

Conjugación de Nanopartículas de oro coloidal a biomoléculas para el diagnóstico de VIH-1/2.

Cruz Santana Yanelis¹
Díaz Herrera Dervel Felipe²
Fragas Quintero Anitza¹
Betancourt Torres Raisa¹
Montano Tamayo Lucy¹

- 1- Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA), Laboratorio de Inmunoelctrotransferencia, Mayabeque, Cuba, yanu@infomed.sld.cu.
- 2- Centro Nacional de Sanidad Animal (CENSA), Departamento de Epidermiología, Mayabeque, Cuba, felipe@censa.edu.cu

Resumen: Las nanopartículas de oro se utilizan con frecuencia en la medicina para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas. Su amplia funcionalidad permite conjugarlas a una gran diversidad de ligandos orgánicos o biomoléculas que se emplean como reactivos en ensayos inmunocromatográficos. El objetivo de este trabajo fue la obtención de conjugados de oro para el diagnóstico de la infección por VIH-1/2. La conjugación se realizó a temperatura ambiente mediante la unión oro-azufre del grupo tiol presente en la cisteína de los ligandos biológicos a las nanopartículas de oro coloidal de 40 nm. Se emplearon como ligandos, la proteína A, proteína G e IgG antihumana, a los que se les determinó la concentración mínima necesaria para efectuar la conjugación. La confirmación de la conjugación se demostró mediante la prueba de floculación. A los conjugados obtenidos se les determinó la máxima absorción a 520 nm y se evaluaron en sistemas inmunocromatográficos de flujo lateral utilizando muestras positivas y negativas. Se obtuvieron conjugados de oro coloidal con proteína A e IgG entre 40–45 DO y para proteína G entre 20 - 25 DO que cumplen con los requerimientos de calidad de estas biomoléculas y que resultaron positivos en las pruebas de floculación. Todos los conjugados revelaron bandas de reactividad de color rosado frente a las muestras positivas y ausencia de reactividad en las negativas. Los conjugados obtenidos permiten su empleo como reactivo detector en pruebas inmunocromatográficas para el diagnóstico de infección por VIH 1/2.

Palabras clave: Prueba rápida inmunocromatográfica, conjugado, oro coloidal, proteína A, proteína G, IgG antihumana, infección, VIH-1/2.

I. INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas de oro coloidal conjugadas a biomoléculas a lo largo de los años se han utilizado con diversos fines tanto en la medicina como en la industria farmacéutica, ya que son empleados en el tratamiento y diagnóstico de disímiles enfermedades (1,3,4,5,8). Estos conjugados son empleados como reactivos detectores en pruebas inmunocromatográficas para el diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas, una de las que se utiliza con mayor frecuencia es en la detección del virus de inmunodeficiencia humana tipo uno y dos (VIH-1/2). (2,4,6)

La amplia funcionalidad que presentan estas nanopartículas de oro coloidal permiten que puedan ser conjugadas a una gran variedad de ligandos orgánicos ó biomoléculas de diversos tamaños y formas (1,2,3), la adsorción de estos compuestos orgánicos a las nanopartículas de oro es mediante procesos no covalentes basados en tres fenómenos dependientes, los cuales son: 1- Mediante la interacción iónica presente entre las cargas positivas de los ligandos orgánicos y las cargas negativas de las nanopartículas de oro coloidal, 2- a través de interacción hidrofóbica entre la superficie del metal (oro coloidal) y la superficie de los ligandos orgánicos, 3- Mediante enlace dativo entre el metal (oro coloidal) y los electrones libres presentes en los átomos de azufre o nitrógeno que poseen los aminoácidos de las proteínas(1,4).

En los últimos años la comunidad científica ha dirigido notables esfuerzos a la investigación, desarrollo y aplicación de nanopartículas de oro coloidal para el diagnóstico con pruebas rápidas inmunocromatográficas de enfermedades infecciosas (5,8,9), por lo que se objetivo del trabajo fue la obtención de conjugados de oro coloidal para el diagnóstico de la infección por VIH-1/2.

II. MÉTODO

La conjugación se realizó a temperatura ambiente 25°C, utilizando nanopartículas de oro coloidal de 40 nm, mediante la unión oro coloidal – azufre presente en el grupo tiol en los residuos de cisteínas de los ligandos orgánicos utilizados, para ello primeramente se calculó la concentración mínima necesaria para que se efectúe la conjugación con los ligandos de proteína A, proteína G e Inmunoglobulinas anti-humanas (IgG antihumana).

La conjugación se realizó en tres tubos de ensayo diferente uno para cada ligando utilizado. Para ello a cada uno se le añadió 30 ml de nanopartículas de oro coloidal 300 µL de carbonato de potasio para llevar a pH neutro (7.5) y añadir 3 ml a razón de 20 y 50 µg/mL de los ligandos (proteína A, proteína G e Inmunoglobulinas antihumanas (IgG antihumana)), los 20 min se realizó la prueba de floculación para comprobar la efectividad de la conjugación, para ello se añaden a 200 µL de conjugado en cada pocillo con 20 µL de cloruro de sodio al 10% y se utiliza como control 200 µl de oro coloidal adquirida de la firma comercial BBI, con 20 µL de cloruro de sodio al 10%.

Después de realizado la prueba de floculación, se le añaden a cada conjugado 3.3 mL tampón de bloqueo que contiene albumina bovina al 10 % – pirrovinilpirolidona 30 al 0.5 % (BSA – PVP 30) para bloquear los sitios vacantes que quedaron libres en la superficie del oro coloidal y se pone a agitar por 10 minutos en el mismo agitador tridimensional, pasado los 10 min se filtran por un filtro de nitrocelulosa de 0.2 µm, se centrifugan los conjugados por 30 min, a 10,2 revoluciones por segundo a 4°C, se elimina el sobrenadante y se les añade igual volumen de tampón de preservio que contiene BSA al 2 %, tris a 5mmol, PVP 30 al 0.05%, Acida zódica al 0.1%. Se les midió la absorbancia a una longitud de onda de 520 nm en un espectrofotómetro UV- visible y se llevó con tampón de BSA al 2 %, Tris a 5mmol, PVP30 al 0.05% a la densidad óptica a la cual se sensibilizaron. Se sensibilizaron el conjugado con igual volumen de tampón Tris-Metanol en almohadillas absorbentes para conjugado con el empleo del equipo de bioimpresión Biodot cuanti 2000 (Biojet, UK), una vez sensibilizados se pusieron a secar a 37°C en una incubadora por dos horas, se ensamblan en las tiras inmunocromatográficas que ya contienen antígeno. Se probaron con el empleo de un panel de referencia procedente del Laboratorio de Control de la Calidad, con muestras positivas, débiles y negativas a VIH-1/2.

III. RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran las pruebas de floculación realizadas a todos los conjugados obtenidos. El color rosado demuestra qué ocurrió la conjugación del oro coloidal a los ligandos empleados y el color gris representa el control utilizado con el oro coloidal sin conjugar, demostrando la efectividad de la prueba empleada.

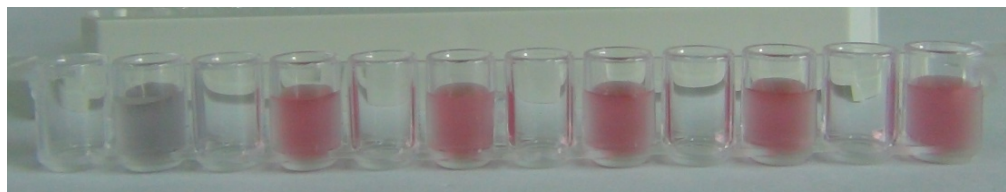


Figura 1: Prueba de Floculación.

En la Figura 2 se muestran los conjugados obtenidos de oro coloidal de 40 nm (Au 40 nm) con la proteína A, proteína G e IgG antihumana. El conjugado de oro-proteína A y el de oro- IgG antihumana se obtuvieron entre 40 – 45 DO respectivamente para cada uno y el conjugado de oro-proteína G se obtuvo entre 20 - 25 DO. Todos los conjugados se obtuvieron según lo reportado por Thobhani en 2010 (1) para las conjugaciones con oro coloidal a ligandos orgánicos o biomoléculas.

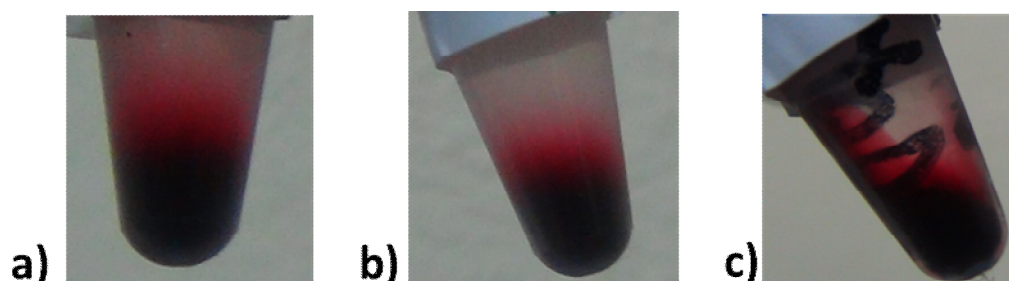


Figura 2: Conjugados de oro coloidal 40 nm. a) Conjugado de Au-proteína A, b) Conjugado Au- IgG antihumana y c) Conjugado de Au-proteína G.

En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos de los conjugados en las tiras inmunocromatográficas, en las cuales se observaron las bandas de reactividad de color rosado frente a las muestras positivas y débiles del panel utilizado, y ausencia de reactividad en las negativas, en todos los casos tanto positivos como negativos apareció la banda correspondiente al control de adicción de muestra para el diagnóstico de VIH-1/2.

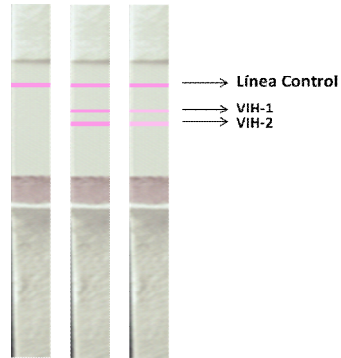


Figura 3: Resultados obtenidos de los conjugados en las tiras inmunocromatográficas.

IV. CONCLUSIONES

Los conjugados obtenidos permiten su empleo como reactivo detector en pruebas inmunocromatográficas para el diagnóstico rápido de la infección por VIH-1/2, y de esta manera pueden ser empleados tanto para la pesquisa y confirmación rápida y certera del diagnóstico de la enfermedad.

REFERENCIAS

- 1- Smita Thobhani, Simon Attree, Robert Boyd, Neelam Kumarswami, Jame Noble, Mateusz Szymaski, Robert A. Potter. Bioconjugation and characterisation of colloid- labelled proteins. *Journal of Immunological Methods*. 356(2010) 60-69.
- 2- Tinguely Caroline, Schild-Spycher Therese, Bahador Zahra, Gowland Peter, Stolz Martin, Niederhauser Christoph. Comparison of a conventional HIV 1/2 line immunoassay with a rapid confirmatory HIV 1/2 assay. *Journal of Virological Methods*. 206 (2014) 1-4.
- 3- Tomar Avnika y Garg Garima. Short Review on Application of Gold Nanoparticles. *Global Journal of Pharmacology* 7 (1). 2013 34-38. ISSN: 1992-0075.
- 4- Parida Umesh Kumar y Nayak P.L. Biomedical Applications of Gold Nanoparticles: Opportunity and Challenges. *World Journal of Nano Science & Thechology* 1(2). 2012.10-25.
- 5- J. W. Slot, H. J. Geuze, A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur. J. Cell. Biol.* 38, 87-93 (1985).
- 6- Kewal K. Jain. Applications of Nanobiotechnology in clinical diagnostics. *Clinical Chemistry* 53:11. 2002-2009 (2007).
- 7- Avnika Tomar and Garima Garg. Short Review on Application of Gold Nanoparticles. *Global Journal of Pharmacology* 7(1): 34-38, 2013. ISSN 1992-0075.
- 8- Abdoel T., Travassos I., Cardoso R., Smits H.L. Simple and rapid field test for brucellosis in livestock. *Veterinary Microbiology*. 2008; 130: 312-319.
- 9- Díaz DF., Cruz Y., Cruz O., Martín D., Alfonso M J, Ortiz E., Fragas A., Montano L., Silva E. Desarrollo y evaluación del desempeño de una prueba rápida inmunocromatográfica para el diagnóstico de la brucelosis. *Rev. Salud Anim.* 2015; 37 (2): 105-111.