

Conjugación de nanopartículas de oro coloidal a biomoléculas para el diagnóstico de brucelosis y VIH-1/2

Cruz-Santana Y, Díaz-Herrera DF, Cruz-Sui O, Fragas-Quintero A, Montano Tamayo A
Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, Mayabeque, Cuba
Email: yanu@infomed.sld.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 enfermedades infecciosas. 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 brucelosis e infección por VIH 1/2.

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

INTRODUCCIÓN

Los conjugados de oro coloidal a lo largo de los años se han utilizados con diversos fines tanto en la medicina como en la industria farmacéutica, ya que son muy empleados en el tratamiento y diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas.¹ Los cuales son muy empleados como reactivo detector en pruebas inmunocromatográficas para el diagnóstico rápido de enfermedades como la *Brucella* spp² y el virus de inmunodeficiencia humana tipo uno y dos (VIH-1/2).³ La amplia funcionalidad que presentan estas nanopartículas de oro coloidal permiten conjugarse a una gran variedad de ligandos orgánicos ó biomoléculas de diversos tamaños y formas.⁴ Las conjugaciones del oro coloidal a los ligandos se pueden realizar de tres formas diferentes, 1- Mediante interacción iónica presente entre las cargas positivas de los ligandos y las cargas negativas del 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 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

OBJETIVO

La obtención de conjugados de oro coloidal para el diagnóstico de brucelosis y VIH-1/2.

MATERIAL Y MÉTODOS

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 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 antihumanas (IgG antihumana). La conjugación se realizó a pH neutro (7.5) agitando por 20 minutos en un agitador tridimensional, después de pasado este tiempo se realizó

la prueba de floculación para comprobarla efectividad de la conjugación, para ello se añaden a 200 μ L de conjugado 20 μ L de cloruro de sodio al 10 % y un control del oro coloidal de la firma BBI. Una vez realizado la prueba de floculación, se le añaden al conjugado 3,3 mL tampón de bloqueo que contiene albumina bovina al 10 % – pirrovinilpirolidona 30 al 0,5 % (BSA – PVP30) para bloquear los sitios vacantes que quedaron libres en la superficie del oro coloidal y se agita nuevamente por 10 minutos en el mismo agitador tridimensional, pasado el tiempo se filtran por un filtro de nitrocelulosa de 0.2 μ m, 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, PVP30 al 0,05 %, Acida sódica 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 5 mmol, PVP30 al 0,05 % a la densidad óptica a la cual se iban a sensibilizar. Luego se sensibilizan en almohadillas absorbentes para conjugado con el empleo del equipo de bioimpresión Biodotcuanti 2000, una vez sensibilizados se pusieron a secar a 37°C en una incubadora por dos horas, se ensamblan en las pruebas rápidas inmunocromatográficas para cada una de las enfermedades y se prueban con un panel de muestras positivas y negativas a brucelosis y a VIH -1/2.

RESULTADOS

Se obtuvieron los conjugados de oro coloidal de 40 nm con los ligandos orgánicos. Se obtuvieron dos conjugados con proteína A, dos conjugados con IgG antihumana entre 40–45 DO respectivamente para cada uno, y para proteína G también se obtuvieron dos conjugados entre 20 - 25 DO, todos los conjugados se obtuvieron según lo reportado por Thobhani en 2010¹ para las conjugaciones con oro coloidal a ligandos orgánicos o biomoléculas. Todos los conjugados obtenidos cumplieron con los requerimientos de calidad para estas biomoléculas y que resultaron positivos en las pruebas de floculación respecto a control empleado. Todos los conjugados revelaron bandas de reactividad de color rosado frente a las muestras positivas 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 adición de muestra, resultados similares fueron reportados por Díaz y col en 2015² para una prueba rápida para el diagnóstico de brucelosis y por Tinguely y col en 2014³ para una prueba rápida para el diagnóstico por VIH-1/2.

CONCLUSIONES

Los conjugados obtenidos permiten su empleo como reactivo detector en pruebas inmunocromatográficas para el diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas tales como la brucelosis e infección por VIH 1/2.

RECOMENDACIONES

Seguir con el estudio de los de conjugados de oro coloidal de diferentes tamaños para su posterior conjugación a otras biomoléculas ó ligandos orgánicos de interés para su empleo en otras pruebas rápidas inmunocromatográficas de flujo lateral para enfermedades como leptospirosis, tuberculosis, dengue, otras enfermedades infecciosas de difícil diagnóstico que afectan a la salud humana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thobhani S, Attree S, Boyd R, Kumarswami N, Noble J, Szymaski M, Potter RA. Bioconjugation and characterisation of colloid- labelled proteins. *J Immunol Meth.* 356(2010) 60-9.
2. Díaz Dervel F, Cruz Y, Cruz O, Martin D, Alfonso MJ, Ortiz E, et al. Desarrollo y Evaluación del desempeño de una prueba rápida inmunocromatográfica para el diagnóstico de la brucelosis. *Rev Salud Anim.* 2015 May-Ago; 37(2):105-11.
3. Tinguely C, Schild-Spycher T, Bahador Z, Gowland P, Stolz M, Niederhauser C. Comparison of a conventional HIV 1/2 line immune assay with a rapid confirmatory HIV 1/2 assay. *J Virol Methods.* 2014; 206:1-4.
4. Avnika T, Garima G. Short Review on Application of Gold Nanoparticles. *Global J Pharmacol.* 2013; 7(1):34-8.
5. Kumar PU, Nayak PL. Biomedical Applications of Gold Nanoparticles: Opportunity and Challenges. *World J Nano Sci Thechol.* 2012;1(2):10-25.