>Preparación de secuencias de DNA y reacción de PCR (1 ciclo)</b>	45 minutos	45 minutos
<b>Inmovilización de las secuencias de DNA</b>	15 minutos	15 minutos
<b>Reacción CuAAC para el marcaje de las secuencias</b>	30 minutos	30 minutos
<b>Lavados para eliminar residuos del fluoróforo</b>	15 minutos	NA
<b>Detección de las secuencias marcadas</b>	10 a 15 minutos	10 a 15 minutos
<b>TIEMPO TOTAL</b>	120 minutos / 2 horas	105 minutos / 1 hora 45 minutos



## 7. CONCLUSIONES

Se determinó que la temperatura de alineamiento ( $T_a$ ) adecuada para llevar a cabo la reacción de PCR con las secuencias de DNA de SARS-CoV-2 y Betacoronavirus y los oligonucleótidos utilizados es de  $68^\circ\text{C}$ , con la cual se elimina la aparición de fragmentos inespecíficos.

La cantidad apropiada de nanopartículas para la inmovilización de los productos amplificados y su posterior visualización por microscopía de epifluorescencia es de  $1\ \mu\text{L}$  sin diluir para PCR con 25, 20 y 10 ciclos, y  $1\ \mu\text{L}$  de una dilución 1/10 para PCR con 1 ciclo. Utilizar diluciones mayores dificulta el manejo de las nanopartículas al perderse en los lavados después de realizar el marcaje.

La concentración adecuada para realizar el marcaje de las secuencias de DNA con el fluoróforo 5-TAMRA-PEG3-azida es de  $0.25\ \mu\text{M}$ . Con esta concentración se pueden detectar las secuencias de DNA, permitiendo que la fluorescencia de fondo que aún es perceptible no interfiera con la detección. En el caso del fluoróforo 3-azido-7-hidroxycumarina al ser una molécula que no emite fluorescencia antes de la reacción de click, la concentración recomendada es de  $1\ \text{mM}$ .

Con la metodología y las condiciones descritas en el presente trabajo se logró la detección de las secuencias de DNA de SARS-CoV-2 y Betacoronavirus que contienen el nucleótido EdU obtenidas por PCR con 25, 20, 10 y 1 ciclo. Para la metodología con el fluoróforo TAMRA el tiempo estimado para realizarla es alrededor de 2 horas, mientras que con el fluoróforo cumarina el tiempo aproximado es de 1 hora y 45 minutos.

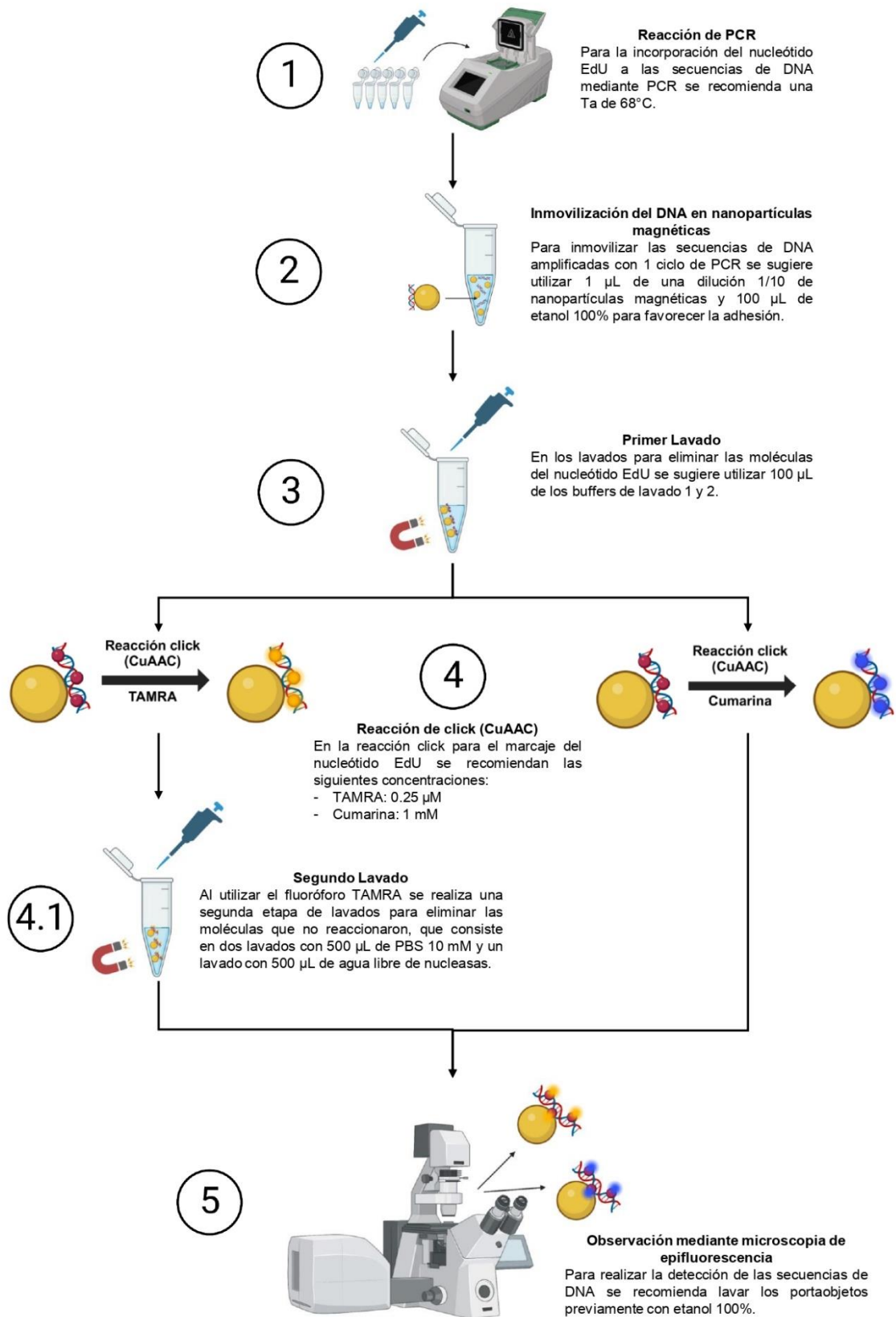


Imagen: Oswaldo Mata López/©BioRender-biorender.com

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Las secuencias de DNA y los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo de tesis fueron especialmente diseñados para realizar los experimentos, debido a que el genoma de virus SARS-CoV-2 es RNA, por lo que el siguiente paso sería verificar si la metodología es aplicable utilizando el DNA complementario (cDNA) obtenido después de realizar la transcripción inversa a partir del genoma del virus.

Con el desarrollo de kits comerciales (Sera-Xtracta Virus/Pathogen kit; Cytiva<sup>69,70</sup>) de nanopartículas enfocados en la purificación del RNA del virus SARS-CoV-2 se podría probar el utilizar estos kits para complementar la metodología aportada en el presente trabajo, ya que algunas de las ventajas de estos nuevos kits es que el proceso y extracción del RNA se puede completar en menos de 60 minutos.

Además, se pueden realizar experimentos utilizando ligandos que optimicen el tiempo en que se lleva a cabo la reacción CuAAC, donde el tiempo de reacción podría disminuir de 30 a 20 / 15 minutos.

## 9. REFERENCIAS

- 1) Sofi, M. S., Hamid, A., & Bhat, S. U. (2020). SARS-CoV-2: A critical review of its history, pathogenesis, transmission, diagnosis and treatment. *Biosafety and health*, 2(4), 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.11.002>
- 2) V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature reviews. Microbiology*, 19(3), 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- 3) Masters P. S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research*, 66, 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
- 4) Helmy, Y. A., Fawzy, M., Elasad, A., Sobieh, A., Kenney, S. P., & Shehata, A. A. (2020). The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. *Journal of clinical medicine*, 9(4), 1225. <https://doi.org/10.3390/jcm9041225>
- 5) Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K. M., O'Meara, M. J., Rezelj, V. V., Guo, J. Z., Swaney, D. L., Tummino, T. A., Hüttenhain, R., Kaake, R. M., Richards, A. L., Tutuncuoglu, B., Foussard, H., Batra, J., Haas, K., Modak, M., Kim, M., ... Krogan, N. J. (2020). A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, 583(7816), 459–468. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>
- 6) Hidalgo P., Valdés M., & González RA. (2021). Molecular biology of coronaviruses: an overview of virus-host interactions and pathogenesis. *Bol Med Hosp Infant Mex*; 78(1):41-58. English. doi: 10.24875/BMHIM.20000249.
- 7) Burrell, C. J., Howard, C. R., & Murphy, F. A. (2017). Coronaviruses. *Fenner and White's Medical Virology*, 437–446. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375156-0.00031-X>
- 8) Schoeman, D., Gordon, B., & Fielding, B. C. (2021). Pathogenic Human Coronaviruses. *Reference Module in Biomedical Sciences*, B978-0-12-818731-9.00052-5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00052-5>
- 9) Sanyaolu, A., Okorie, C., Marinkovic, A., Patidar, R., Younis, K., Desai, P., Hosein, Z., Padda, I., Mangat, J., & Altaf, M. (2020). Comorbidity and its Impact on Patients with COVID-19. *SN comprehensive clinical medicine*, 2(8), 1069–1076. <https://doi.org/10.1007/s42399-020-00363-4>
- 10) Beig Parikhani, Arezoo et al. "The Inclusive Review on SARS-CoV-2 Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Potential Management Options." *Current microbiology* vol. 78,4 (2021): 1099-1114. doi:10.1007/s00284-021-02396-x
- 11) CDC. (2022). Similarities and Differences between Flu and COVID-19. En <https://www.cdc.gov/flu/symptoms/flu-vs-covid19.htm>
- 12) Lamers, M. M., & Haagmans, B. L. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*, 20(5), 270–284. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>
- 13) Hou, Y. J., Okuda, K., Edwards, C. E., Martinez, D. R., Asakura, T., Dinnon, K. H., 3rd, Kato, T., Lee, R. E., Yount, B. L., Mascenik, T. M., Chen, G., Olivier, K. N., Ghio, A., Tse, L. V., Leist, S. R., Gralinski, L. E., Schäfer, A., Dang, H., Gilmore, R., Nakano, S., ... Baric, R. S. (2020). SARS-CoV-2 Reverse

- Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell*, 182(2), 429–446.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.042>
- 14) Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. F. P. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature reviews. Immunology*, 20(6), 363–374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
  - 15) Asrani, P., & Hassan, M. (2021). SARS-CoV-2 mediated lung inflammatory responses in host: targeting the cytokine storm for therapeutic interventions. *Mol Cell Biochem*; 476(2):675-687. doi: 10.1007/s11010-020-03935-z.
  - 16) PAHO. (2020). Interpretation of laboratory results for COVID-19 diagnosis. En [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52138/PAHOPHEIHMCOVID-19200015\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52138/PAHOPHEIHMCOVID-19200015_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
  - 17) CDC. (2023). Overview of Testing for SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19. En <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.html>
  - 18) Bezier, C., Anthoine, G., & Charki, A. (2020). Reliability of real-time RT-PCR tests to detect SARS-Cov-2: A literature review. *International Journal of Metrology and Quality Engineering*, 11, 13. doi:10.1051/ijmqe/2020014
  - 19) Afzal A. (2020). Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *Journal of advanced research*, 26, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.002>
  - 20) Dao Thi, V. L., Herbst, K., Boerner, K., Meurer, M., Kremer, L. P., Kirrmaier, D., Freistaedter, A., Papagiannidis, D., Galmozzi, C., Stanifer, M. L., Boulant, S., Klein, S., Chlanda, P., Khalid, D., Barreto Miranda, I., Schnitzler, P., Kräusslich, H. G., Knop, M., & Anders, S. (2020). A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Science translational medicine*, 12(556), eabc7075. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc7075>
  - 21) Milenia Biotec. (2021). Loop mediated isothermal Amplification (LAMP) & Lateral Flow. En <https://www.milenia-biotec.com/en/method/loop-mediated-isothermal-amplification/>
  - 22) La Marca, A., Capuzzo, M., Paglia, T., Roli, L., Trenti, T., & Nelson, S. M. (2020). Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reproductive biomedicine online*, 41(3), 483–499. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.06.001>
  - 23) Castrejón-Jiménez, N. S., García-Pérez, B. E., Reyes-Rodríguez, N. E., Vega-Sánchez, V., Martínez-Juárez, V. M., & Hernández-González, J. C. (2022). Challenges in the Detection of SARS-CoV-2: Evolution of the Lateral Flow Immunoassay as a Valuable Tool for Viral Diagnosis. *Biosensors*, 12(9), 728. <https://doi.org/10.3390/bios12090728>
  - 24) Maia, R., Carvalho, V., Faria, B., Miranda, I., Catarino, S., Teixeira, S., Lima, R., Minas, G., & Ribeiro, J. (2022). Diagnosis Methods for COVID-19: A Systematic Review. *Micromachines*, 13(8), 1349. <https://doi.org/10.3390/mi13081349>
  - 25) Filchakova, O., Dossym, D., Ilyas, A., Kuanysheva, T., Abdizhamil, A., & Bukasov, R. (2022). Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta*, 244, 123409. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123409>

- 26) Rong, G., Zheng, Y., Chen, Y., Zhang, Y., Zhu, P., & Sawan, M. (2023). COVID-19 Diagnostic Methods and Detection Techniques. *Encyclopedia of Sensors and Biosensors*, 17–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822548-6.00080-7>
- 27) Xu, M., Wang, D., Wang, H., Zhang, X., Liang, T., Dai, J., Li, M., Zhang, J., Zhang, K., Xu, D., & Yu, X. (2020). COVID-19 diagnostic testing: Technology perspective. *Clinical and translational medicine*, 10(4), e158. <https://doi.org/10.1002/ctm2.158>
- 28) Baldanti, F., Ganguly, N. K., Wang, G., Möckel, M., O'Neill, L. A., Renz, H., Dos Santos Ferreira, C. E., Tateda, K., & Van Der Pol, B. (2022). Choice of SARS-CoV-2 diagnostic test: challenges and key considerations for the future. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 59(7), 445–459.
- 29) Kilic, T., Weissleder, R., & Lee, H. (2020). Molecular and Immunological Diagnostic Tests of COVID-19: Current Status and Challenges. *iScience*, 23(8), 101406. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101406>
- 30) Sharma, S., Shrivastava, S., Kausley, S. B., Rai, B., & Pandit, A. B. (2023). Coronavirus: a comparative analysis of detection technologies in the wake of emerging variants. *Infection*, 51(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s15010-022-01819-6>
- 31) Zhu, Y., Zhang, M., Jie, Z., & Tao, S. (2022). Nucleic acid testing of SARS-CoV-2: A review of current methods, challenges, and prospects. *Frontiers in microbiology*, 13, 1074289. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1074289>
- 32) Ali, N., Rampazzo, R. C. P., Costa, A. D. T., & Krieger, M. A. (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed research international*, 2017, 9306564. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
- 33) McKiernan, H. E., & Danielson, P. B. (2017). Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. *Molecular Diagnostics*, 371–394. doi:10.1016/b978-0-12-802971-8.00021-3
- 34) Tüzmen, Ş., Baskın, Y., Feyda Nursal, A., Eraslan, S., Esemen, Y., Çalıbaşı, G., ... Hızel, C. (2018). Techniques for Nucleic Acid Engineering. *Omics Technologies and Bio-Engineering*, 247–315. doi:10.1016/b978-0-12-804659-3.00014-2
- 35) Berensmeier S. (2006). Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(3), 495–504. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0675-0>
- 36) Arias, L. S., Pessan, J. P., Vieira, A. P. M., Lima, T. M. T., Delbem, A. C. B., & Monteiro, D. R. (2018). Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 7(2), 46. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020046>
- 37) Dasari, A., Xue, J., & Deb, S. (2022). Magnetic Nanoparticles in Bone Tissue Engineering. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 12(5), 757. <https://doi.org/10.3390/nano12050757>
- 38) Flores-Rojas, G. G., López-Saucedo, F., Vera-Graziano, R., Mendizabal, E., & Bucio, E. (2022). Magnetic Nanoparticles for Medical Applications: Updated Review. *Macromol*, 2(3), 374–390. MDPI AG. Retrieved from <https://dx.doi.org/10.3390/macromol2030024>



- 39) Ali, A., Shah, T., Ullah, R., Zhou, P., Guo, M., Ovais, M., Tan, Z., & Rui, Y. (2021). Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications. *Frontiers in chemistry*, 9, 629054. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.629054>
- 40) Sosa-Acosta, J. R., Iriarte-Mesa, C., Ortega, G. A., & Díaz-García, A. M. (2020). DNA-Iron Oxide Nanoparticles Conjugates: Functional Magnetic Nanoplatfoms in Biomedical Applications. *Topics in current chemistry (Cham)*, 378(1), 13. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0277-9>
- 41) Xu, J., Chen, D., Yang, Y., Gong, H., Gao, W., & Xiao, H. (2021). A one step method for isolation of genomic DNA using multi-amino modified magnetic nanoparticles. *RSC advances*, 11(6), 3324–3332. <https://doi.org/10.1039/d0ra09409a>
- 42) Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- 43) Shirato K. (2019). Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification. *Microbiology and immunology*, 63(10), 407–412. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12734>
- 44) Usai, C. y Diaspro, A. (2013). Fluorescencia: Aspectos Generales. *Enciclopedia de biofísica*, 826–832. doi:10.1007/978-3-642-16712-6\_823
- 45) ThermoFisher Scientific. (2010). *The Molecular Probes Handbook*. Life Technologies. En <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>
- 46) Rachid, R. (2022). Epifluorescence Microscopy. In: Nechyporuk-Zloy, V. (eds) *Principles of Light Microscopy: From Basic to Advanced*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-04477-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-031-04477-9_3)
- 47) ThermoFisher Scientific. (s.f.). Epifluorescence Microscope Basics. En <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/fundamentals-of-fluorescence-microscopy/epifluorescence-microscope-basics.html>
- 48) Liu, E., Vega, S., Treiser, M. D., Sung, H.-J., & Moghe, P. V. (2011). Fluorescence Imaging of Cell–Biomaterial Interactions. *Comprehensive Biomaterials*, 291–303. doi:10.1016/b978-0-08-055294-1
- 49) Fernandes, C. S. M., Teixeira, G. D. G., Iranzo, O., & Roque, A. C. A. (2018). Engineered Protein Variants for Bioconjugation. *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials*, 105–138. doi:10.1016/b978-0-323-50878-0.00005-7
- 50) ThermoFisher Scientific. (s.f.). Fluorescent Probes. En <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/fluorescent-probes.html>
- 51) Mitra, A.K. (2019). I Am the Light Beneath Your Eyes... A Short History of the Discovery and Properties of Fluorescence. *Resonance* 24, 623–632. <https://doi.org/10.1007/s12045-019-0821-5>
- 52) Gerowska, M., Hall, L., Richardson, J., Shelbourne, M., & Brown, T. (2012). Efficient reverse click labeling of azide oligonucleotides with multiple alkynyl

- Cy-Dyes applied to the synthesis of HyBeacon probes for genetic analysis. *Tetrahedron*, 68(3), 857–864. doi:10.1016/j.tet.2011.11.041
- 53) Kaur J, Saxena M, Rishi N. (2021). An Overview of Recent Advances in Biomedical Applications of Click Chemistry. *Bioconjug Chem.* Aug 18;32(8):1455-1471. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00247.
- 54) Hein CD, Liu XM, Wang D. (2008). Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharm Res.* Oct;25(10):2216-30. doi: 10.1007/s11095-008-9616-1.
- 55) Organización Mundial de la Salud (2023). *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. Recuperado el 10/03/2023 de <https://covid19.who.int>
- 56) Ezhilan, M., Suresh, I., & Nesakumar, N. (2021). SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2: A Diagnostic Challenge. *Measurement: journal of the International Measurement Confederation*, 168, 108335. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108335>
- 57) Roche (2021). *3 Factors to help decide on the appropriate SARS-CoV-2 test*. En <https://www.roche.com/stories/3-factors-decide-on-appropriate-sars-cov-2-test/>
- 58) Park, M., Won, J., Choi, B. Y., & Lee, C. J. (2020). Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. *Experimental & molecular medicine*, 52(6), 963–977. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0452-74>
- 59) Rahmasari, R., Raekiansyah, M., Azallea, S. N., Nethania, M., Bilqisthy, N., Rozaliyani, A., Bowolaksono, A., & Sauriasari, R. (2022). Low-cost SYBR Green-based RT-qPCR assay for detecting SARS-CoV-2 in an Indonesian setting using WHO-recommended primers. *Heliyon*, 8(11), e11130.
- 60) Cordaro, N., Kavran, R., Smallegan, M. et al. (2021). Optimizing polymerase chain reaction (PCR) using machine learning. *Biorxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.08.12.455589>
- 61) Arsić, A., Hagemann, C., Stajković, N., Schubert, T., & Nikić-Spiegel, I. (2022). Minimal genetically encoded tags for fluorescent protein labeling in living neurons. *Nature communications*, 13(1), 314. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-27956-y>
- 62) Ma, C., Li, C., Wang, F., Ma, N., Li, X., Li, Z., Deng, Y., Wang, Z., Xi, Z., Tang, Y., & Hel, N. (2013). Magnetic nanoparticles-based extraction and verification of nucleic acids from different sources. *Journal of biomedical nanotechnology*, 9(4), 703–709. <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1566>
- 63) Yu, L., Adamson, P., Lay Yap, P., Tung, T., Makar, S., Turra, M., Higgins, G., & Losic, D. (2023). From Biowaste to Lab-Bench: Low-Cost Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for RNA Extraction and SARS-CoV-2 Diagnostics. *Biosensors*, 13(2), 196. <https://doi.org/10.3390/bios13020196>
- 64) Ligasová, A., & Koberna, K. (2018). DNA Replication: From Radioisotopes to Click Chemistry. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(11), 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules23113007>
- 65) Salic, A., & Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2415–2420. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712168105>



- 66) Li, K., Lee, L. A., Lu, X., & Wang, Q. (2010). Fluorogenic "click" reaction for labeling and detection of DNA in proliferating cells. *BioTechniques*, 49(1), 525–527. <https://doi.org/10.2144/000113463>
- 67) ArcturusXT™ Laser Capture Microdissection System User Guide. De [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016091\\_ArcturusLCM\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016091_ArcturusLCM_UG.pdf)
- 68) Promega. (s.f). DNA Purification. En <https://worldwide.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/>
- 69) Use of the Sera-Xtracta Virus/Pathogen Kit for purification of SARS-CoV-2 samples. Tomado de <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/genomics/knowledge-center/use-of-the-sera-xtracta-virus-pathogen-kit-for-purification-of-sars-cov-2-samples>
- 70) Viral RNA Extraction Kits for SARS-CoV-2. Tomado de: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/automated-purification-extraction/sars-cov-2-nucleic-acid-extraction.html>

## 10. ANEXO

**Tabla 1S. Cálculo teórico del número de moléculas de DNA de BC\_p4 en los ciclos de PCR.**

<b>Ciclos de PCR</b>	<b>Número de moléculas de DNA por ciclo</b>	<b>Porcentaje de Timina (%)</b>	<b>Número de Timina por ciclo</b>
0	$7.93 \times 10^{10}$	38.71	$3.07 \times 10^{10}$
1	$7.93 \times 10^{10}$	38.71	$3.07 \times 10^{10}$
10	$4.06 \times 10^{13}$	38.71	$1.57 \times 10^{13}$
20	$4.16 \times 10^{16}$	38.71	$1.61 \times 10^{16}$
25	$1.33 \times 10^{18}$	38.71	$5.15 \times 10^{17}$

**Tabla 2S. Cálculo teórico del número de moléculas de DNA de SC2\_p2 en los ciclos de PCR.**

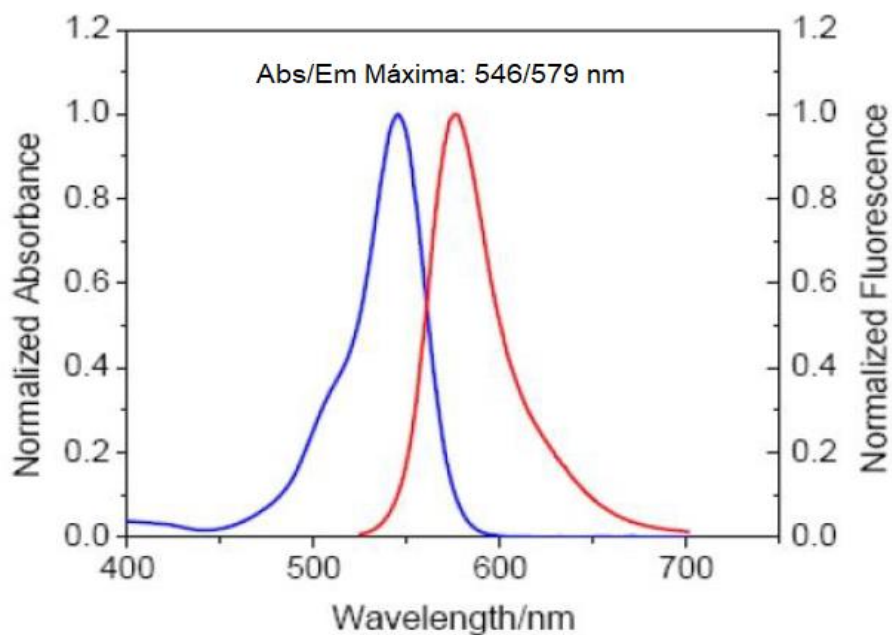
<b>Ciclos de PCR</b>	<b>Número de moléculas de DNA por ciclo</b>	<b>Porcentaje de Timina (%)</b>	<b>Número de Timina por ciclo</b>
0	$7.86 \times 10^{10}$	33.63	$2.64 \times 10^{10}$
1	$7.86 \times 10^{10}$	33.63	$2.64 \times 10^{10}$
10	$4.02 \times 10^{13}$	33.63	$1.35 \times 10^{13}$
20	$4.12 \times 10^{16}$	33.63	$1.39 \times 10^{16}$
25	$1.32 \times 10^{18}$	33.63	$4.43 \times 10^{17}$

**Tabla 3S. Cálculo teórico del número de moléculas de DNA de SC2\_p3 en los ciclos de PCR.**

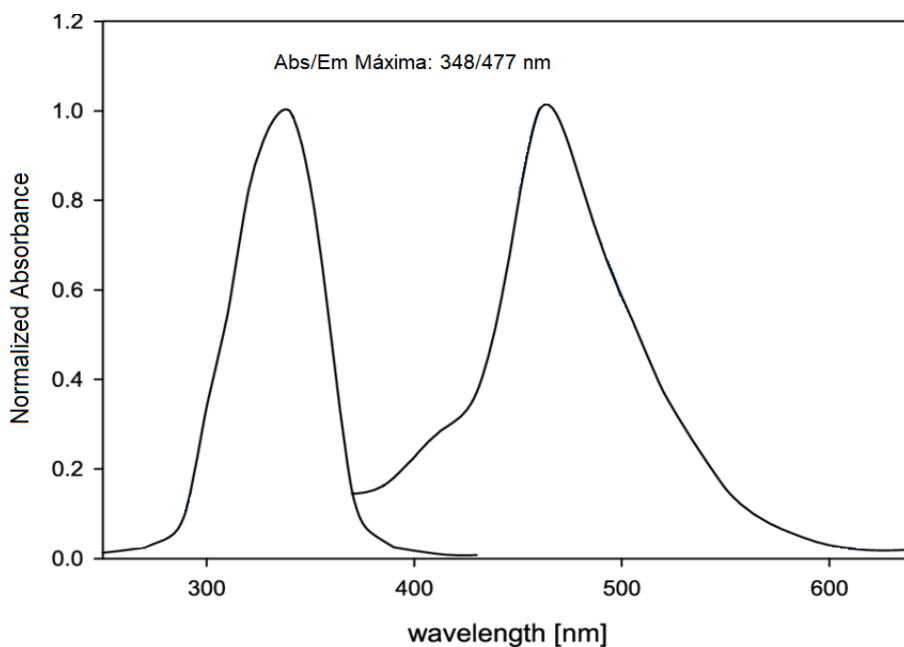
<b>Ciclos de PCR</b>	<b>Número de moléculas de DNA por ciclo</b>	<b>Porcentaje de Timina (%)</b>	<b>Número de Timina por ciclo</b>
0	$9.57 \times 10^{10}$	36.36	$3.48 \times 10^{10}$
1	$9.57 \times 10^{10}$	36.36	$3.48 \times 10^{10}$
10	$4.90 \times 10^{13}$	36.36	$1.78 \times 10^{13}$
20	$5.02 \times 10^{16}$	36.36	$1.82 \times 10^{16}$
25	$1.61 \times 10^{18}$	36.36	$5.84 \times 10^{17}$

**Tabla 4S. Cálculo teórico del número de moléculas de DNA de SC2\_p4 en los ciclos de PCR.**

<b>Ciclos de PCR</b>	<b>Número de moléculas de DNA por ciclo</b>	<b>Porcentaje de Timina (%)</b>	<b>Número de Timina por ciclo</b>
0	$8.84 \times 10^{10}$	39.28	$3.47 \times 10^{10}$
1	$8.84 \times 10^{10}$	39.28	$3.47 \times 10^{10}$
10	$4.53 \times 10^{13}$	39.28	$1.78 \times 10^{13}$
20	$4.63 \times 10^{16}$	39.28	$1.82 \times 10^{16}$
25	$1.48 \times 10^{18}$	39.28	$5.83 \times 10^{17}$



**Figura 1S.** Espectro de Fluorescencia de TAMRA. Imagen tomada de la ficha de datos del reactivo en <https://www.baseclick.eu/product/5-carboxytetramethylrhodamine-peg3-azide-5-tamra-peg3-azide/>



**Figura 2S.** Espectro de Fluorescencia de Cumarina. Imagen tomada y modificada de Linhorst, M., Wattjes, J. & Moerschbacher, B. (2021). Chitin Deacetylase as a Biocatalyst for the Selective N-Acylation of Chitosan Oligo- and Polymers. ACS Catal. 11, 23, 14456–14466. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c04472>

```

12361 gcttttctact atgcttagaa agttggataa tgatgcactc aacaacatta tcaacaatgc
12421 aagagatgggt tgtgttcctt tgaacataat acctcttaca acagcagcca aactaatggg
12481 tgtcatacca gactataaca catataaaaa tacgtgtgat ggtacaacat ttactttatgc
12541 atcagcattg tgggaaatcc aacaggttgt agatgcagat agtaaaattg ttcaacttag
12601 tgaaaattagt atggacaatt cacctaattt agcatggcct cttattgtaa cagctttaag
12661 ggccaattct gctgtcaaat tacagaataa tgagcttagt cctgttgcac tacgacagat
12721 gtcttgtgct gccggtacta cacaaactgc ttgactgat gacaatgcgt tagcttacta
12781 caacacaaca aagggaggta gttttgtact tgcactgta tccgatttac aggatttgaa
12841 atgggctaga ttccctaaga gtgatggaac tggactatc tatacagaac tgggaaccacc
12901 ttgtaggttt gttacagaca cacctaaagg tcctaaagtg aagtatttat actttattaa
12961 aggattaaac aacctaataa gaggtatggt acttgtagt ttagctgcca cagtacgtct
13021 caagctgggt aatgcaacag aagtgctgc caattcaact gtattatctt tctgtgcttt
13081 tgctgtagat gctgctaaag cttacaaaga ttatctagct agtggggggac aaccaatcac
13141 taattgtggt aagatgttgt gtacacacac tggactgggt caggcaataa cagttacacc
13201 ggaagccaat atggatcaag aatcctttgg tggatcatcg tgtgtctgt actgccgttg
13261 ccacatagat catccaaatc ctaaaggatt ttgtgactta aaaggtaagt atgtacaaat
13321 acctacaact tgtgctaag accctgtggg ttttacactt aaaaaacacag tctgtaccgt
13381 ctgctggtag tggaaagggt atggctgtag ttgtgatcaa ctccggaac ccatgcttca
13441 gtcagctgat gcacaatcgt ttttaacgg gtttgcgggt taagtgcagc cgtcttaca
13501 ccgtgcccga caggcactag tactgatgtc gtatacaggg cttttgacat ctacaatgat
13561 aaagtagctg gttttgctaa attcctaaaa actaattggt gtcgcttcca agaaaaggac
13621 gaagatgaca atttaattga ttcttacttt gtagttaaga gacacacttt ctctaactac
13681 caacatgaag aaacaattta taatttactt aaggattgtc cagctgttgc taaacatgac
13741 ttctttaagt ttagaataga cggtgacatg gtaccacata tatcacgtca acgtcttact
13801 aaatacacaa tggcagacct cgtctatgct ttaaggcatt ttgatgaagg taattgtgac
13861 acattaaaag aaatacttgt cacatacaat tgttgtgatg atgattattt caataaaaag
13921 gactggtagt atttttaga aaaccagat atattacgcg tatacgcaa cttagggtgaa
13981 cgtgtacgcc aagctttggt aaaaacagta caattctgtg atgccatgcg aaatgctggg
14041 attgttgggt tactgacatt agataatcaa gatctcaatg gtaactggtg tgatttcggg
14101 gatttcatac aaaccacgcc aggtagtgga gttcctgttg tagattctta ttattcatg
14161 ttaatgccta tattaacctt gaccagggtt ttaactgcag agtcacatgt tgacactgac
14221 ttaacaaagc cttacattaa gtgggatttg ttaaaatag acttcacgga agagagggta
14281 aaactctttg accgttattt taaatattgg gatcagacat accacccaaa ttgtgttaac
14341 tgtttggatg acagatgcat tctgcattgt gcaaacttta atgttttatt ctctacagt
14401 ttcccaccta caagttttgg accactagtg agaaaaatat ttgttgatgg tgttccattt
14461 gtagtttcaa ctggatacca cttcagagag ctaggtgttg tacataatca ggatgtaaac
14521 ttacatagct ctagacttag ttttaaggaa ttacttgtgt atgctgctga ccctgctatg

```

**Figura 3S.** Región del genoma de SARS-CoV-2 que se amplifica con los oligos FW y RV de BC\_p4, empleados en este trabajo.

```

20281 ttcattgaac ggtataaatt agaaggctat gccttcgaac atatcgttta tggagatfff
20341 agtcatagtc agttaggtgg tttacatcta ctgattggac tagctaaacg ttttaaggaa
20401 tcaccttttg aattagaaga ttttattcct atggacagta cagttaaaaa ctatttcata
20461 acagatgctc aaacagggtc atctaagtgt gtgtgttctg ttattgattt attacttgat
20521 gattttgttg aaataataaa atcccaagat ttatctgtag tttctaaggt tgtcaaagtg
20581 actattgact atacagaaat ttcatttatg ctttgggtga aagatggcca tgtagaaaca
20641 ttttaccxaa aattacaatc tagtcaagcg tggcaaccgg gtgttgctat gcctaactt
20701 tacaaaatgc aaagaatgct attagaaaag tgtgacctc aaaattatgg tgatagtgc
20761 acattaccta aaggcataat gatgaatgct gcaaaatata ctcaactgtg tcaatattta
20821 aacacattaa cattagctgt accctataat atgagagtta tacattttgg tgctggttct
20881 gataaaggag ttgcaccagg tacagctgtt ttaagacagt gttgcctac gggtagctg
20941 cttgtcgatt cagatcttaa tgactttgtc tctgatgcag attcaacttt gattgggtgat
21001 tgtgcaactg tacatacagc taataaatgg gatctcatta ttagtgatat gtacgacct
21061 aagactaaaa atgttacaaa agaaaatgac tctaaagagg gttttttcac ttacattgt
21121 gggtttatac aacaaaagct agctcttggg ggttccgtgg ctataaagat aacagaacat
21181 tcttggaatg ctgatcttta taagctcatg ggacacttcg catgggtggac agcctttgtt
21241 actaatgtga atgctgctc atctgaagca tttttaattg gatgtaatta tcttggcaaa
21301 ccacgcgaac aatagatgg ttatgctatg catgcaaatt acatattttg gaggaataca
21361 aatccaattc agttgtctc ctattcttta tttgacatga gtaaatttcc ccttaaatta
21421 aggggttactg ctgttatgtc tttaaaagaa ggtcaaatca atgatatgat tttatctctt
21481 cttagtaaag gtagacttat aattagagaa aacaacagag ttgttatttc tagtgatggt
21541 cttgtaaca actaaacgaa caatgtttgt ttttcttgtt ttattgccac tagtctctag
21601 tcagtgtgtt aatcttaca ccagaactca attaccccct gcatacacta attctttcac
21661 acgtgggtgtt tattaccctg acaaagttt cagatcctca gttttacatt caactcagga
21721 cttgttctta ctttctttt ccaatgttac ttggttccat gctatacatg tctctgggac
21781 caatggtact aagaggttt ataacctgt cctaccattt aatgatggtt tttattttgc
21841 ttccactgag aagtctaaca taataagagg ctggattttt ggtactactt tagattcga
21901 gaccagtc ctacttattg ttaataacgc tactaatgtt gtattaaag tctgtgaatt
21961 tcaattttgt aatgatccat ttttgggtgt ttattaccac aaaaacaaca aaagttggat
22021 ggaaagtgag ttcagagttt attctagtgc gaataattgc acttttgaat atgtctctca
22081 gccttttctt atggacctg aaggaaaaca ggtaatttc aaaaatctta gggaatttgt
22141 gtttaagaat attgatggtt attttaaat atattctaag cacacgccta ttaatttagt
22201 gcgtgatctc cctcagggtt tttcggctt agaaccattg gtagatttgc caataggat
22261 taacatcact aggtttcaaa ctttacttgc tttacataga agttatttga ctctgggtga
22321 ttcttcttca ggttggacag ctggtgctgc agcttattat gtgggttatc ttcaacctag
22381 gacttttcta ttaaaatata atgaaaatgg aaccattaca gatgctgtag actgtgcact
22441 tgacctctc tcagaaaca agtgtacgtt gaaatcctc actgtagaaa aaggaatcta

```

**Figura 4S.** Región del genoma de SARS-CoV-2 que se amplifica con los oligos FW y RV de SC\_p2 empleados en este trabajo.



```

22441 tgaccctctc tcagaaacaa agtgtacgtt gaaatccttc actgtagaaa aaggaatcta
22501 tcaaacttct aacttttagag tccaaccaac agaactctatt gttagatttc ctaatattac
22561 aaacttgtgc ccttttggtg aagtttttaa cgccaccaga tttgcatctg tttatgcttg
22621 gaacaggaag agaatcagca actgtgttgc tgattattct gtcctatata attccgcatc
22681 attttccact ttttaagtgtt atggagtgct tcctactaaa ttaaattgatc tctgctttac
22741 taatgtctat gcagattcat ttgtaattag aggtgatgaa gtcagacaaa tgcctccagg
22801 gcaaactgga aagattgctg attataatta taaattacca gatgatttta caggctgcgt
22861 tatagcttgg aattctaaca atcttgattc taaggttggt ggtaattata attacctgta
22921 tagattgttt aggaagtcta atctcaaacc ttttgagaga gatatttcaa ctgaaatcta
22981 tcaggccggt agcacacctt gtaatgggtg tgaaggtttt aattgttact ttcctttaca
23041 atcatatggt ttccaaccca ctaatgggtg tggttaccaa ccatacagag tagtagtact
23101 ttcttttgaa cttctacatg caccagcaac tgtttgtgga cctaaaaagt ctactaattt
23161 ggttaaaaaac aaatgtgtca atttcaactt caatggttta acaggcacag gtgttcttac
23221 tgagtctaac aaaaagtttc tgcctttcca acaatttggc agagacattg ctgacactac
23281 tgatgctgtc cgtgatccac agacacttga gattcttgac attacacat gttcctttgg
23341 tgggtgctcagt gttataacac caggaacaaa tacttctaac caggttgctg ttccttatca
23401 ggatgttaac tgcacagaag tccctgttgc tattcatgca gatcaactta ctctactttg
23461 gcgtgtttat tctacaggtt ctaatgtttt tcaaacacgt gcaggctgtt taataggggc
23521 tgaacatgct aacaactcat atgagtgtga catacccatt ggtgcaggtg tatgctctag
23581 ttatcagact cagactaatt ctctcggcg ggcadgtagt gtagctagtc aatccatcat
23641 tgcttacact atgtcacttg gtgcagaaaa ttcagttgct tactctaata actctattgc
23701 catacccaca aattttacta ttagtgttac cacagaaatt ctaccagtgt ctatgaccaa
23761 gacatcagta gattgtacaa tgtacatttg tggtgattca actgaatgca gcaatctttt
23821 gttgcaatat ggagttttt gtacacaatt aaaccgtgct ttaactggaa tagctgttga
23881 acaagacaaa aacacccaag aagtttttgc acaagtcaaa caaatttaca aaacaccacc
23941 aattaaagat tttggtggtt ttaatttttc acaaatatta ccagatccat caaaaccaag
24001 caagaggctc tttattgaag atctactttt caacaaagtg acacttgctg atgctggctt
24061 catcaaaaca tatggtgatt gccttggtga tattgctgct agagacctca tttgtgcaca
24121 aaagtttaac ggcttacttg ttttgccacc tttgctcaca gatgaaatga ttgctcaata
24181 cacttctgca ctgttagcgg gtacaatcac ttctggttgg acctttggtg cagggtctgc
24241 attacaaata ccatttgcta tgcaaatggc ttataggttt aatggtattg gagttacaca
24301 gaatgttctc tatgagaacc aaaaattgat tgccaaccaa tttaatagtg ctattggcaa
24361 aattcaagac tcactttctt ccacagcaag tgcacttggg aaacttcaag atgtggtcaa
24421 ccaaaatgca caagctttaa acacgcttgt taaacaactt agctccaatt ttggtgcaat
24481 ttcaagtgtt ttaaagata tcctttcacg tcttgacaaa gttgaggctg aagtgcaaat
24541 tgataggttg atcacaggca gacttcaaaag tttgcagaca tatgtgactc aacaattaat
24601 tagagctgca gaaatcagag cttctgctaa tcttgctgct actaaaatgt cagagtgtgt

```

**Figura 5S.** Región del genoma de SARS-CoV-2 que se amplifica con los oligos FW y RV de SC\_p3 empleados en este trabajo.

```

2401 ctcaaaggga ttgtacagaa agtgtgtaa atccagagaa gaaactggcc tactcatgcc
2461 tctaaaagcc ccaaaaagaa ttatcttctt agagggagaa acacttccca cagaagtgtt
2521 aacagaggaa gttgtcttga aaactgggta tttacaacca ttagaacaac ctactagtga
2581 agctgttgaa gctccattgg ttggtacacc agtttgtatt aacgggctta tgttgctcga
2641 aatcaaagac acagaaaagt actgtgcctt tgcaccta atgatggtaa caaacaatac
2701 cttcacactc aaaggcggg caccaacaaa ggttactttt ggtgatgaca ctgtgataga
2761 agtgcaaggt tacaagagt tgaatatcac ttttgaactt gatgaaagga ttgataaagt
2821 acttaatgag aagtgcctc cctatacagt tgaactcggg acagaagtaa atgagttcgc
2881 ctgtgttggt gcagatgctg tcataaaaaac tttgcaacca gtatctgaat tacttacacc
2941 actggggcatt gatttagatg agtggagtat ggctacatac tacttatttg atgagtctgg
3001 tgagttttaa ttggcttcac atatgtattg ttctttctac cctccagatg aggatgaaga
3061 agaaggtgat tgtgaagaag aagagtttga gccatcaact caatatgagt atggtagtga
3121 agatgattac caaggtaaac ctttgggaatt tgggtgccact tctgctgctc ttcaacctga
3181 agaagagcaa gaagaagatt ggttagatga tgatagtcaa caaactgttg gtcaacaaga
3241 cggcagtgag gacaatcaga caactactat tcaacaatt gttgaggttc aacctcaatt
3301 agagatggaa cttacaccag ttgttcagac tattgaagtg aatagtttta gtggttattt
3361 aaaacttact gacaatgtat acattaaaaa tgcagacatt gtggaagaag ctaaaaaggt
3421 aaaaccaaca gtggttgta atgcagccaa tgtttacctt aaacatggag gaggtgttgc
3481 aggagcctta aataaggcta ctaacaatgc catgcaagtt gaactctgat attacatagc
3541 tactaatgga ccacttaaag tgggtggtag ttgtgttita agcggacaca atcttgctaa
3601 aactgtctt catgtgtcg gcccaaagt taacaaaggt gaagacattc aacttcttaa
3661 gagtgcttat gaaaatttta atcagcacga agtttactt gcaccattat tatcagctgg
3721 tatttttggg gctgacccta tacattcttt aagagtttgt gtagatactg ttcgcacaaa
3781 tgtctactta gctgtctttg ataaaaatct ctatgacaaa cttgtttcaa gctttttgga
3841 aatgaagagt gaaaagcaag ttgaacaaaa gatcgctgag attcctaaag aggaagttaa
3901 gccatttata actgaaagta aaccttcagt tgaacagaga aaacaagatg ataagaaaat
3961 caaagcttgt gttgaagaag ttacaacaac tctggaagaa actaagttcc tcacagaaaa
4021 cttgttactt tatattgaca ttaatggcaa tcttcatcca gattctgcca ctcttgtag
4081 tgacattgac atcactttct taaagaaaga tgctccatat atagtgggtg atgttgttca
4141 agagggtgtt ttaactgctg tggttatacc tactaaaaag gctgggtggca ctactgaaat
4201 gctagcgaaa gctttgagaa aagtgccaac agacaattat ataaccactt acccgggtca
4261 gggtttaaat ggttacactg tagaggaggc aaagacagtg cttaaaaagt gtaaaagtgc
4321 cttttacatt ctaccatcta ttatctctaa tgagaagcaa gaaattcttg gaactgtttc
4381 ttggaatttg cgagaaatgc ttgcacatgc agaagaaaca cgcaaattaa tgccgtgctg
4441 tgtggaact aaagccatag ttcaactat acagcgtaaa tataagggtg ttaaaataca
4501 agagggtgtg gttgattatg gtgctagatt ttacttttac accagtaaaa caactgtagc
4561 gtcacttatc aacacactta acgatctaaa tgaactctt gttacaatgc cacttggtca

```

**Figura 6S.** Región del genoma de SARS-CoV-2 que se amplifica con los oligos FW y RV de SC\_p4 empleados en este trabajo.