

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

**Programa de desarrollo tecnológico para la sustentabilidad ambiental,
energética y alimentaria II**



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

**4D08B Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad
Ambiental, Energética y Alimentaria II en conjunto con el proyecto 4I03
Dispositivos Médicos Nanoestructurados**

**Pruebas *in vitro* de respuesta plasmónica en nanopartículas de oro para
detectar y cuantificar VPH 16 y 18 en el Parque Tecnológico del ITESO**

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, José Federico Lobato Martínez

Ing. en Biotecnología, David Andrés Camacho Morales

Profesor PAP: Dr. David José Mendoza Aguayo

Dra. Elsie Evelyn Araujo Palomo

Tlaquepaque, Jalisco, diciembre de 2023

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	4
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	4
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto	5
1.2 Caracterización de la organización.....	9
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	10
1.4. Planeación de alternativa(s).....	14
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	17
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	23
1.7. Bibliografía y otros recursos	50
1.8. Anexos generales.....	¡Error! Marcador no definido.
2. Productos	54
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	57
3.1 Sensibilización ante las realidades	57
3.2 Aprendizajes logrados	58

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.

El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).

El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.

El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.

El Reporte PAP consta de tres componentes:

El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.

El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.

El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

En el presente PAP se realizaron pruebas in vitro de respuesta plasmónica con nanopartículas de oro en el Parque Tecnológico del ITESO II, el trabajo forma parte de un proyecto iniciado en el semestre de otoño del año 2019. En el actual proyecto se atendió la necesidad de desarrollar métodos novedosos y eficientes para la detección del virus del papiloma humano (VPH). El objetivo principal consistió en evaluar el funcionamiento de un biosensor nanoestructurado para el reconocimiento del VPH de tipo 16 y 18, haciendo uso de nanopartículas de oro.

Se realizó una síntesis de nanopartículas de oro con un método de Turkevich modificado, y se evaluaron distintas variables, haciendo mediciones con distintas concentraciones de sonda (2 μ M y 100 pg/mL). Se usaron dos concentraciones de nanopartículas de oro (0.950 y 0.550), se modificó la metodología general añadiendo una centrifugación y se cambió el pH de 4 a 7.

Los resultados demostraron que el ajustar el pH es vital para el funcionamiento del biosensor, al igual que la concentración de sonda presente en el complejo nanopartícula-sonda. Se obtuvieron resultados exitosos al hacer estas modificaciones, obteniendo una curva de efecto plasmón que discrimina el VPH 16 de los otros ADN virales y una curva que muestra un movimiento horizontal en todas las muestras, sin embargo, todavía se reconoce potencial de mejora en la metodología. Los resultados muestran que en un futuro las mediciones deberán ser con pH 7.0, AuNPs 2x y no se calentará el ADN ni el oligo.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

El presente PAP fue realizado en las instalaciones del Parque Tecnológico del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente, un espacio donde se alojan empresas tecnológicas de alto impacto y mantienen un vínculo cercano con la universidad. Este lugar cuenta con el equipo necesario para realizar investigaciones experimentales y apoyo de personal capacitado y con gran trayectoria biotecnológica.

Este proyecto experimental, dirigido por el Dr. David José Mendoza Aguayo y la Dra. Elsie Evelyn Araujo Palomo, tiene precedentes desde el año 2019, fecha a partir de la cual ha contribuido al aprendizaje y desarrollo profesional de los estudiantes. El objetivo general del presente PAP, que es de carácter experimental, es proponer el funcionamiento de un biosensor nanoestructurado para el reconocimiento de los Virus del Papiloma Humano (VPH) 16 y 18, haciendo uso de nanopartículas de oro (AuNPs) para generar una prueba de detección económica, rápida y de alta fidelidad.

Los objetivos específicos son:

- Determinar la cantidad de nanopartículas de oro, oligo y ADN necesario para tener una detección eficiente.
- Aumentar o disminuir la concentración de ADN problema para realizar una curva de calibración.
- Comparar los resultados del barrido espectrofotométrico de detección con los registrados en el verano del 2023.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

Existen muchas enfermedades que representan un gran riesgo para la salud de las personas, muchas de ellas pueden ser benignas, mientras que otras pueden resultar mortales. Dentro de este amplio espectro de enfermedades es posible resaltar el posicionamiento a nivel mundial de las enfermedades cancerígenas, ya que se encuentran en el segundo lugar de motivos de muerte en el mundo. De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH por sus siglas en inglés), se estiman un total de 1,958,310 nuevos casos de cáncer en 2023, y 609,820 muertes, lo que representaría una sobrevivencia relativa a 5 años del 68% [1]. Se prevé que para el año 2040 los casos anuales a nivel mundial de personas con cáncer

aumentarán a 29.5 millones, de los cuales se estima que 16.4 millones morirán por causa de la misma enfermedad [2].

La mayoría de las enfermedades cancerígenas están asociadas a predisposición genética y a patrones de comportamiento que resultan perjudiciales para la salud, tales como: falta de ejercicio, dietas no saludables, consumo de sustancias nocivas, entre otras. Sin embargo, existen también enfermedades cancerígenas vinculadas a agentes infecciosos biológicos, mismas que representan aproximadamente el 13% del total de este tipo de enfermedades en el mundo [3]. Los principales agentes infecciosos responsables de la generación de diferentes tipos de cáncer son *Helicobacter pylori* (40%), virus del papiloma humano (34%) y virus de la hepatitis B (18%) y C (8%) [4].

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a la familia Papillomaviridae, misma que está compuesta por virus de aproximadamente 55 nm de diámetro, con ADN de doble cadena y sin envoltura o ausencia de bicapa lipídica [5]. El VPH cuenta con un genoma de aproximadamente 8 pares de kilobases (kb), mismas que codifican a 6 (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) proteínas que favorecen la replicación y la inmunidad del virus y 2 proteínas cápside (L1 y L2) que están vinculadas con la capacidad de transmisión del virus [6]. Actualmente se han logrado identificar y caracterizar más de 200 tipos de VPH, de los cuales sobresalen los tipos 16 y 18 por ser clasificados como VPH de alto riesgo, hecho que se les atribuye por ser los principales causantes de lesiones epiteliales y posteriormente cáncer (77% del total de casos de cáncer por VPH). Además, estos dos tipos de VPH son los responsables de inducir 70% de los casos totales de cáncer cervical, lo que representa 5% del total de casos de cáncer en el mundo [1].

El VPH es comúnmente transmitido por medio de la actividad sexual, aunque también es posible que sea transmitido a partir del contacto con la piel [7], [8]. Es común que las personas se vean infectadas por este virus, de hecho, se estima que el 80% de la población contraerá alguna infección de VPH en algún punto de su vida; sin embargo, la mayoría de las personas que contraen el VPH logran eliminarlo en un tiempo promedio de 2 años a partir de la actividad del sistema inmune sin consecuencias graves para la salud [1]. Una ineficiente o

nula detección temprana del virus, sumado a factores genéticos y de comportamientos riesgosos para la salud, puede promover la prevalencia del virus en el cuerpo, aumentando su potencial carcinogénico [8].

Existen además factores sociales que tienen una repercusión directa en la prevalencia y potencial nocivo del VPH. En el año 2018, un total de 311,000 mujeres murieron por consecuencia de cáncer cervical. De este total de fallecimientos, el 85% era perteneciente a países de niveles socio económicos medios o bajos [1]. En ese mismo año, en México, se registró una incidencia en la que 11 de cada 100,000 mujeres padecían de cáncer cervicouterino y 6 de cada 100,000 morían por este mismo motivo [9]. La falta de recursos de un país afecta las posibilidades con las que su población puede realizar pruebas de detección de VPH a tiempo. Este último hecho resalta la necesidad de que existan métodos de detección eficientes y accesibles aún para países con problemas económicos [1].

Los primeros métodos de detección de VPH fueron del tipo citológico, es decir, aquellos que requieren de la obtención de muestras celulares para después clasificarlas de acuerdo con su morfología [10]. A pesar de ser comúnmente utilizados, estos métodos, dentro de los cuales se encuentra la prueba del Papanicolaou, son susceptibles a errores debido a distintos factores como, el tener poca claridad o alteración en las muestras celulares, o cometer errores en la interpretación morfológica [11]. Existen, por otro lado, técnicas basadas en la detección de algunos de los componentes virales del VPH a partir de su amplificación por medio de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) [12]. Actualmente es posible encontrar aproximadamente 254 pruebas comerciales para la detección de VPH de este estilo, sin embargo, muchas de ellas aún presentan fallas en su capacidad de detección del agente viral y suponen altos costos de producción y por lo tanto de venta [13], [14].

La alta demanda de pruebas con eficiencias de detección mejoradas y con precios accesibles, aún para poblaciones vulnerables, resalta la necesidad de crear nuevas técnicas de detección que sean capaces de cumplir con dichos requisitos. Novedosas alternativas se han planteado para buscar atacar las necesidades de detección de virus de forma rápida y eficiente. Entre ellas se puede encontrar el aprovechamiento del efecto plasmón en nanopartículas de oro para

la detección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Este proceso se favorece de la capacidad de ciertos metales para reflejar incidencias de luz a determinadas longitudes de onda debido a la presencia de cargas libres en sus superficies [15]. Estos metales se han sintetizado en forma de nanopartículas que han podido ser utilizadas como biosensores capaces de adherirse al material genético del VIH mediante procesos de ligación con sondas sintetizadas para así poder demostrar su presencia en una muestra determinada a partir de análisis espectrofotométricos [16].

Un biosensor es un equipo o dispositivo que mide reacciones biológicas o químicas, generando señales proporcionales a la concentración o existencia de un analito en la reacción. Los biosensores son usados en aplicaciones como monitoreo, investigación de medicamentos, detección de contaminantes, detección de biomoléculas y como marcadores de enfermedades en fluidos, como sangre, orina, saliva o sudor. Un biosensor común consiste en un analito, un bioreceptor, un transductor, una interpretación de señal y resultado. Independientemente de la aplicación o tecnología, la miniaturización ha sido siempre benéfica por distintas razones, el reducir tamaño de un biosensor de micro a nano escala representa una mejor señal (más respuesta que ruido), menos volúmenes de trabajo y reducción de costos [17]. Por consiguiente, el uso de un biosensor nanoestructurado parece apto para esta investigación.

Partiendo de los fundamentos mencionados, el Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales (DPTI) del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO), planteó llevar a cabo un proyecto para la detección del VPH a partir de respuestas plasmónicas de nanopartículas de oro. Durante el semestre de primavera del 2022 el equipo de trabajo evaluó la inmovilización de tres diferentes tipos de sondas en nanopartículas de oro y se determinó que las sondas de tiol-fwr mostraron una mejor respuesta para la formación de complejos AuNP-sonda [18]. Posterior a ello, en el semestre de otoño del 2022, se utilizaron nanopartículas de oro inmovilizadas con sondas tiol para detectar la presencia de VPH tipo 16 y 18 en muestras genéticas proporcionadas. Dicho trabajo evaluó las diferentes condiciones de inmovilización y concentraciones genéticas que favorecían a la detección del material genético de interés y se concluyó que se debían manejar

concentraciones menores de ADN y variar las concentraciones de las nanopartículas sintetizadas con el fin de obtener lecturas espectrofotométricas más claras en futuras pruebas [19].

En el semestre de primavera 2023, se evaluó el comportamiento de la concentración de ADN viral dentro de la muestra al realizar las pruebas, se cambió la metodología utilizada en las previas experimentaciones, se optó por eliminar de la metodología el “Salt-Aging” en la funcionalización de la nanopartícula, lo cual logró recortar 2 días las corridas experimentales. Se tomó esta decisión porque las sales excedentes en la síntesis de nanopartículas ayudan a la estabilidad de la partícula al ser funcionalizadas con ADN viral. También se optó por cambiar las concentraciones de ADN viral de la muestra pasando de 180 pg/mL a 100 pg/mL. La modificación de la concentración de ADN permitió que el material genético no interactuara con la muestra ni causara disturbio, ya que el ADN puede formar estructuras terciarias las cuales modifican la absorbancia [20].

Posteriormente se trabajó de manera voluntaria en el periodo de verano 2023 donde se modificó la metodología y la concentración de secuencia de ADN utilizada para funcionalizar la nanopartícula; las concentraciones de secuencia funcionalizadora, llamada oligo, utilizada para esta experimentación fueron 1 mM, 0.5 mM y 0.25 mM. Esto se modificó debido a que el oligo excedente reaccionaba entre sí formando estructuras no esperadas las cuales terminaban afectando las mediciones en el espectrofotómetro, donde los mejores resultados se obtuvieron utilizando 0.5 mM. Es a partir de estas conclusiones que se construyó el presente proyecto del semestre PAP de otoño 2023 donde se trabajó en la optimización de las pruebas para poder obtener poca o nula variación entre mediciones.

1.2 Caracterización de la organización

El presente PAP se realiza en el Parque Tecnológico del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO), Universidad Jesuita de Guadalajara, Jalisco, México. El proyecto está a cargo del Dr. David Mendoza y la Dra. Elsie Evelyn Araujo y está bajo la coordinación del Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales. Según el portal de

la institución, la misión del ITESO es “inspirar e impulsar los procesos de formación y acompañamiento, a partir de la experiencia cristiana al modo ignaciano, que integran a la persona, promueven el diálogo fe y cultura y llevan al compromiso solidario” [21].

Por otra parte, la visión del ITESO es ser “un centro de referencia para el conocimiento y la vivencia de la espiritualidad ignaciana”. El portal continúa: “Nuestra propuesta de formación y acompañamiento, está en constante dialogo con la cultura, con la problemática social y con los que están en las fronteras de la exclusión. En los procesos de comunicación y formación recurrimos a las TIC’s, para establecer redes, que nos ayudan a difundir nuestra propuesta ignaciana en la sociedad de la información”. Para finalizar, la institución se refiere a sí misma como “una comunidad de personas en permanente crecimiento bajo la inspiración de la tradición educativa jesuita y el análisis constate de la realidad” [22].

Los docentes que se encuentran contribuyendo en el presente PAP son el Dr. David José Mendoza Aguayo, quien dirige el proyecto, y la Dra. Elsie Evelyn Araujo Palomo, como asesora en el área de nanotecnología. También colaboraron los responsables técnicos de los laboratorios Ana Isabel Alavez Jiménez y Esteban Fabián de la Peña Rodríguez, quienes reservan los espacios para nuestras actividades y proporcionan los materiales del laboratorio.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

El Virus de Papiloma Humano, o VPH por sus siglas, pertenece a la familia Papilloma-viridae y es clasificado en 5 géneros, alfa (mayor riesgo), beta, gamma, mu y nu. Es un virus de 55 nanómetros de diámetro y cuenta con ADN de doble cadena de forma circular de aproximadamente 8,000 pares de base. El genoma del VPH contiene dos secciones generales, los genes tempranos (E1, E2 y E4), que codifican proteínas de expresión viral, y los genes tardíos (L1 y L2), que codifican proteínas estructurales [23].

La infección por VPH es la más común de todas las infecciones de transmisión sexual. A nivel mundial hay una prevalencia de la infección por VPH de alto riesgo (alfa) de 10.4%, aunque en algunos países suele llegar hasta 36.5%. La variación de los porcentajes de

prevalencia, infección y desarrollo de estas enfermedades puede ser resultado de la calidad de programas de concientización (detección), el número de parejas sexuales, actividad sexual a temprana edad, altos niveles hormonales y polimorfismos en el gen p53 [23].

El VPH es un virus con el potencial de provocar enfermedades cancerígenas y que puede ser contagiado por medio de la actividad sexual. Este virus afecta a mujeres y hombres lo que lo convierte en una problemática recurrente de salud pública, principalmente en países con programas de salud deficientes. Generalmente las variantes de VPH se clasifican en 2 niveles de acuerdo con sus propiedades oncogénicas, de bajo riesgo y de alto riesgo, los cuales pueden progresar hasta generar cáncer cervicouterino. Los tipos de VPH de alto riesgo más comunes son las variantes 16 y 18 [24].

Los VPH de tipo 16 y 18 son los responsables de alrededor del 70% de cáncer cervical en el mundo y son capaces de producir otros tipos de cáncer como el anal, vaginal o de orofaringe [25]. Se ha demostrado, además, que componentes nocivos, como los presentes en el tabaco, aumentan el potencial carcinogénico de estos dos tipos de VPH [26]. La presencia de los genes promotores PE y PL promueve la expresión de genes (tempranos y tardíos) que favorecen la replicación y transmisión del VPH 16 y, en menor medida, del tipo 18. Es debido a esta expresión de genes que estos dos tipos de VPH adquieren su gran potencial carcinogénico [27].

El cáncer de cuello uterino es la segunda neoplasia más común en mujeres de América Latina, de la cual se reportan 68,818 casos anuales. En México, desde 2006, el cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer, anualmente se estima una tasa de 23.3 nuevos casos y 7.0 defunciones por cada 100,000 mujeres. México es el país con la mortalidad más alta por cáncer de cuello uterino dentro de los países de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos) [28].

En un estudio efectuado en el 2017 por investigadores del IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social), se realizaron pruebas de ADN de 32 tipos de VPH a 421 mujeres obteniendo 310 muestras viables; estas pruebas se realizaron tanto para tipos de VPH de alto riesgo como

de bajo riesgo o prevalencia. De las 310 muestras obtenidas, el 100% fueron positivas a uno o más de los 32 tipos virales incluidos en la prueba INNO-LiPA, y se encontró un 91.6% de infección por VPHar (VPH alto riesgo oncogénico), un 6.5% de VPHbr (VPH bajo riesgo) y 1.9% VPHpar (VPH probable alto riesgo) [29].

Este estudio denota que, de las muestras positivas, el 23.2% estaba infectada con solo un tipo de VPH y un 76.8% contaba con una coinfección con cualquier tipo de ADN viral detectable con la misma prueba. Los VPHar con mayor prevalencia fueron los tipos 16 (45.4%), 66 (35.5%), 52 (33.7%) y 51 (33.3%), el VPH 18 solo se presentó en 10.3% de las mujeres, pero tiene uno de los VPH de mayor riesgo oncogénico junto con el tipo 16. Las razones de esta incidencia con mayor significancia estadística (< 0.05) fueron: actividad sexual a los 18 años o antes (40%), haber tenido tres o más parejas sexuales y antecedentes de ITS [29].

Aunque el VPH y el cáncer cervicouterino son una problemática latente en México y el mundo, en realidad es el único cáncer que se puede prevenir al 100% con vacunación, uso de preservativos y una detección temprana [28]. Una forma de detección es a través del frotis de Papanicolaou usado desde 1940; ha sido una útil herramienta para la detección y el diagnóstico de cáncer cervical, pero se ha demostrado que cuenta con efectividad del 50 hasta el 90% y con una cantidad alta de falsos negativos y, debido a la naturaleza de obtención de muestra, suele ser molesto e invasivo [30].

Algunas formas de detección alternativas incluyen el VPH co-test, el cual consiste en hacer el Papanicolaou al mismo tiempo que la prueba de VPH, es un método eficiente y reduce el tiempo de detección de algunos tipos de VPH de alto riesgo. La prueba utiliza una enzima de inmunoensayo PCR (reacción en cadena de polimerasa) y primers GP5+ y GP6+. La principal desventaja de esta técnica es tener que hacer Papanicolaou, así como el costo y accesibilidad debido a la necesidad de hacer secuenciación del resultado [24].

Alternativas de detección novedosas han tratado de aumentar los porcentajes de detección temprana de este virus. Tal es el caso del uso del método del ThinPrep, microdissección de tejido y PCR (reacción en cadena de la polimerasa) uniplex E6/E7 para la detección de los genes de los VPH de alto riesgo que son responsables de la proliferación y transformación

de células cancerígenas. Este método demostró ser capaz de minimizar los errores obtenidos en los métodos comúnmente utilizados, sin embargo, este novedoso método demostró no estar exento de presentar falsos negativos, además de ser invasivo y costoso [30], [31].

Los retos que tienen las pruebas de VPH son, el tener que hacer Papanicolaou, la cual es una de las principales razones por las que las mujeres no asisten al ginecólogo, tanto a revisión como a realizarse pruebas de infecciones de transmisión sexual debido a lo incómodo, doloroso e invasivo que suele o puede llegar a ser. El costo y accesibilidad de las pruebas también es otro reto en países en vías de desarrollo o con diferencias socioeconómicas grandes debido a que pocos o nulos hospitales hacen estas pruebas gratuitas o simplemente no tienen el servicio [24].

Una tecnología que está tomando notoriedad en la detección de biomoléculas son los biosensores basados en la respuesta plasmónica de nanopartículas de oro (AuNPs), previamente funcionalizadas con distintas biomoléculas, como ácidos nucleicos o anticuerpos, con la finalidad de reconocer y unirse a objetivos específicos. Las nanopartículas de oro presentan propiedades ópticas únicas, lo que hace que sea posible detectar a simple vista variaciones en la coloración de las soluciones, cuando cambian de un estado dispersado a uno agregado. Por lo tanto, una prueba de este tipo puede ser una alternativa prometedora para la detección del virus del papiloma humano [32].

Dado que no todos los integrantes de la población cuentan con los recursos económicos para solventar gastos de estudios de detección de VPH de alto costo, sigue siendo vigente la necesidad de elaborar alternativas que mejoren la efectividad de detección, sean cómodos y no invasivos y permitan también mostrarse como alternativas económicamente viables para aquellos sectores de la sociedad mayormente vulnerables. En consecuencia, la elaboración de alternativas debe de realizarse de forma holística, procurando no sólo solucionar los problemas biotecnológicos, sino también los sociales.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Existen diversas pruebas que fomentan la detección del VPH de alto riesgo, no obstante, no existen pruebas en hombres aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration), quienes se recuperan, generalmente, de la infección sin presentar síntomas. La prueba para mujer consiste en la recolección de células provenientes del cuello uterino por medio de un cepillo suave o espátula plástica, además, se suele hacer al mismo tiempo que el Papanicolaou, conociéndose entonces como prueba conjunta de VPH y Papanicolau; no obstante, esta prueba se hace a mujeres entre 30 a 60 años, no siendo recomendable para menores de 30 años [13].

Se realizan diversos métodos de tipificación de virus que se relacionan con la sensibilidad y especificidad, permitiendo el seguimiento y establecimiento del tratamiento del paciente, así como el conocimiento de los tipos virales circulando en una población. A partir de infecciones causadas por el virus, se pueden realizar exámenes citológicos o histopatológicos los cuales permiten detectar el genoma e identificar el tipo viral que se encuentra involucrado [14].

Otro método para detectar la presencia del VPH son las pruebas serológicas que se basan en la detección de anticuerpos y su respuesta inmunitaria a nivel celular. Sin embargo, la sensibilidad de estas pruebas es baja en comparación con la detección de ADN viral por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR); las pruebas serológicas tienen un nivel de detección es de 50-70% [14]. Por otro lado, la PCR, se presenta una sensibilidad del 90%, la cual no varía con la edad, incluyendo a su vez una homogeneidad en los resultados. Actualmente, la herramienta más utilizada es la citología cervical, pero ésta presenta, aproximadamente, entre 20-30% de falsos negativos en cuanto a los frotis examinados. A su vez, es un proceso difícil y de alto costo debido a la automatización que busca reducir el error humano [14].

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son partículas inorgánicas que tienen propiedades únicas para la biodetección, de manera óptica, electroquímica y propiedades espectrales. Pueden llegar a medir desde 1 nm hasta 100 nm aproximadamente, pudiendo ser sintetizadas para su

bioconjugación o funcionalización con oligonucleótidos, anticuerpos, aptámeros u otras biomoléculas para el proceso de biodetección [15].

Debido a su tamaño, las nanopartículas tienen una buena relación “volumen-superficie”, haciéndolas ideales para enlaces simultáneos con múltiples ligandos en una sola nanopartícula, esto al ser expuestas a una gran concentración de las moléculas bioactivas. En vista de sus propiedades únicas, las nanopartículas han tenido un gran impacto en el campo biomédico, como es la detección de biomoléculas, vacunas, medicina regenerativa e ingeniería de tejido [16]. El uso de las nanopartículas (NPs) ha crecido exponencialmente estos últimos 15 años, específicamente en el tratamiento del cáncer, debido a su capacidad para la realización de tareas con gran precisión. Otra característica interesante es la facilidad de funcionalizar con oligonucleótidos tiolizados. En comparación con su alternativa más común, las AuNPs, suelen ser de menor costo, además de tener tiempo de resultados rápidos y una respuesta visual.

Con base en las repeticiones realizadas en primavera y verano del 2023, se decidió modificar la cantidad de oligo en proporción con la nanopartícula de oro utilizada, además se determinó que la estructura del ADN viral, al ser de doble cadena, no estaba siendo excitado lo suficiente para poder desdoblarse y obtener un enlace completo con el oligo. Las nanopartículas son sintetizadas con una solución de sal de oro y citratos de sodio de acuerdo con el método de Turkevich [33]. Estas AuNPs son funcionalizadas con la sonda Thiol Fwr diseñada en el PAP primavera 2022 con la secuencia /5Thiol MC6-D/CTGCCATATCTACTTCAGAACTAC calentando las sondas a 70 °C por 15 minutos, y se dejan reposar por 24 horas a 37 °C a 200 rpm. Posterior a esto, las nanopartículas ya funcionalizadas se calientan a 50 °C por 5 minutos y se les añade el ADN viral calentado a 98°C por 30 segundos. Se agita para promover la unión y se hace un barrido espectral desde 300 hasta 900 nm [16].

La tabla 1 muestra la organización de trabajo del presente PAP. Se especifican las actividades, el tiempo requerido para el trabajo y los recursos necesarios para llevarlas a cabo. También se menciona aproximadamente las semanas en las que se realizan.

Tabla 1. Cronograma de actividades previstas para la realización del PAP

Nombre	Recursos	Tiempo (días)	Agosto			Septiembre				Octubre			Noviembre			Diciembre	
			Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15
Congreso IMRC		7															
Síntesis de AuNPs	LN CF	1															
Mediciones de ADN viral modificando oligo	ES EX PM AD CB PT CT MP	2															
Mediciones de ADN viral con y sin centrifugacion	ES EX PM AD CB PT CT MP	2															
Mediciones de ADN viral modificando pH	ES EX PM AD CB PT CT MP	2															
Asesorías	AD	1															
Síntesis de AuNPs	LN CF CB AE	1															
Mediciones por triplicado calentando	ES EX PM AD CB PT																

	CT MP																		
Mediciones por triplicado sin calentar	ES EX PM AD CB PT CT MP																		
Análisis Estadístico	AE AD EX																		

Para interpretar correctamente la tabla 1, se presenta la tabla 2 que contiene el significado de las abreviaturas utilizadas para referir los recursos necesarios en cada actividad planeada.

Tabla 2. Abreviaturas de los recursos señalados en el cronograma de actividades

Recursos utilizados	
<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
LN	Laboratorio de Nanotecnología
AD	Asesoría Dr. David Mendoza
ES	Espectrofotómetro
CT	Centrífuga
CF	Campana de flujo laminar
MP	Microplaca
IBA	Incubadora con Agitación
PT	Parque Tecnológico
CB	Campana de bioseguridad
EX	Excel
AE	Asesoría Dra. Elsie Araujo

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Síntesis de nanopartículas

Para la síntesis de AuNPs del presente PAP de otoño 2023, se utilizó la metodología del PAP realizado en primavera 2023, basada en la síntesis química de Turkevich, pero modificando

la concentración de citratos de sodio y las soluciones de HAuCl_4 utilizados [33]. Fueron proporcionadas nuevas soluciones de HAuCl_4 preparadas por los técnicos del Laboratorio de Nanotecnología. Esta nueva solución tenía una concentración de 20 mM, por lo que se utilizó 0.625 μL y se agregó a un vaso de precipitado donde se aforó a 50 mL con agua destilada para llegar a la concentración deseada de 0.25 mM. Después se preparó la solución de citrato de sodio a 340 mM, donde se pesaron 0.25 g de citrato de sodio que fueron añadidos a 2.5 mL de agua destilada, posterior su realización se mantuvieron en agitación ambas soluciones.

Se montó un condensador de rosario y un matraz de tres bocas a un baño de aceite para realizar la síntesis como se muestra en la figura 1. Después de que el aceite alcanzó una temperatura de 80 °C, se agregó la solución de HAuCl_4 , cuando el aceite alcanzó una temperatura de 95-100 °C se agregaron 200 μL de citrato de sodio y se dejó reaccionar durante 1 hora manteniendo la temperatura entre 95-98 °C. Después se dejaron enfriar las nanopartículas sintetizadas para ser guardadas en un tubo Falcon de 50 mL cubierto con aluminio para evitar su degradación.



Figura 1. Montado de equipo para síntesis de nanopartículas de oro.

Funcionalización de nanopartículas

Durante este semestre, la funcionalización de nanopartículas se realizó con 3 diferentes tratamientos con la finalidad de encontrar el tratamiento óptimo. Se centrifugaron 450 μ l de AuNPs en una centrifuga Hermle Labortechnik TM Z 366, con el propósito de obtener un pellet de nanopartículas, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en otros 450 μ l de AuNPs para obtener las nanopartículas a una concentración de 2X.

Para los tratamientos realizados con una concentración de funcionalización de 1 mM, se tomó 1 μL de oligo obtenido de IDT (Integrated DNA Technologies) con la secuencia /5Thiol MC6-D/CTGCCATATCTACTTCAGAAACTAC y se le agregaron 49 μL miliQ, posteriormente se tomaron 25 μL y se introdujeron a un nuevo tubo Eppendorf que se aforó con 25 μL de agua miliQ. Para el segundo tratamiento se utilizó el oligo a una concentración de 0.5 mM utilizando la misma metodología para llegar a 1 mM y de este se tomaron 25 μL de oligo aforando de nuevo con 25 μL de agua miliQ.

Una vez obtenidas las distintas concentraciones de oligo (0.5 mM y 1 mM), se calentaron en un IKA Dry Block Heater TM a 70 °C por 10 minutos; después se agregaron 450 μL de AuNPs para un volumen final de 500 μL , esto se realizó para todos los ADN usados, VPH 16, VPH 18 y FZD9 (Figura 2). Se dejaron durante 24 horas en una incubadora orbital INFORS HT Ecotron TM a 32 °C y 150 rpm.

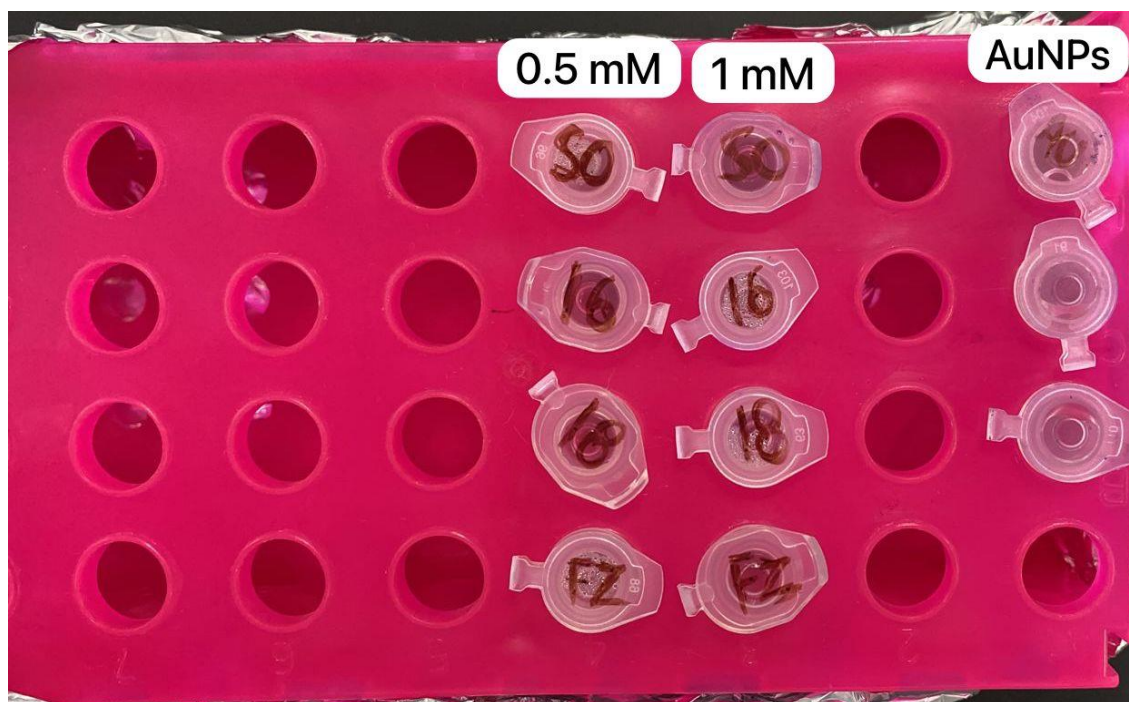


Figura 2. Funcionalización con oligo de nanopartículas 1x y 2x con 0.5 mM y 1mM respectivamente.

Modificación de pH de nanopartículas

Bajo el supuesto de que el ADN no se estaba acoplando a la nanopartícula de oro funcionalizada, se optó por modificar el pH de la solución de nanopartícula antes de que se agregara el oligo. Se midió el pH con tiras reactivas Merck y se modificó el pH hasta un nivel fisiológico aproximado de 7.0 con una solución de sales de fosfato. Se agregaron aproximadamente 200 μL de PBS a 1 mL de nanopartícula 2X contenidas en los tubos Eppendorf (Figura 3).

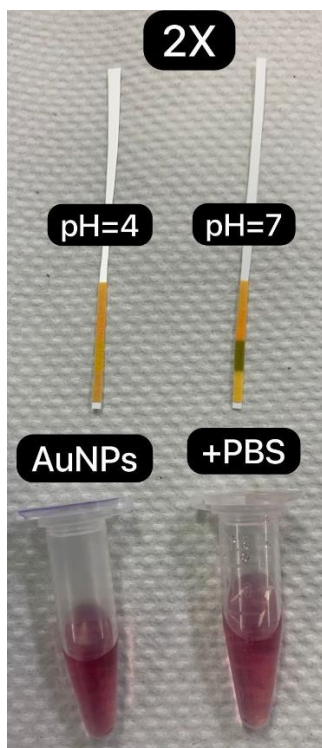


Figura 3. Modificaciones de pH de 4.0 a 7.0 agregando PBS.

Calentamiento de nanopartículas y ADN

Una vez teniendo las nanopartículas funcionalizadas con el oligo Thiol Fwr, se realizó la detección de material genético problema. Se calentó la nanopartícula funcionalizada contenida en un tubo Eppendorf, en un IKA Dry Block Heater TM a 50 °C por 5 minutos y simultáneamente el ADN de VPH 16, 18 y FZD9 se calentó en un IKA Dry Block Heater TM a 98°C por 30 segundos procurando sacar ambos del calor al mismo tiempo. Pasado el tiempo de calentamiento, se agregó a los 500 μL de nanopartícula funcionalizada, 1 μL de ADN

teniendo de esta forma una concentración de 100 pg/mL de material genético. Se agitaron un poco los tubos Eppendorf y se dejó reaccionar la mezcla.

Mediciones en espectrofotómetro

Se transfirieron 200 μ L de cada tubo funcionalizado y con ADN, posterior a su agitación y reacción a una microplaca de 96 pocillos (Figura 4). La microplaca se leyó en un espectrofotómetro Multiskan™ GO de Thermo Scientific™ en el software SkanIt de Thermo Scientific™ para realizar un barrido de 200 a 800 nm, haciendo pasos de 1 nm y mediciones de precisión (Figura 5)

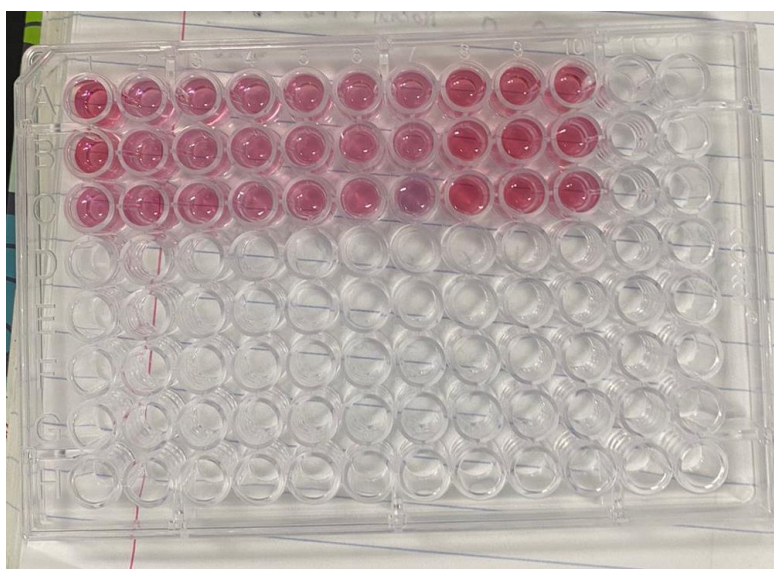


Figura 4. Mediciones en microplaca de 96 pocillos.

NSI/SBS Standard, 96-well

Nombre: Placa 1

	1	2	3
A	AuNPs 1x0001 0 Grupo 1	AuNPs 2x0001 0 Grupo 1	
B	1x SO 1 mm00 0 Grupo 1	2x SO 0.5 mm 0 Grupo 1	
C	1x VPH16 1 m 0 Grupo 1	2x VPH16 0.5 0 Grupo 1	
D	1x VPH18 1 m 0 Grupo 1	2x VPH18 0.5 0 Grupo 1	
E	1x FZD9 1 mm 0 Grupo 1	2x FZD9 0.5 m 0 Grupo 1	
F			

Figura 5. Ejemplo de lecturas en software SkanIt.

Análisis de resultados

Una vez obtenido el barrido espectral de las mediciones, se graficaron en el software Excel y se limitó su medición para mostrar el efecto plasmón, el cual se encuentra aproximadamente a 540 nm, obteniendo cambios en la intensidad de la absorbancia.

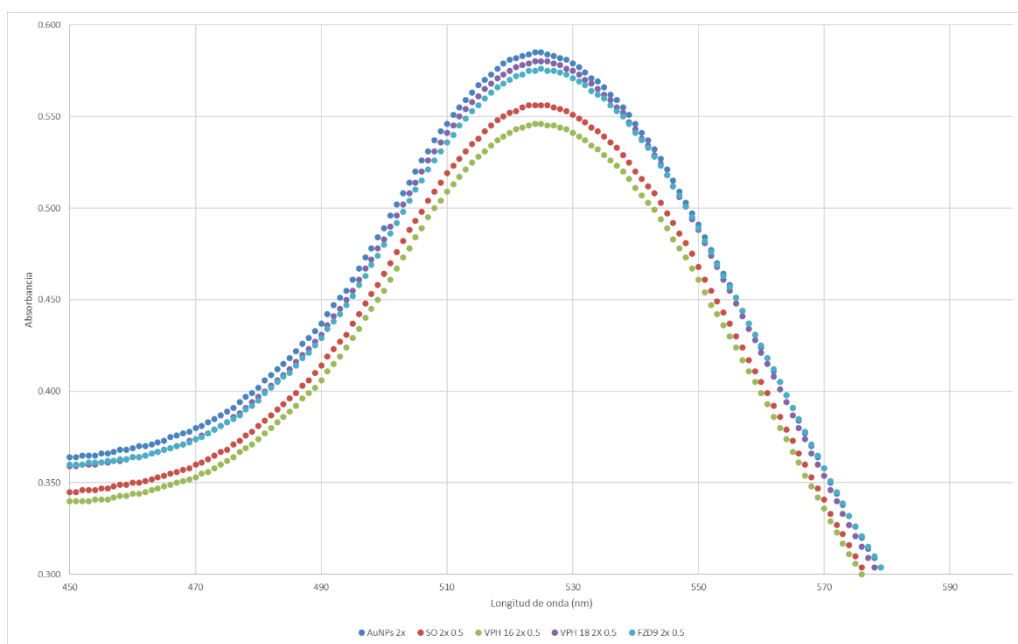


Figura 6. Barrido espectral de una medición con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo sin cambiar el pH.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Al inicio del presente semestre Otoño 2023, se hicieron mediciones con la metodología desarrollada en el PAP del semestre Primavera 2023: se sintetizaron nuevas nanopartículas, se funcionalizaron y se midieron los ADN's de VPH 16, VPH 18 y FZD9. Esta primera medición se realizó con una concentración de nanopartículas 1x con 1 μ M de sonda Thiol FWR (Figura 7) y 2x con 0.5 μ M de sonda Thiol FWR (Figura 8). Esto se realizó con la finalidad de tener un punto de partida para este PAP de Otoño 2023.

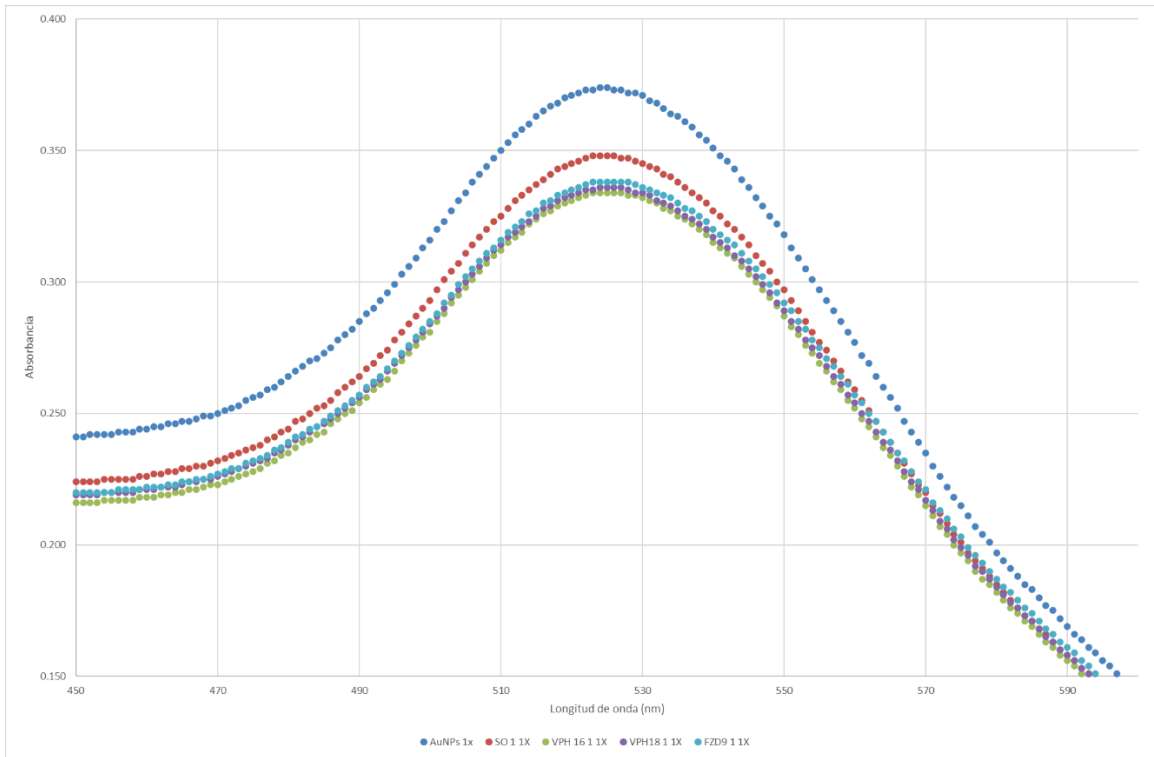


Figura 7. Barrido espectral de una medición con nanopartícula de oro 1x y 1 mM de oligo con metodología del PAP primavera 2023.

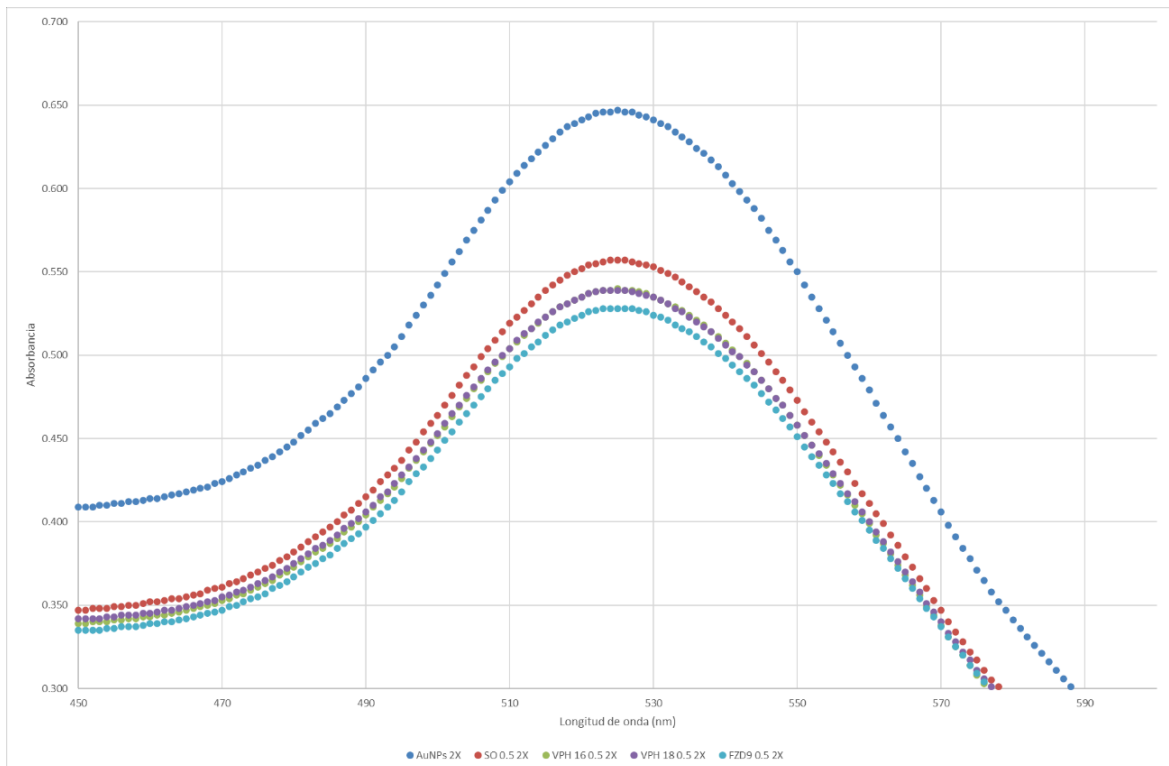
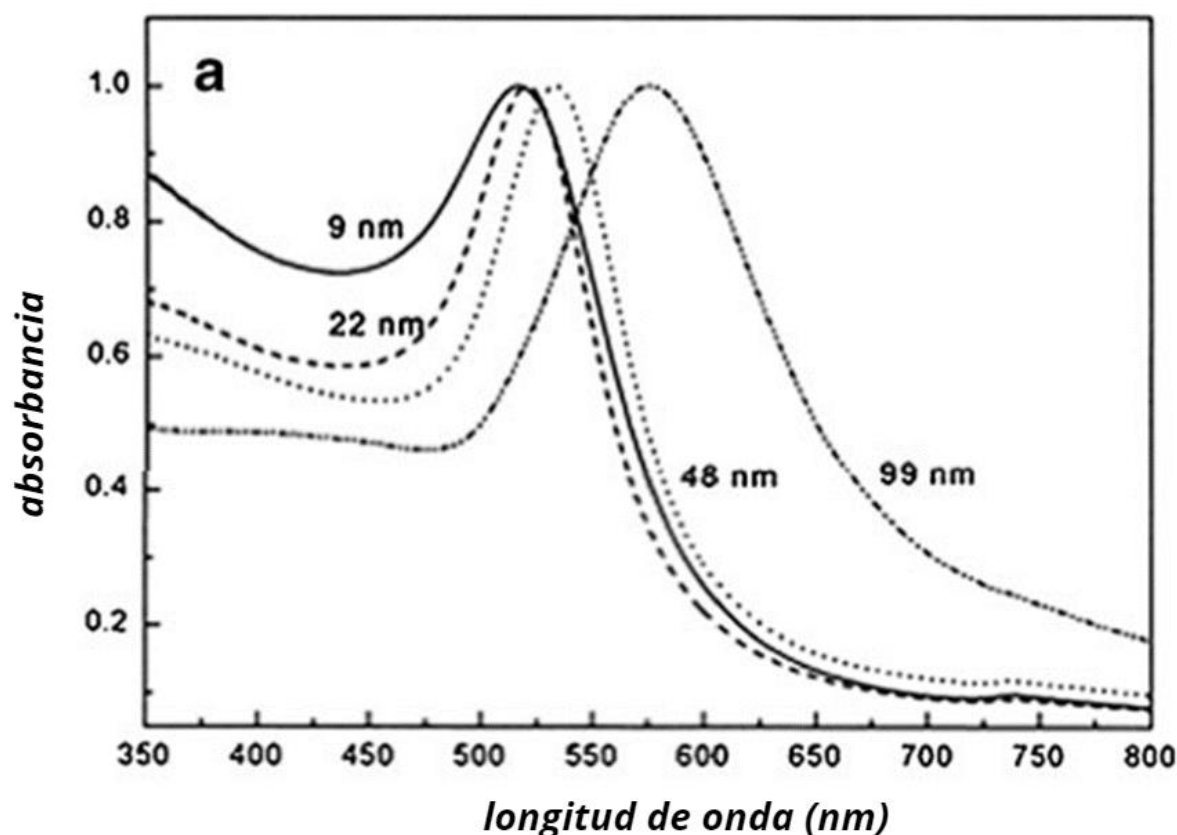


Figura 8. Barrido espectral de una medición con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo con metodología del PAP primavera 2023.

Lo primero que se revisó en todas las mediciones de este PAP Otoño 2023 es el tamaño de nanopartícula. En pasados semestres no se evaluaba esta característica de la nanopartícula, debido a que no se cuenta con los equipos necesarios para hacer determinaciones de morfología y diámetro, por lo que se decidió usar valores reportados en bibliografía para tratar de estimar el tamaño.

El trabajo de Zeng y colaboradores [34] es el que más se acercaba a nuestras posibilidades, en este se evalúa la misma metodología de síntesis utilizada en el presente PAP, pero se modificaron las concentraciones para determinar cómo estas afectan la formación de las nanopartículas de oro.



Del barrido espectral mostrado en la Figura 9 se extrajeron los picos máximos, con valores de 517, 521, 533 y 575 nm para nanopartículas de 9, 22, 48 y 99 nm respectivamente. De las nanopartículas sintetizadas en el presente PAP y mostradas en la Figura 7 y 8 se obtuvo que

el pico máximo era a 525 nm, por lo que se especula que las nanopartículas deben tener un tamaño entre 22 y 48 nm.

Debido al amplio rango obtenido, se utilizaron también los datos reportados por un fabricante de nanopartículas que relaciona el diámetro de la nanopartícula con la longitud de onda máxima [35]. Estos se reportan en la tabla 2, con la cual podemos confirmar que las nanopartículas se encuentran con un tamaño menor a 30 nm, posiblemente entre 25-30 nm, esta tabla se usó para determinar el tamaño de cada síntesis.

Tabla 2. Propiedades de nanopartículas vendidas por MERCK [35].

Diámetro (nm)	Pico máximo, longitud de onda (nm)
5	515-520
10	515-520
15	520
20	524
30	526
40	530
50	535
60	540
80	553
100	572

Una vez determinados los tamaños de nanopartícula, es posible relacionar este con la concentración. Aunque no podemos saber cuántas nanopartículas se tienen, se decidió establecer la absorbancia 1 como la máxima concentración, por lo que para este primer caso las nanopartículas (Figura 7 y 8) tienen una concentración de una absorbancia de 0.650.

Estas primeras mediciones no mostraron un efecto plasmón o corrimiento horizontal. No se separaron los ADN virales para determinar la presencia de VPH 16 y diferenciarlo de las otras muestras problema. Como se muestra en la Figura 9, al cambiar el tamaño de la nanopartícula en este caso uniendo la sonda y posteriormente el ADN, debe haber un corrimiento o movimiento horizontal, en el cual cambie el color de la solución de

nanopartículas dentro del espectro rojo. Esto es lo que se buscó en las mediciones realizadas durante todo el presente PAP [34].

Las nanopartículas de oro pueden tener distintos tamaños, formas y estructuras, por lo que se producen distintas resonancias de plasmón en el rango visible y cercano al infrarrojo, específicamente las nanopartículas de oro esféricas tienen una resonancia plasmón fuerte en los valores cercanos a 520 nm [36]. El cambio rojo de las resonancias plasmón se puede observar en nanopartículas de 8 a 10 nm, arriba de este valor el movimiento horizontal en los barridos progresa linealmente con el tamaño de partícula, mientras que debajo el cambio es no lineal [37].

Debido a esto con nanopartículas por encima de 10 nm, como las usadas en este PAP, se espera que el cambio sea lineal y que se observe un corrimiento o movimiento horizontal en el barrido espectral UV-Vis y por lo tanto un cambio de coloración, cosa que no se logró con esta primera metodología.

En la investigación de Pourali y colaboradores [38] se funcionalizaron nanopartículas de oro con grupos Thiol, con las cuales se detectaron una variedad de ácidos nucleicos. Se comparó la diferencia en los espectros al usar ARN y ADN y cuando este era de una o doble cadena. En el presente PAP se trabajó con ADN de doble cadena por lo que se esperaría una disminución en la absorbancia cuando la sonda detecte el ADN de VPH 16-18 o FZD9 y también una modificación en el efecto plasmón como el observado en la Figura 10. Este comportamiento tampoco fue observado en las primeras mediciones.

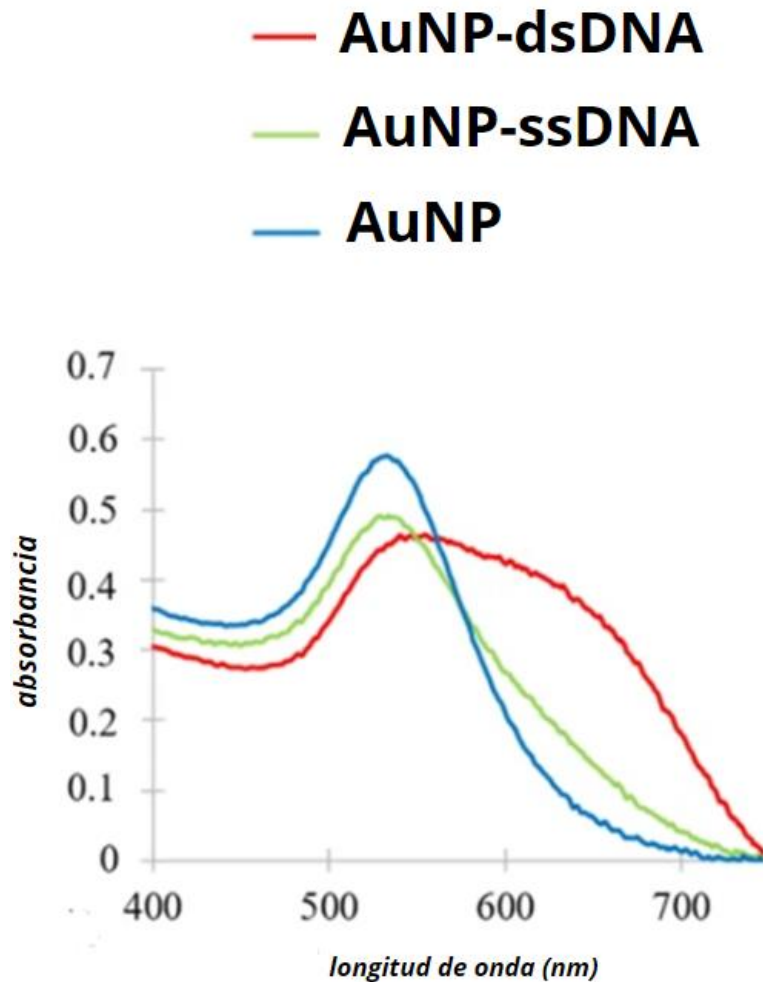


Figura 10. Barrido espectral de nanopartículas unidas a ADN de doble y simple cadena [38].

Se evaluaron las posibles causas de porque no se observaba un movimiento horizontal, ni un cambio en la forma o tamaño de la nanopartícula y porque tampoco estaba cambiando el espectro al detectar el ADN.

Se analizó un artículo [39] en el que se explica como funcionalizar nanopartículas de oro que se encuentran en citratos. En esta se purifica la sonda a través de columnas o centrifugaciones, de manera que se tenga en solución nanopartícula y sonda. En este protocolo se menciona la importancia de eliminar los iones Mg^{2+} ya que son inhibidores de las cargas electrostáticas de la nanopartícula estabilizada con citratos.

Se decidió evaluar esta metodología añadiendo una centrifugación después de la funcionalización, de esta manera se recuperó un pellet de nanopartículas con sonda acoplada

a ellas y la sonda extra se desechó en el sobrenadante, de manera que cuando se agregara el ADN viral este se pudiera acoplar a la sonda unida a la nanopartícula y no a sonda libre. Se obtuvieron los resultados que se comentan en los siguientes párrafos.

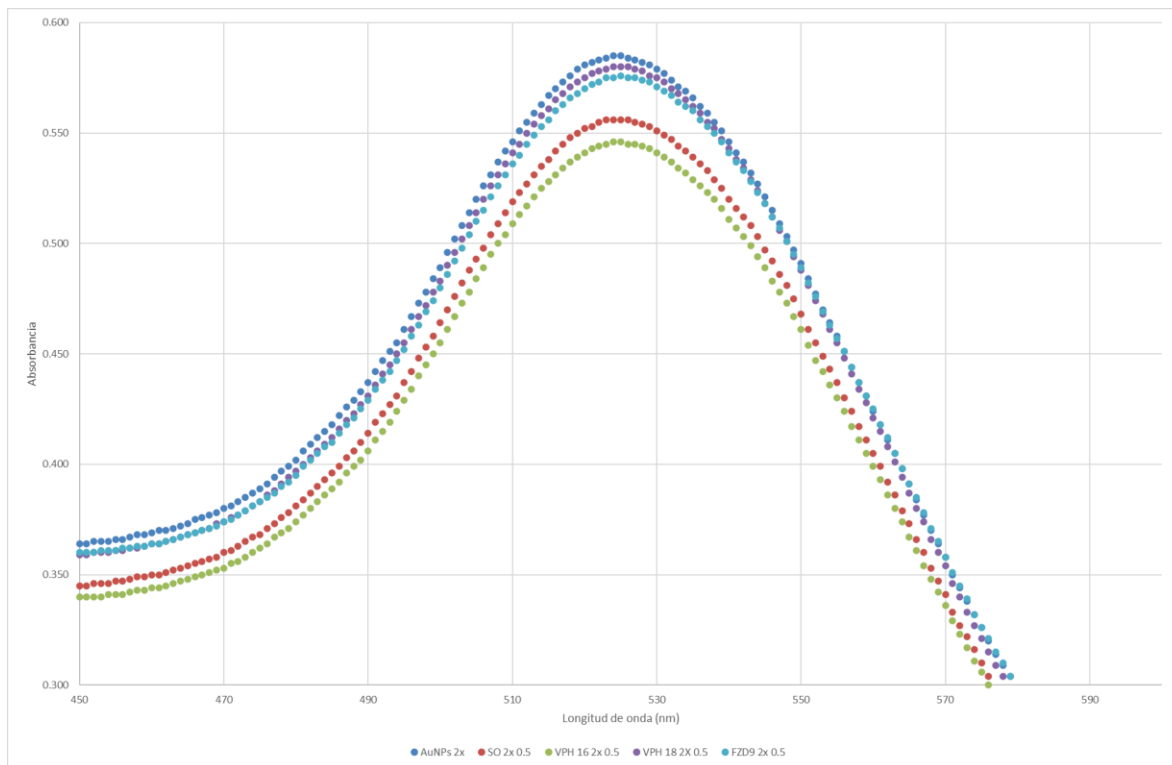


Figura 11. Barrido espectral de una medición con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo sin centrifugar, metodología PAP Primavera 2023.

Para estas mediciones se sintetizaron nuevas nanopartículas, y se realizó una repetición de la metodología base realizada en Primavera 2023 mostrada en la figura 11, esta sirvió como blanco para determinar si es que hay un cambio en el comportamiento al eliminar la sonda excedente con una centrifugación o si es un paso que no es necesario.

En estas nanopartículas se tiene un pico en la longitud de onda de 524 nm, lo cual indicaría una nanopartícula de 20 nm, más pequeña a lo inicialmente usado, pero con una concentración de 556 de absorbancia [35].

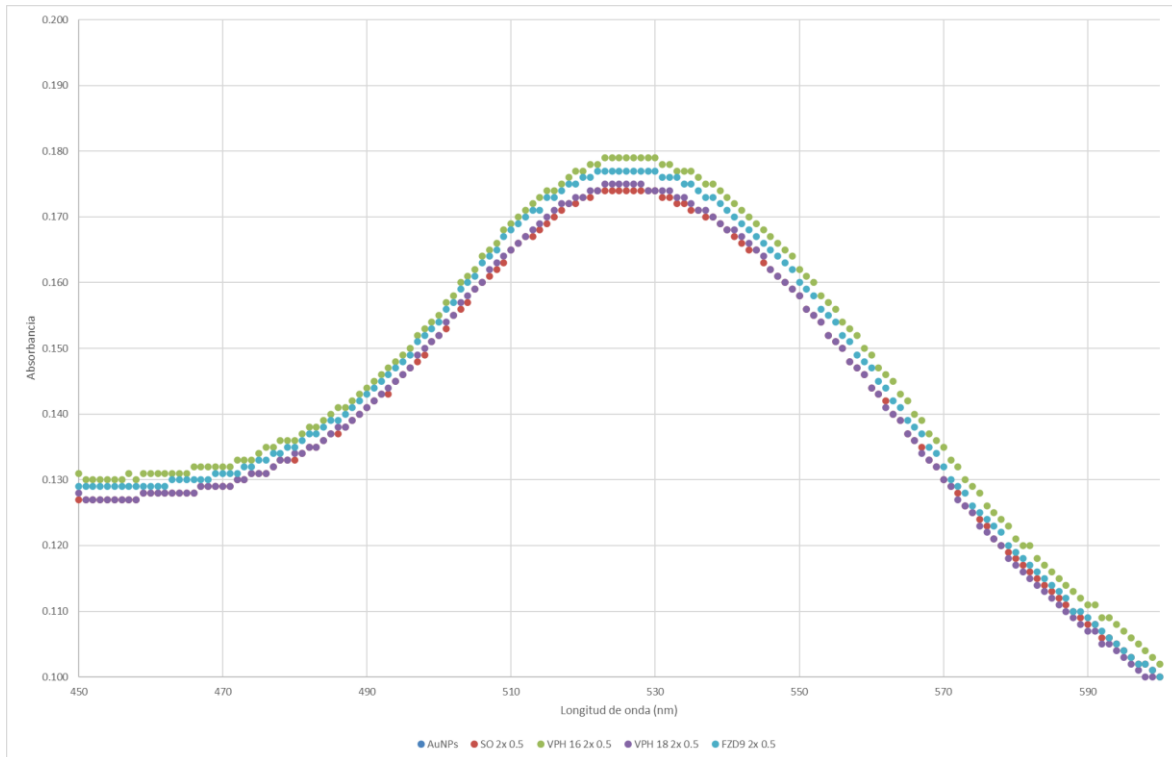


Figura 12. Barrido espectral de una medición con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo centrifugando.

En las mediciones mostradas en la figura 12 se agregó una centrifugación después del proceso de funcionalización, esperando que al resuspender con micropipeta se mantuviera la absorbancia de la nanopartícula, pero con ciertas modificaciones, esto debido a la eliminación de ruido en las mediciones por sonda libre acoplada a ADN viral. Al hacer la centrifugación se perdió por completo la absorbancia obtenida, pasando de una absorbancia de 0.550 a 0.180 en promedio, por lo que fue descartada la necesidad de una centrifugación.

Con la metodología inicial usada en las segundas mediciones (Figura 11) se obtuvieron resultados diferentes a los presentados al inicio del semestre (Figura 8), en las nuevas mediciones, el ADN del VPH 16 parece que se acopla a la nanopartícula funcionalizada y por ello precipita un poco mostrando una absorbancia menor, pero sigue sin haber un cambio en el efecto plasmón (Corrimiento horizontal).

Debido a que el VPH 16 fue el que precipita, se decidió repetir la metodología estándar o empleada en Primavera 2023 y volver a intentar centrifugando para determinar si se repetía el mismo orden de ADN y si se tenía algún movimiento en el efecto plasmón.

El pH es un factor que no se ha evaluado en toda la investigación del PAP, por ello se decidió investigar acerca de su importancia. Se encontró que es una condición clave cuando se trabaja con ADN, específicamente por la hibridación debido a que esta ocurre en pH de 6.5 a 8. El valor de pH influye directamente en la eficiencia del objetivo y la especificidad de la sonda, se reporta que con un pH de 7-8, (pH fisiológico), se tiene una alta discriminación entre uniones complementarias y no coincidentes [40]. Debido a esto, también se realizó una medición modificando el pH con buffer de fosfatos a un valor aproximado entre 7 y 8.

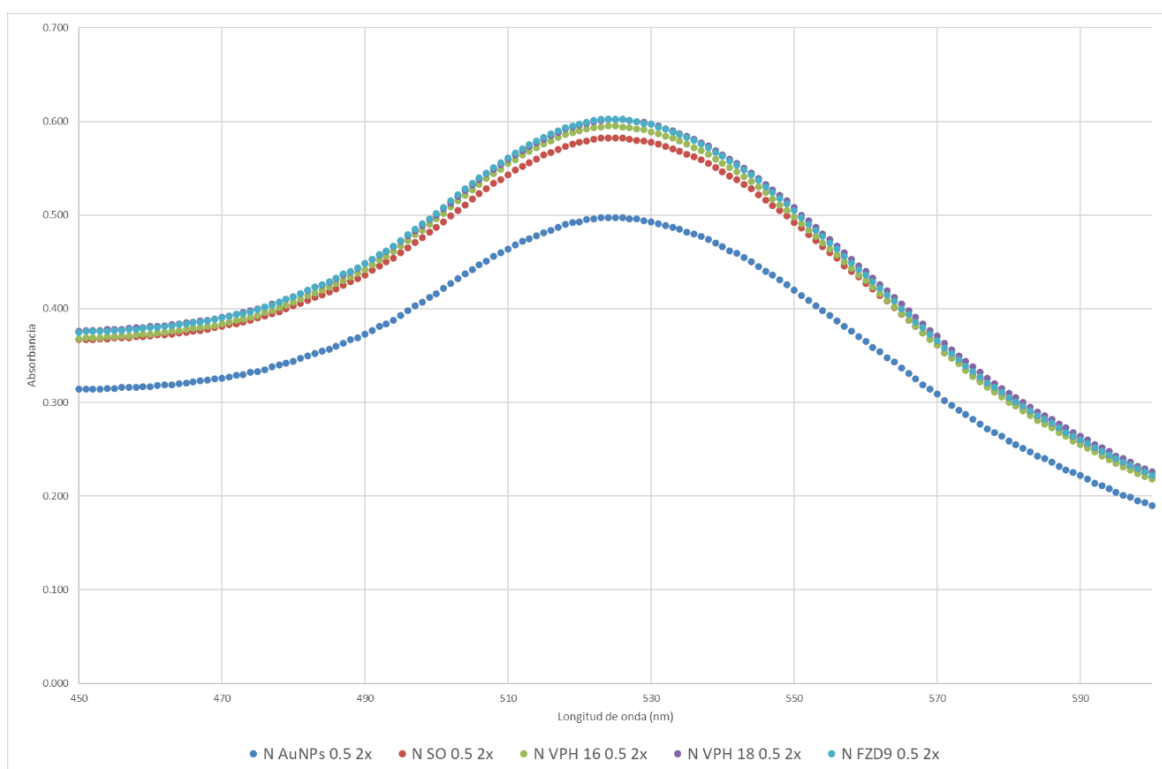


Figura 13. Barrido espectral de la repetición de la medición con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo sin centrifugar, metodología PAP Primavera 2023.

Se realizaron nuevas nanopartículas las cuales tenían un pico de absorbancia máximo en 524 nm con una absorbancia y concentración de 0.497, dando un diámetro de 20 nm, muy parecidas a las usadas anteriormente, pero con menor concentración.

Los barridos con la metodología normal no se repitieron, estos se muestran en la figura 13 y son comparados con los anteriores mostrados en la Figura 11, en estas nuevas mediciones todos los ADN's virales se quedaron por encima de las nanopartículas y la nanopartícula con sonda no precipitó como se esperaba, lo que denota una mala funcionalización.

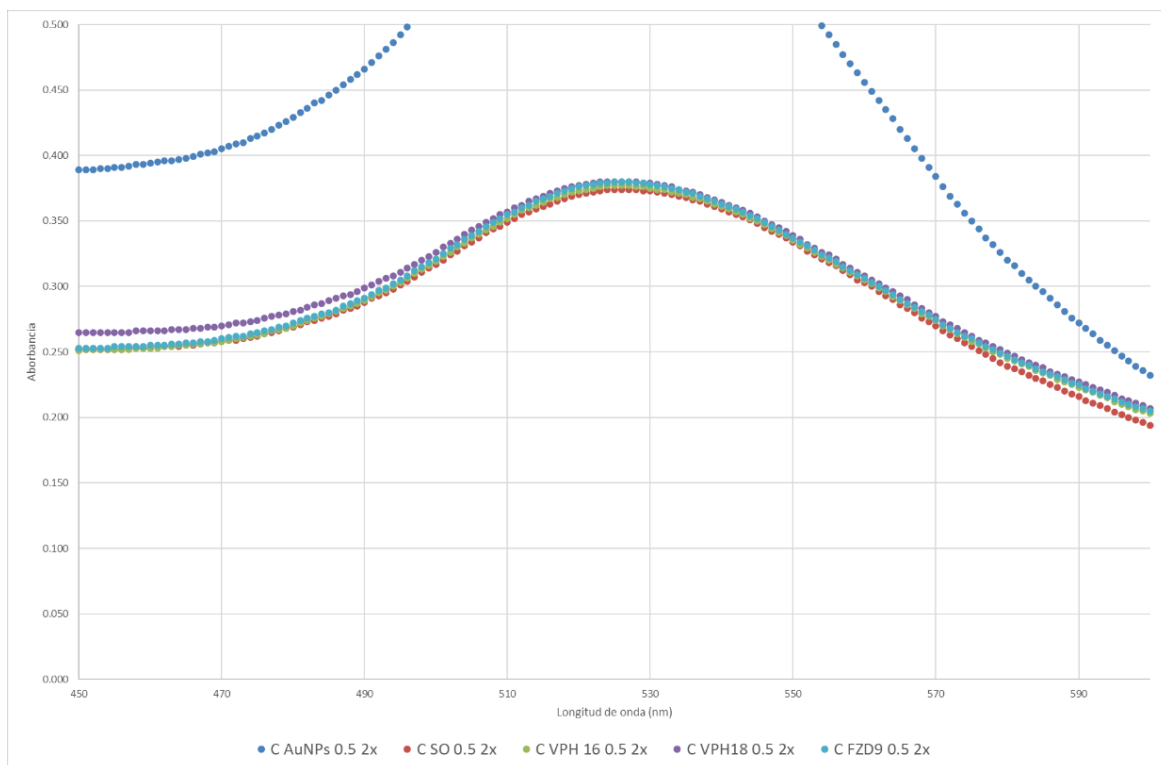


Figura 14. Barrido espectral de la repetición de la medición con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo centrifugando.

Como se mencionó anteriormente, se repitieron las mediciones con la metodología con centrifugación (Figura 14) y se obtuvo el mismo comportamiento. Los ADN's y las nanopartículas funcionalizadas se encuentran precipitadas, probablemente debido a la agregación de las nanopartículas, debido a esto se decidió abandonar por completo esta opción de centrifugar.

Para comprobar la hipótesis de que el pH en la solución coloidal de nanopartículas era el problema o está generando alguna interferencia, se ajustó el pH con buffer salino de fosfatos (PBS). Esto se realizó antes de iniciar el proceso de funcionalización y medición, el cual se llevó de un pH 4 a 7, siendo medido con tiras reactivas (Figura 15).



Figura 15. Ajuste de pH de las nanopartículas de oro con PBS, de un pH de 4 (Tira izquierda) a un pH de 7 (Tira derecha).

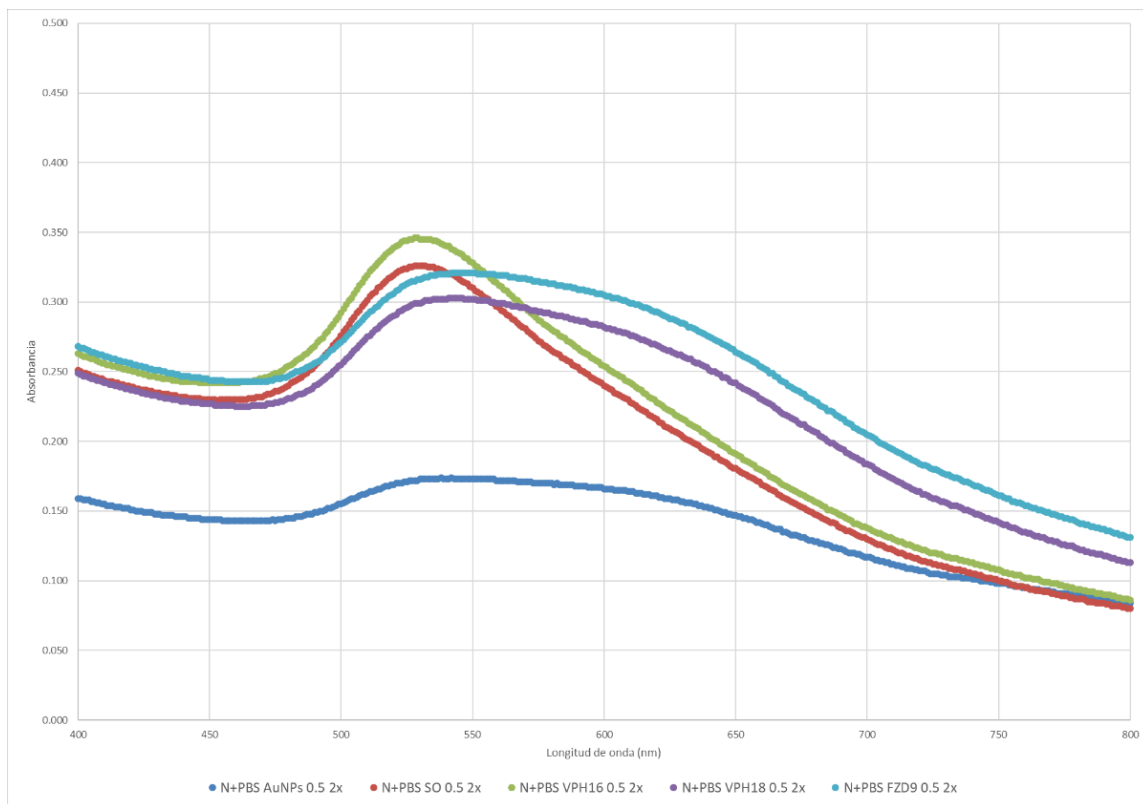


Figura 16. Barrido espectral de una medición con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo ajustando el pH a 7.

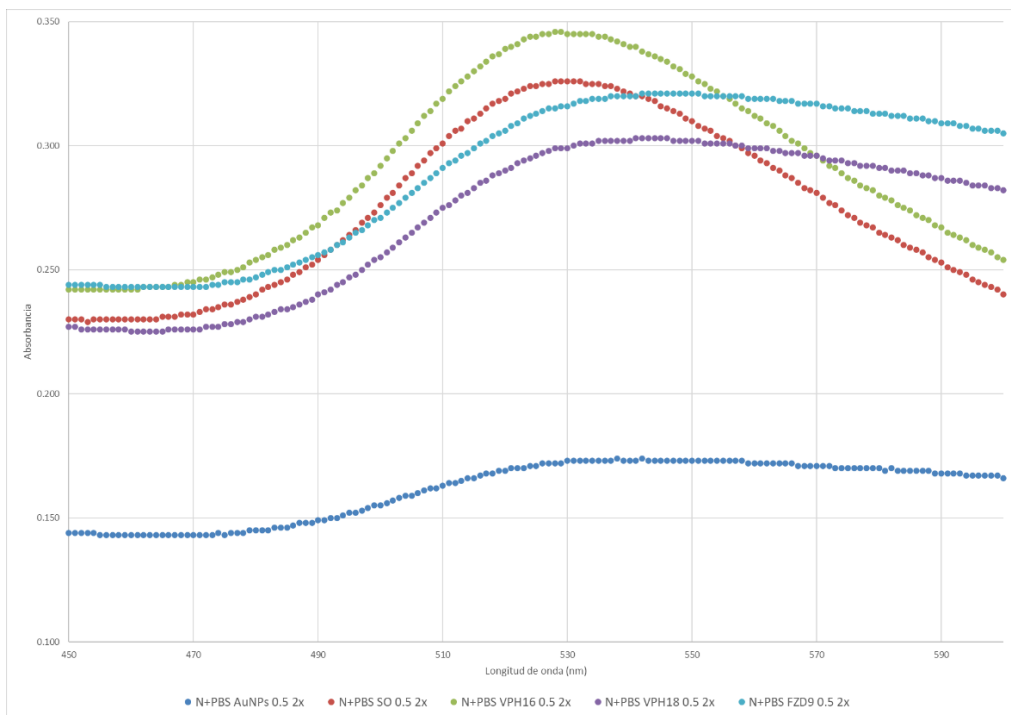


Figura 17. Acercamiento del barrido espectral de una medición con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo ajustando el pH a 7.

Las figuras 16 y 17 muestran los barridos obtenidos después de modificar el pH. Se puede observar claramente un cambio en la resonancia de la nanopartícula, donde hay un desplazamiento en aproximadamente 520 nm, queda por definir si se trata de una agregación, efecto plasmón o desnaturalización. En estas gráficas se puede observar en la parte inferior las nanopartículas con pH modificado, mientras que al funcionalizar el espectro UV-Vis recupera la forma curva característica, cuando se agrega el ADN viral de VPH 18 y FZD9 se pierde este efecto y se aplana la curva, mientras que al unirse el VPH 16 la absorbancia se maximiza.

Las modificaciones de pH dieron por primera vez un cambio en la coloración de las nanopartículas al agregar el ADN viral problema (Figura 18). Se puede observar que la solución de nanopartículas tiene un color que cambia de rojo a morado debido a la agregación de las nanopartículas, por otro lado, cuando se agrega el ADN de VPH 18 y FZD9 pareciera que la solución se vuelve más morada mientras que con VPH 16 se recupera un poco el color rojo.

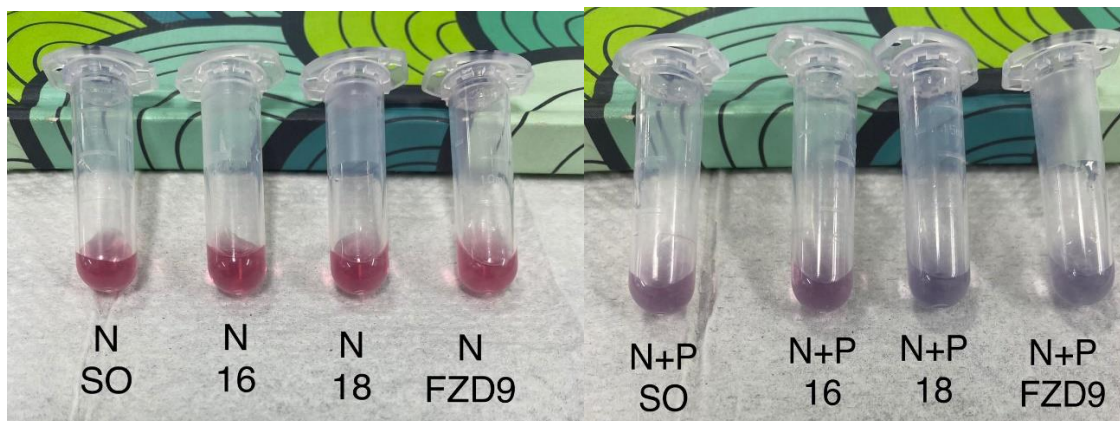


Figura 18. Comparación de coloraciones al cambiar el pH de las nanopartículas y después de agregar el ADN problema, N) sin cambio de pH y N+P) cambio de pH.

En la investigación de Majdinasab y colaboradores [41] se buscaba detectar el gen *invA* (60 pb) de *Salmonella* usando nanopartículas de 20 nm funcionalizadas con un oligo (31 pb) el cual tenía un modificador Alkyl-thiol muy parecido al usado en este PAP. Se reporta que se tienen dos estados de la nanopartícula, un estado basal, es decir la nanopartícula de oro libre en solución coloidal y estable y otro donde está funcionalizada y se encuentran modificadas sus cargas, es debido a este cambio que se modifica la forma en la que se observa el barrido espectral (Figura 19).

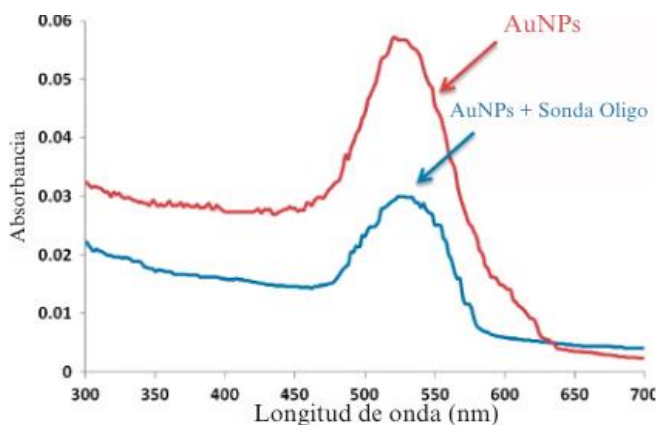


Figura 19. Modificación en el barrido espectral al funcionalizar una nanopartícula [41].

Estos dos fenómenos se observan cuando se le agrega el ADN problema a la nanopartícula funcionalizada, creando agregados, redes tridimensionales de nanopartícula con ADN y sonda Thiol, esto genera una modificación de la resonancia plasmón de 526 a 574 nm

aproximadamente, ya que depende del tamaño de ADN, sonda y nanopartícula el cambio observado (Figura 20) [41].

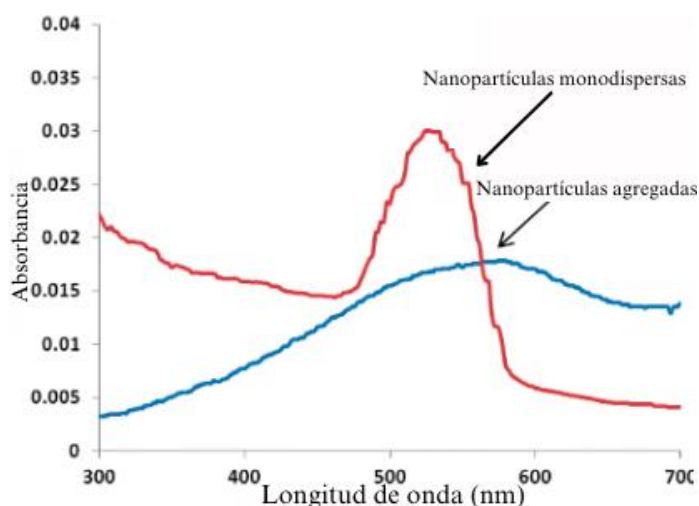


Figura 20. Comportamiento de nanopartículas agregadas y monodispersas [41].

El comportamiento reportado en la Figura 20 es muy parecido al obtenido al modificar el pH y agregar los ADNs virales (Figura 16 y 17). En esta medición, se observa que la nanopartícula tiene un comportamiento agregado, posiblemente por la modificación de pH, al momento que esta es funcionalizada se vuelve dispersa y se recupera un poco el pico característico de las nanopartículas, esto sería contrario a lo reportado por Majdinasab y colaboradores [41].

Al momento de agregar el ADN, en presencia de VPH 18 y FZD9, se mantiene el efecto agregado de las nanopartículas, pudiéndosele atribuir el cambio en el barrido por la presencia de ciertas cargas libres que permitan uniones no específicas. En presencia de VPH 16, este efecto agregado se pierde y se vuelven monodispersas de nuevo, aumentando la absorbancia posiblemente por un incremento en el tamaño de la nanopartícula [40] [41].

Se decidió repetir las mediciones de las nanopartículas funcionalizadas y con ADNs virales con la metodología inicial del PAP primavera 2023, pero ahora por triplicado para poder descartar por completo que el comportamiento obtenido no fue una coincidencia y que en

verdad de está teniendo una segregación de la muestra con VPH 16. Las siguientes figuras y párrafos muestran y discuten los barridos obtenidos.

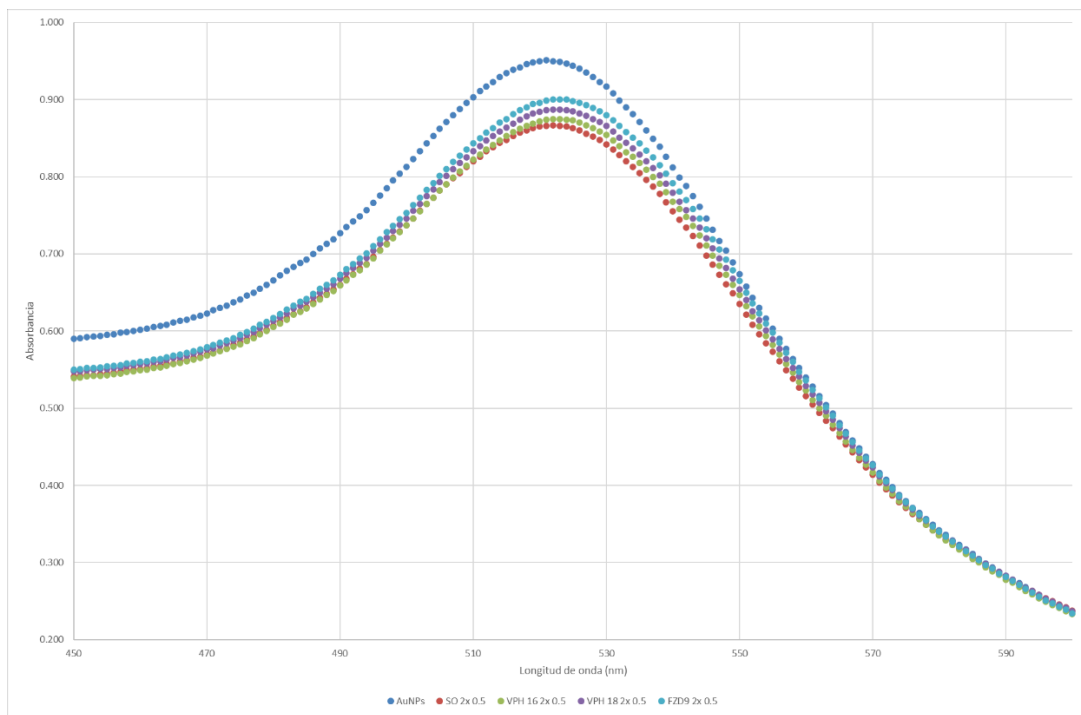


Figura 21. Repetición 1 del barrido espectral con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo con metodología de PAP Primavera 2023.

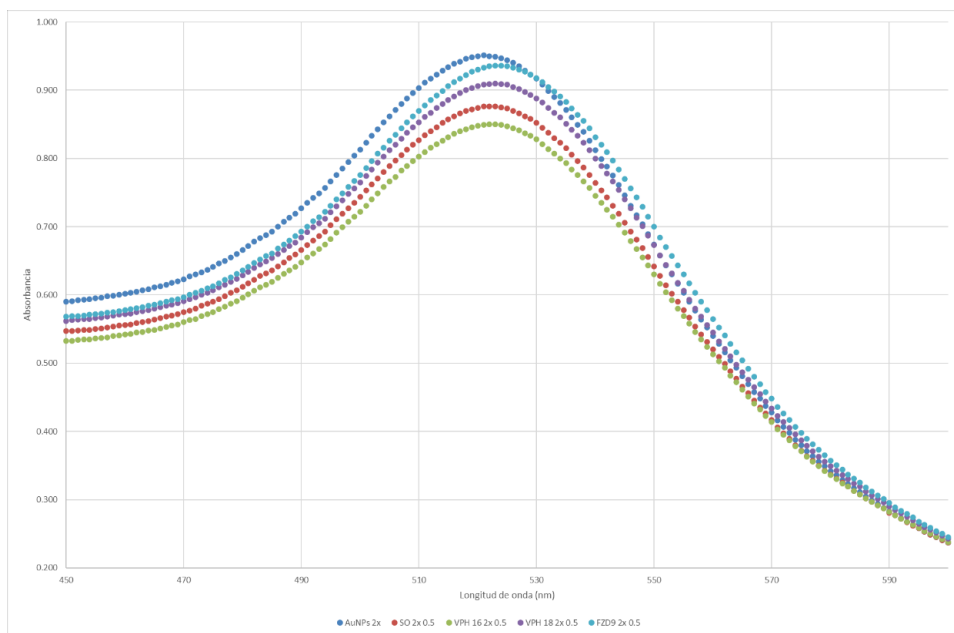


Figura 22. Repetición 2 del barrido espectral con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo con metodología de PAP Primavera 2023.

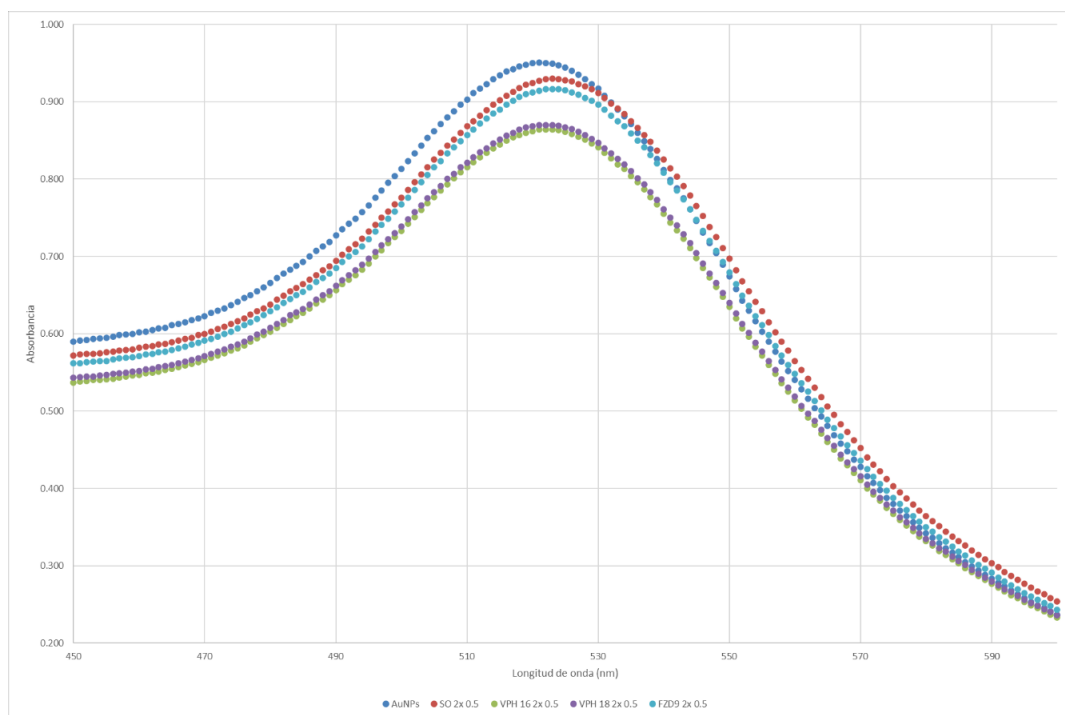


Figura 23. Repetición 3 del barrido espectral con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo con metodología de PAP Primavera 2023.

Las Figuras 21, 22 y 23 muestran los barridos espectrales obtenidos con nanopartículas de oro de 20 nm y una concentración de 0.951 de absorbancia. En estas se presenta un movimiento horizontal, pero no hubo cambios en la coloración de las muestras. Este comportamiento no es igual en todas las repeticiones, en algunas el ADN más bajo es el VPH 16, en otras se encuentran todas las muestras por encima de la nanopartícula funcionalizada.

Estas mediciones muestran el primer efecto plasmón medido en este PAP, se tiene un desplazamiento de 6-8 nm por muestra respecto a las nanopartículas con y sin sonda, lo cual se encuentra en lo reportado para nanopartículas mayores a 10 nm, pero no hay una diferenciación de muestras, por lo que no se puede afirmar que se detectó VPH 16.

Es claro que la principal modificación y factor a cuidar es el pH de la solución para permitir la unión del ADN, debido a esto también se buscó hacer por triplicado las mediciones modificando el pH con PBS. Se planteó que se mantendría el cambio en los barridos, y que además al calentar el ADN se tendría una selectividad por el VPH 16 como anteriormente se obtuvo y que al ser por triplicado se obtendrían los mismos resultados.

Se realizó nuevamente la experimentación utilizando la metodología del PAP Primavera 2023. Se realizaron algunas modificaciones experimentales, se optó por ajustar el pH como se realizó en previas experimentaciones y, además, se decidió ajustar el pH y calentar tanto AuNPs como ADN, esto con el fin de incrementar la energía potencial de unión entre sonda y nanopartícula, se utilizó la misma técnica de medición empleada en las repeticiones anteriores y se obtuvieron las figuras 24,25 y 26.

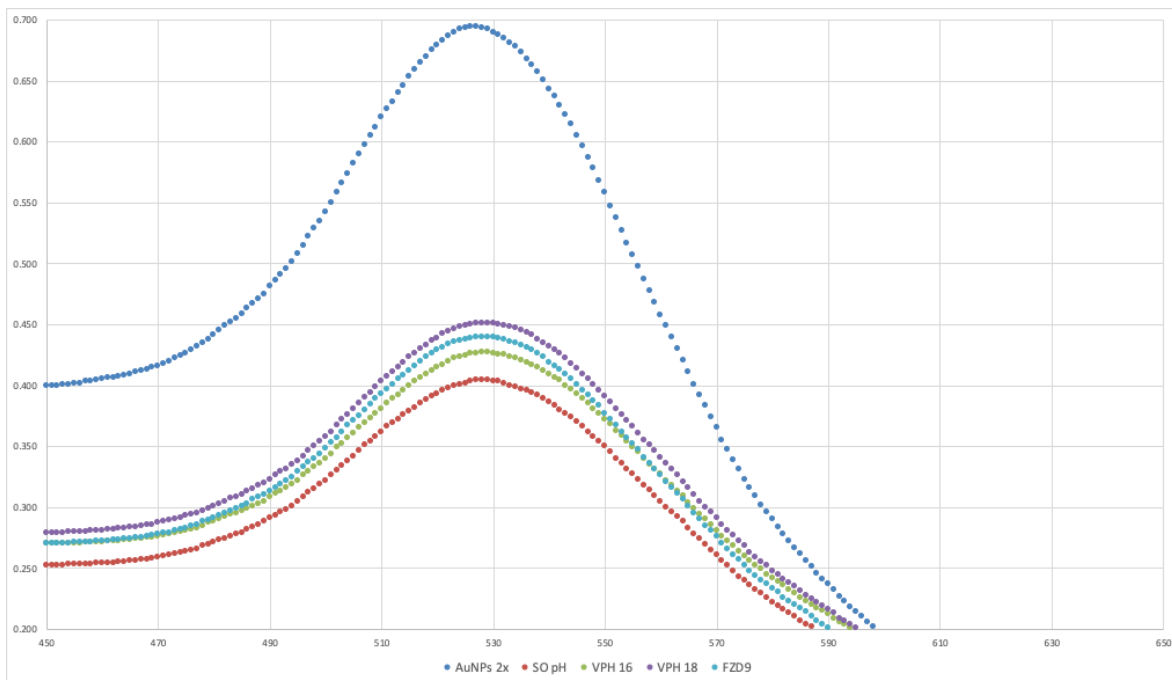


Figura 24. Repetición 1 del barrido espectral con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo con metodología cambio de pH y calentamiento de nanopartícula y oligo.

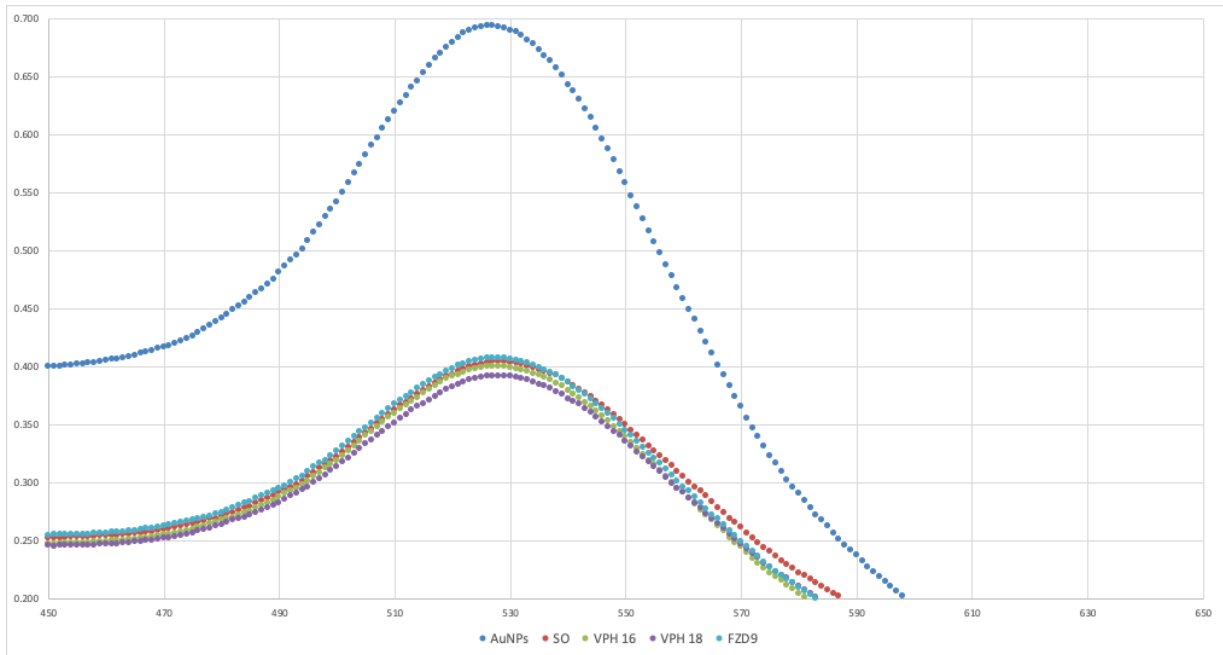


Figura 25. Repetición 2 del barrido espectral con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo con metodología cambio de pH y calentamiento de nanopartícula y oligo.

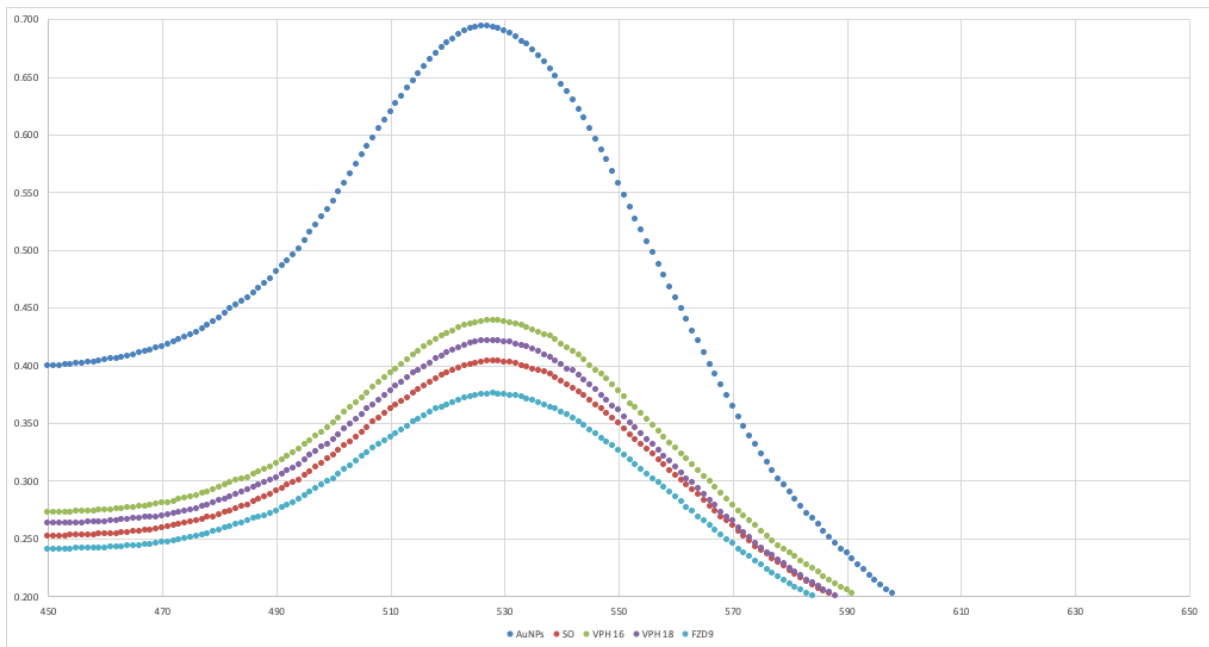


Figura 26. Repetición 3 del barrido espectral con nanopartícula de oro 2x y 0.5 mM de oligo con metodología cambio de pH y calentamiento de nanopartícula y oligo.

En las Figura 24, 25 y 26 se muestra el comportamiento del biosensor modificando la metodología al ajustar el pH con PBS a un valor de 7-8 y realizar calentamiento tanto de

AuNPs y ADN como se menciona en la sección de metodología. Se observa un efecto plasmón debido a la relación del oligo y la muestra del ADN problema usada, sin embargo, solo existe un movimiento horizontal de 3 nm promedio entre repeticiones lo cual es reportado por autores en previas investigaciones como insignificante. También podemos notar una precipitación de la absorbancia en las muestras con complejo de unión nanopartícula-sonda. La absorbancia de las AuNPs dan un valor de 0.694 en promedio, mientras que las nanopartículas con sonda decrecen su valor de absorbancia a una medición de menos de 0.450. Estos resultados muestran un efecto plasmón, pero no hay una repetitividad ni diferenciación del VPH 16 o 18. Cuando se usa la metodología sin modificaciones se tiene un efecto plasmón de 8-10 nm, cuando se modifica el pH y se calienta no se tiene el mismo efecto que si solo se modificara el pH, cambiando el efecto plasmón a 3-6 nm.

Debido a la variación en las mediciones, se decidió mantener la absorbancia de nanopartículas estable, es decir buscar una concentración que se encuentre entre 0.550 y 0.600, esto para determinar si el efecto plasmón tiene una relación con la concentración, además, se buscó disminuir la cantidad de oligo utilizado para determinar si esta cantidad estaba creando ruido en las mediciones, esta se usó a una relación 1:1 de ADN, es decir 100 pg/mL de ADN y sonda de detección. Se hicieron mediciones calentando, sin calentar, 2x y 1x de nanopartícula y ajustando pH.

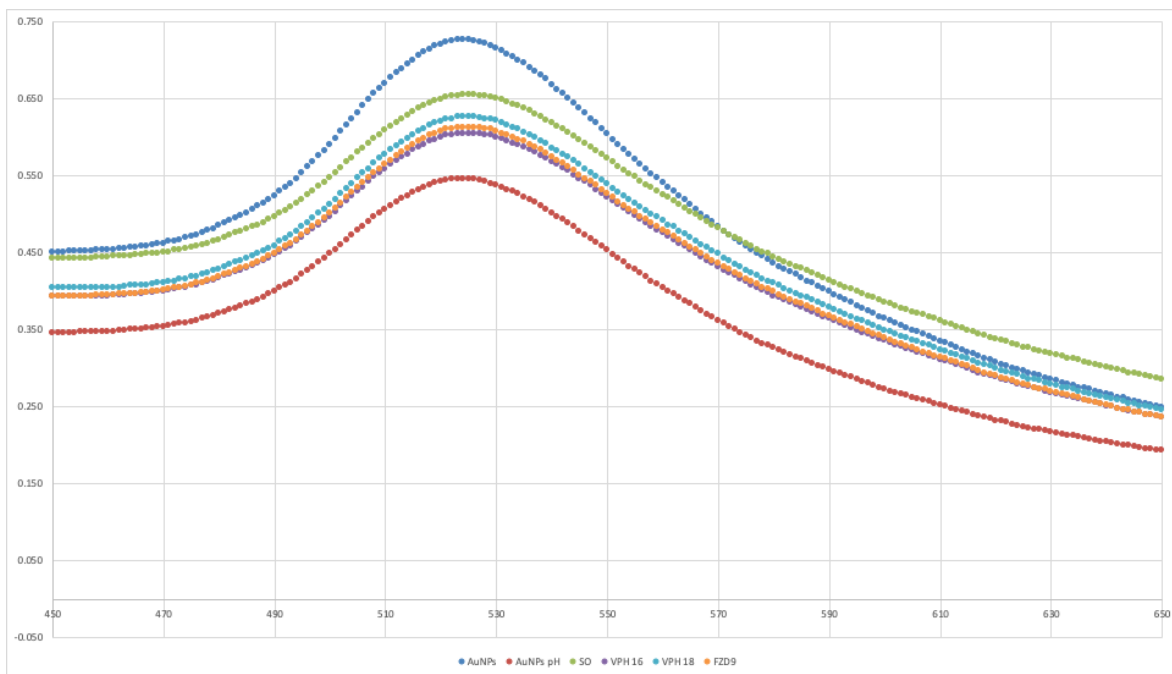


Figura 27. Repetición 1 del barrido espectral con nanopartícula de oro 2x y 100 pg/mL de oligo con metodología de cambio de pH y calentamiento de nanopartícula y oligo.

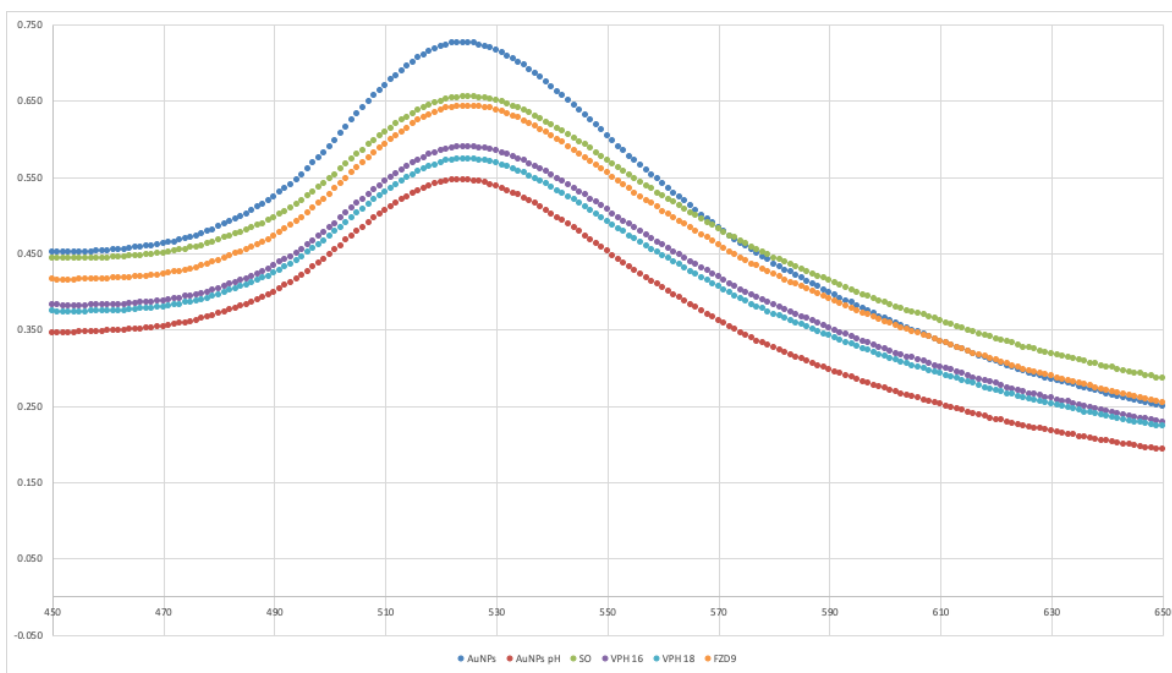


Figura 28. Repetición 2 del barrido espectral con nanopartícula de oro 2x y 100 pg/mL de oligo con metodología de cambio de pH y calentamiento de nanopartícula y oligo.

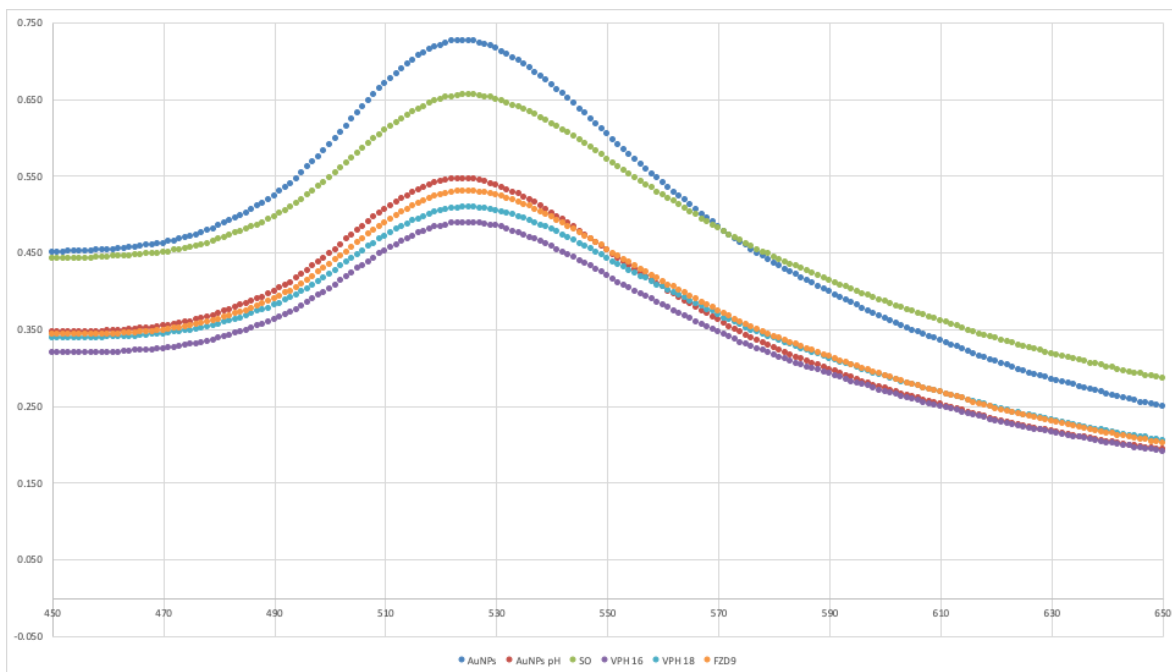


Figura 29. Repetición 3 del barrido espectral con nanopartícula de oro 2x y 100 pg/mL de oligo con metodología de cambio de pH y calentamiento de nanopartícula y oligo.

En las Figuras 27, 28 y 29 se observan los barridos espectrales de las mediciones por triplicado al bajar la concentración de oligo a 100 pg/mL y AuNPs 2x. Se aprecia un comportamiento similar a las previas repeticiones experimentales, lo cual indica que el oligo se acopla de manera correcta con la nanopartícula, pero se tenía un excedente enorme de oligo, es decir, se cambió la concentración de 2 μM a 100 pg/mL y se tuvo el mismo efecto eliminando posible sonda no unida a nanopartículas. En estas repeticiones el efecto plasmón es casi nulo, sin ningún movimiento horizontal ni cambio de coloración, además, el aumentar la temperatura no mostró un impacto significativo en las pruebas del biosensor.

Debido al cambio en la concentración de oligo, se especula que no se están formando tantas estructuras tridimensionales, lo que cambiaría el efecto plasmón mostrado en un espectro UV-Vis. Pero, si el oligo y el ADN están en una relación 1:1, entonces debería de haber un incremento en el tamaño de la nanopartícula si es que todo el oligo se está funcionalizando.

Las siguientes mediciones se realizaron sin calentar nanopartículas funcionalizadas y ADN, solo se modificó el pH, esto para determinar por completo si este paso es necesario o si tiene un efecto en las mediciones. Sin embargo, se mantuvo la concentración de 100 pg/mL de

sonda para mantener la relación 1:1 con el ADN y nanopartículas 2x con una absorbancia de 0.730.

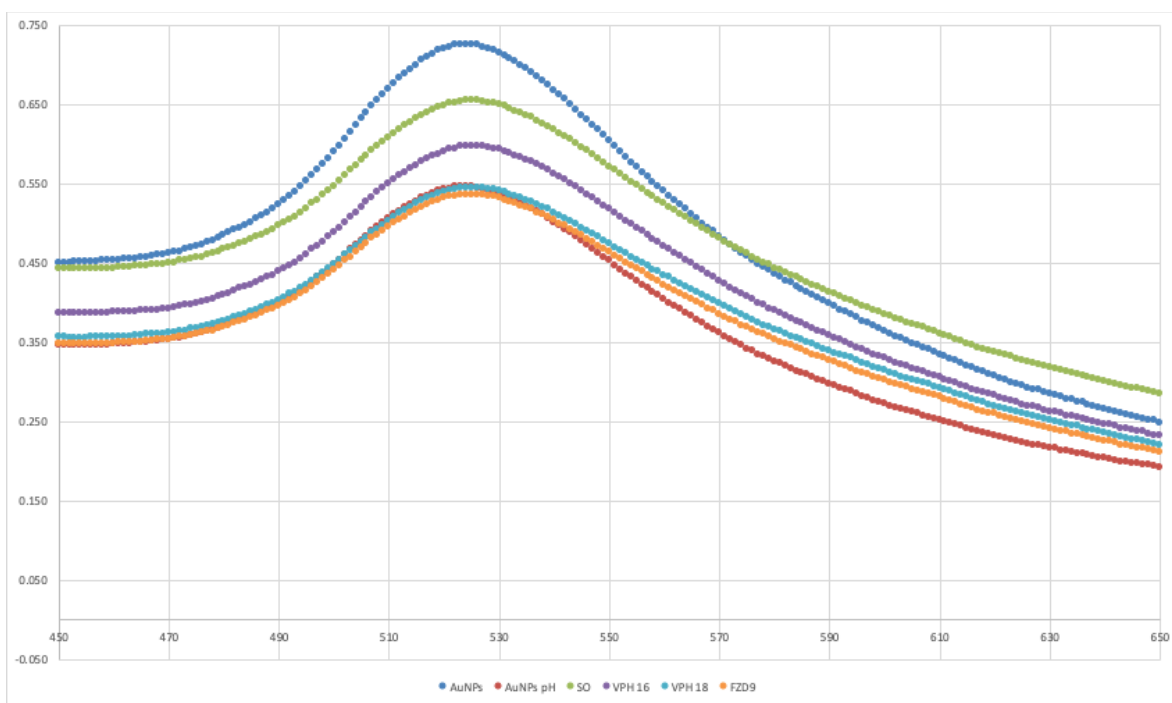


Figura 30. Repetición 1 del barrido espectral con nanopartícula de oro 2x y 100 pg/mL de oligo con metodología de cambio de pH y sin calentamiento de nanopartícula y oligo.

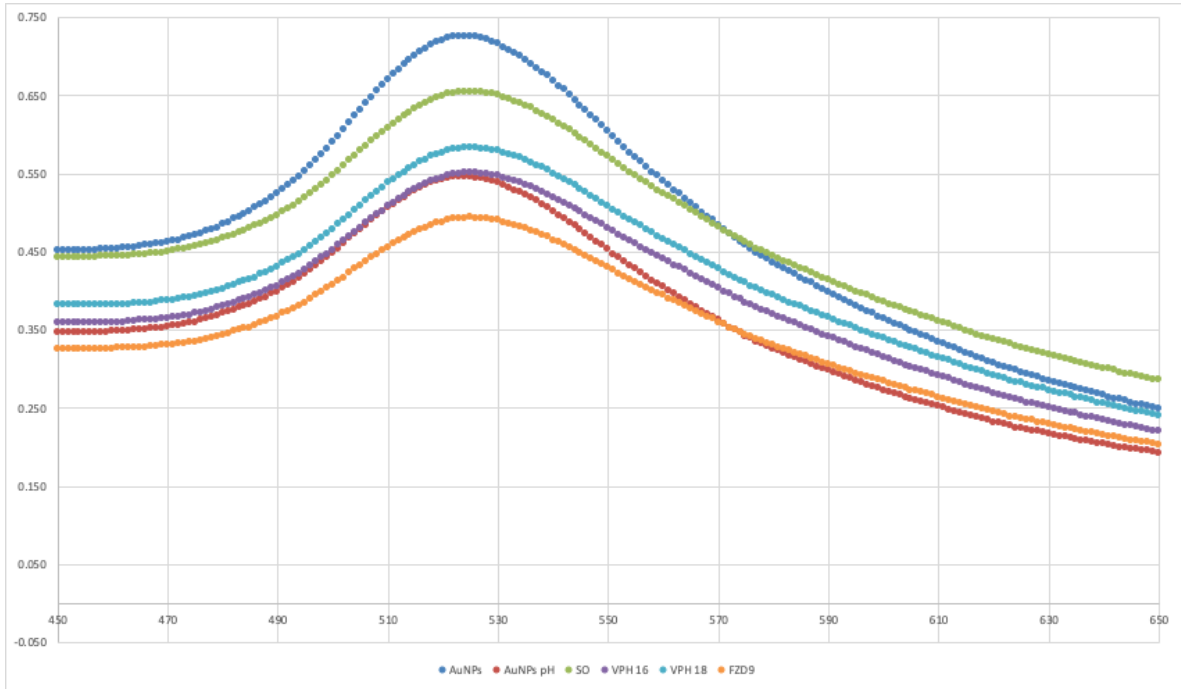


Figura 31. Repetición 2 del barrido espectral con nanopartícula de oro 2x y 100 pg/mL de oligo con metodología de cambio de pH y sin calentamiento de nanopartícula y oligo.

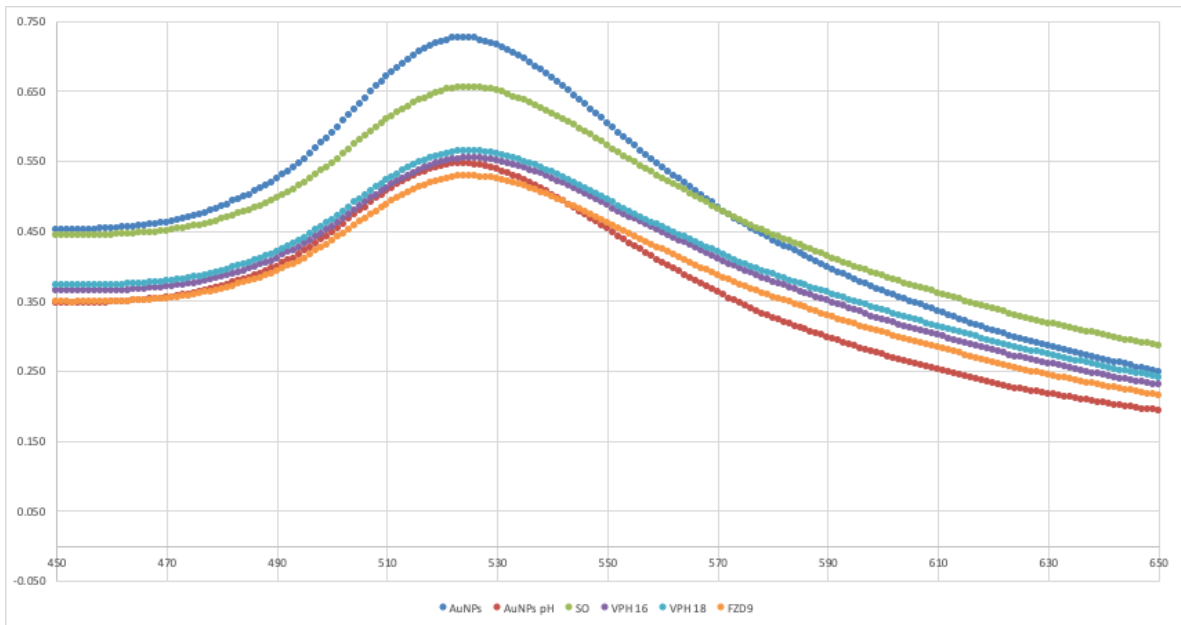


Figura 32. Repetición 3 del barrido espectral con nanopartícula de oro 2x y 100 pg/mL de oligo con metodología de cambio de pH y sin calentamiento de nanopartícula y oligo.

En las Figuras 30, 31 y 32 se observa el comportamiento al ajustar el pH y no calentar AuNPs y ADN. En estas repeticiones tampoco existe un efecto plasmón significativo, que fue de 3

nm, también se nota un ligero cambio en las gráficas debido a que el pico de AuNPs se encuentra un poco aplanado en comparación con las repeticiones anteriores. Sin embargo, no presenta una repetición en el acomodo de los gráficos por lo que no permite realizar un diagnóstico de presencia de la muestra problema.

De nuevo los mismos problemas se presentan, se tienen algunas modificaciones en las absorbancias, no hay diferenciación, pero el efecto plasmón es muy poco visible en gráficas (1-3 nm) sin cambios de coloración. Con esto se concluye que el uso de un calentamiento no tiene un efecto en la metodología y pareciera que se necesitaría evaluar de nuevo la necesidad de ajustar el pH de la solución.

Debido a la concentración usada de sonda, de ADN y su relación 1:1, se debería tener un cambio en la conformación o unión con las nanopartículas, ya que estos ya no se encuentran en exceso, ahora se encuentra en exceso la nanopartícula. Posiblemente la concentración o cantidad de AuNPs presentes en las soluciones hace que el efecto plasmón detectado sea no detectable, debido a esta hipótesis se decidió evaluar con una menor cantidad de nanopartículas.

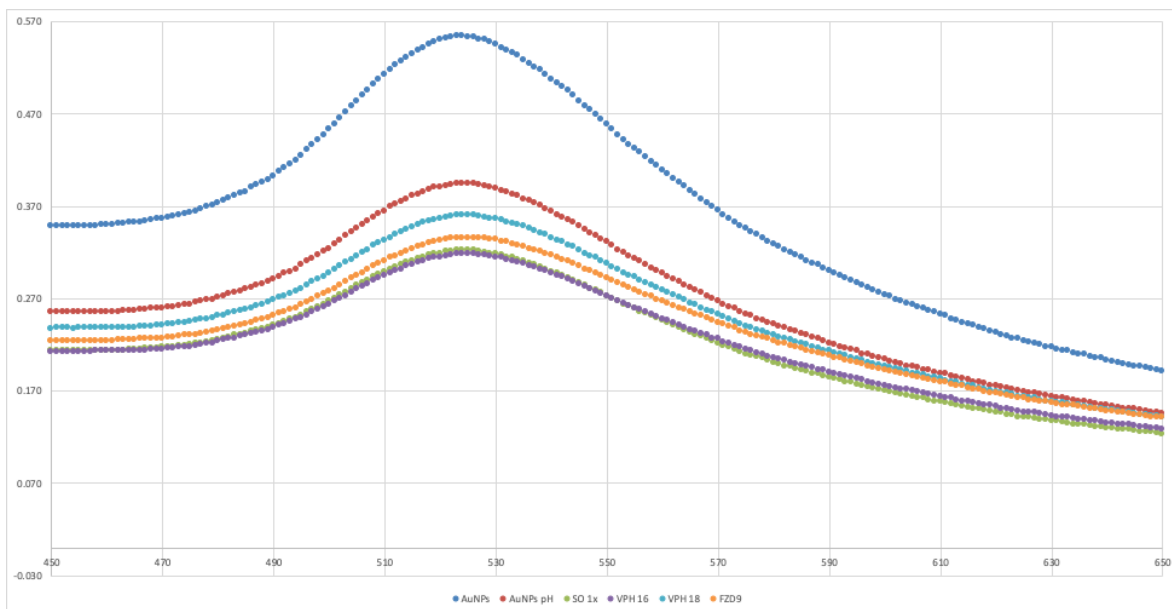


Figura 33. Repetición 1 del barrido espectral con nanopartícula de oro 1x y 100 pg/mL de oligo con metodología de cambio de pH y calentamiento de nanopartícula y oligo.

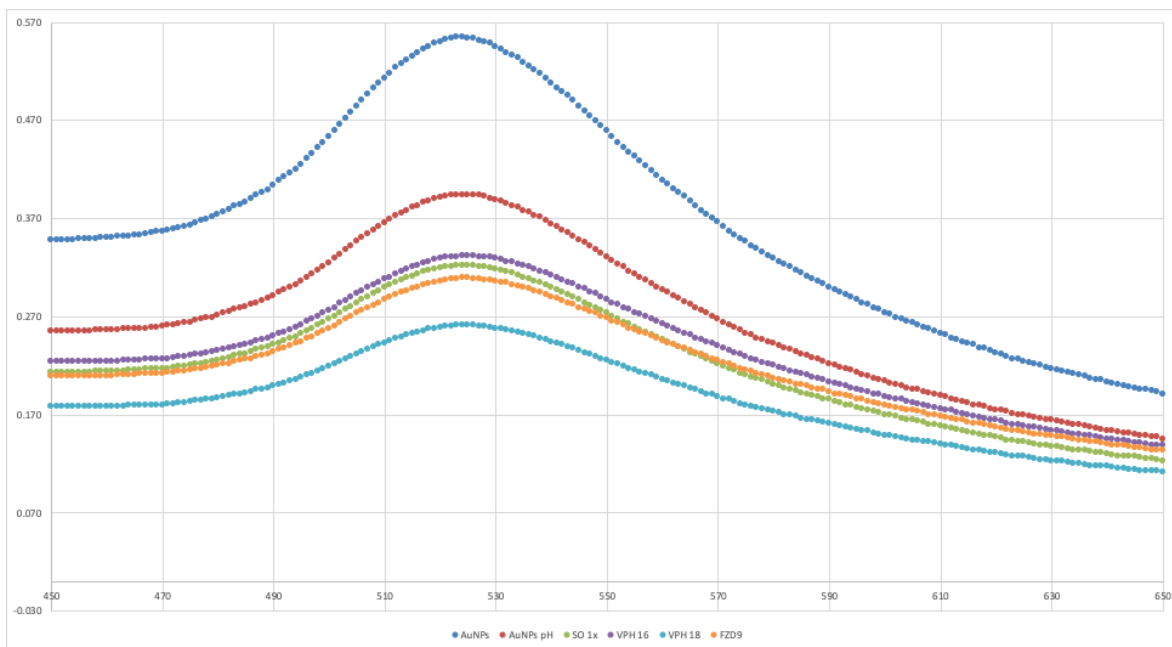


Figura 34. Repetición 2 del barrido espectral con nanopartícula de oro 1x y 100 pg/mL de oligo con metodología de cambio de pH y calentamiento de nanopartícula y oligo.

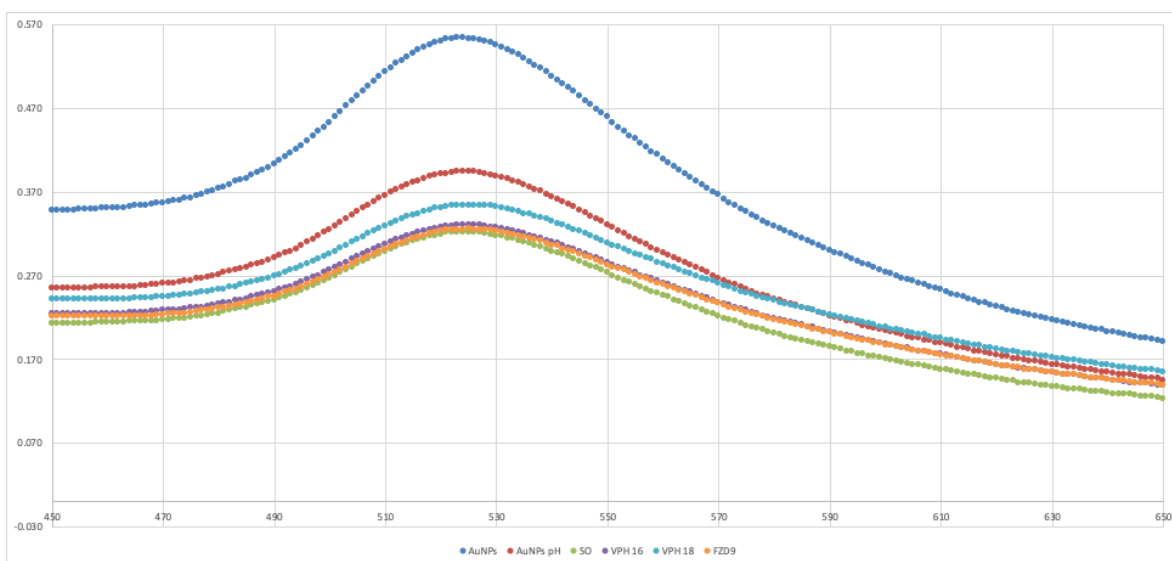


Figura 35. Repetición 3 del barrido espectral con nanopartícula de oro 1x y 100 pg/mL de oligo con metodología de cambio de pH y calentamiento de nanopartícula y oligo.

En las figuras 33, 34 y 35 se observa el comportamiento utilizando las nanopartículas 1x con una absorbancia de alrededor de 0.554, se puede notar que los picos en las mediciones no son tan pronunciados como en repeticiones previas. Sin embargo, se tiene el mismo comportamiento al ajustar pH, se obtiene un decrecimiento en la absorbancia, pero no se

tiene un orden de la detección constante. En estas repeticiones es importante denotar que no hay diferenciación, pero, además, la mayoría de las líneas se empalman, por lo que pareciera que el calentamiento en las anteriores dos mediciones por triplicado perjudica en vez de beneficiar. Además, la nanopartícula 1x se encuentra en la absorbancia buscada y no se repiten los comportamientos esperados de anteriores mediciones, por lo que se podría hipotetizar que la absorbancia de nanopartículas o su concentración debe ser mayor.

En las Figuras 36, 37 y 38 no se realizó ningún calentamiento y se utilizó la misma relación 1:1 de ADN, oligo y AuNPs 1x. Se puede notar que a pesar de la dilución drástica del oligo, se sigue obteniendo una funcionalización entre AuNPs y muestra, por lo que se puede confirmar que el oligo presente no realiza ruido con formaciones terciaras ocasionadas por el exceso de sonda, de hecho, al disminuir la cantidad de sonda, pareciera que se elimina el ruido por completo. En estas mediciones no se tiene un orden en las gráficas, en algunas hay empalmes, sin embargo, las absorbancias y los barridos tienen valores bajos y no muestran los picos o corrimientos característicos del efecto plasmón.

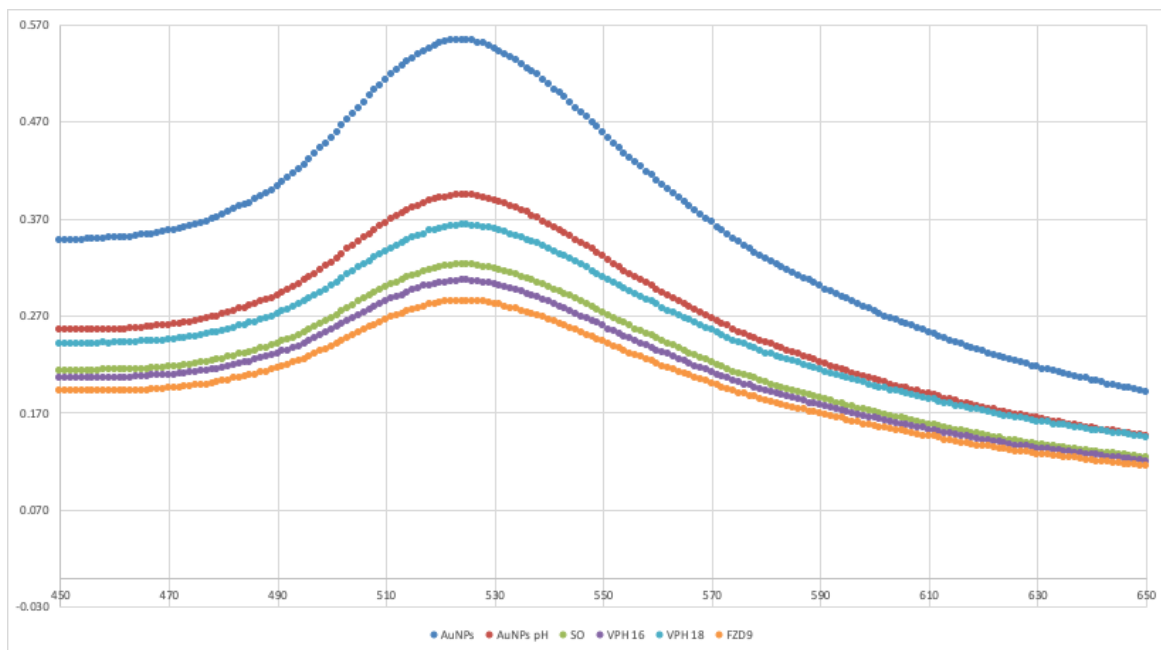


Figura 36. Repetición 1 del barrido espectral con nanopartícula de oro 1x y 100 pg/mL de oligo con metodología de cambio de pH y sin calentamiento de nanopartícula y oligo.

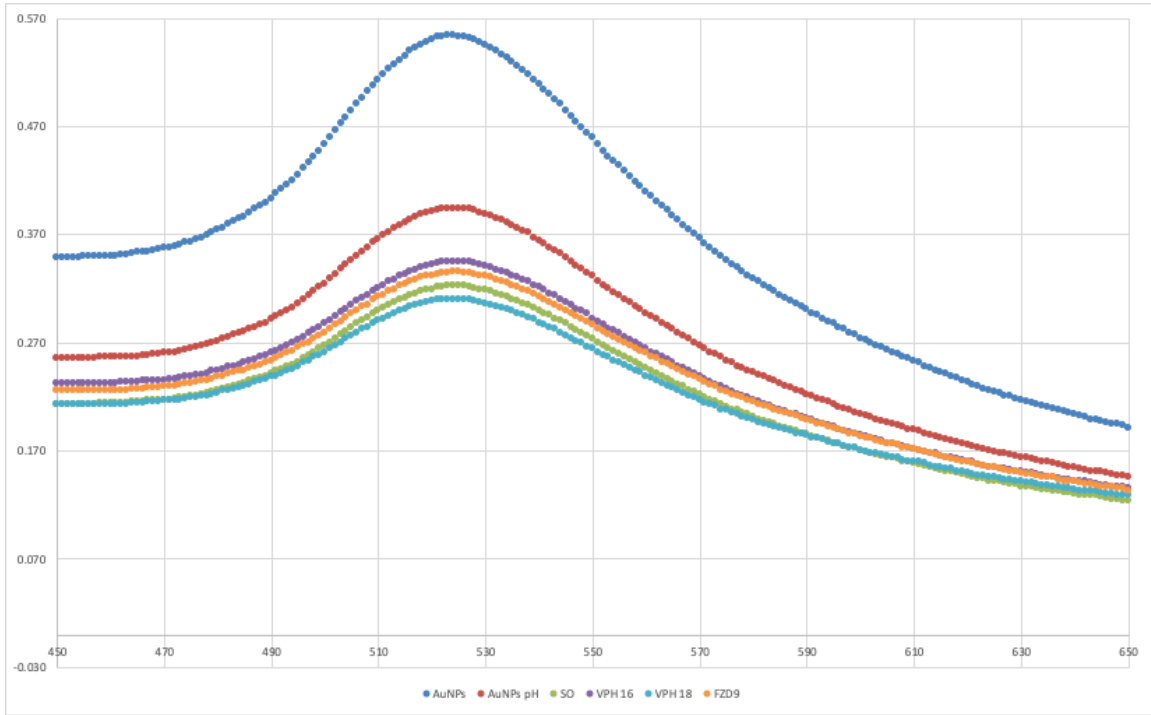


Figura 37. Repetición 2 del barrido espectral con nanopartícula de oro 1x y 100 pg/mL de oligo con metodología de cambio de pH y sin calentamiento de nanopartícula y oligo.

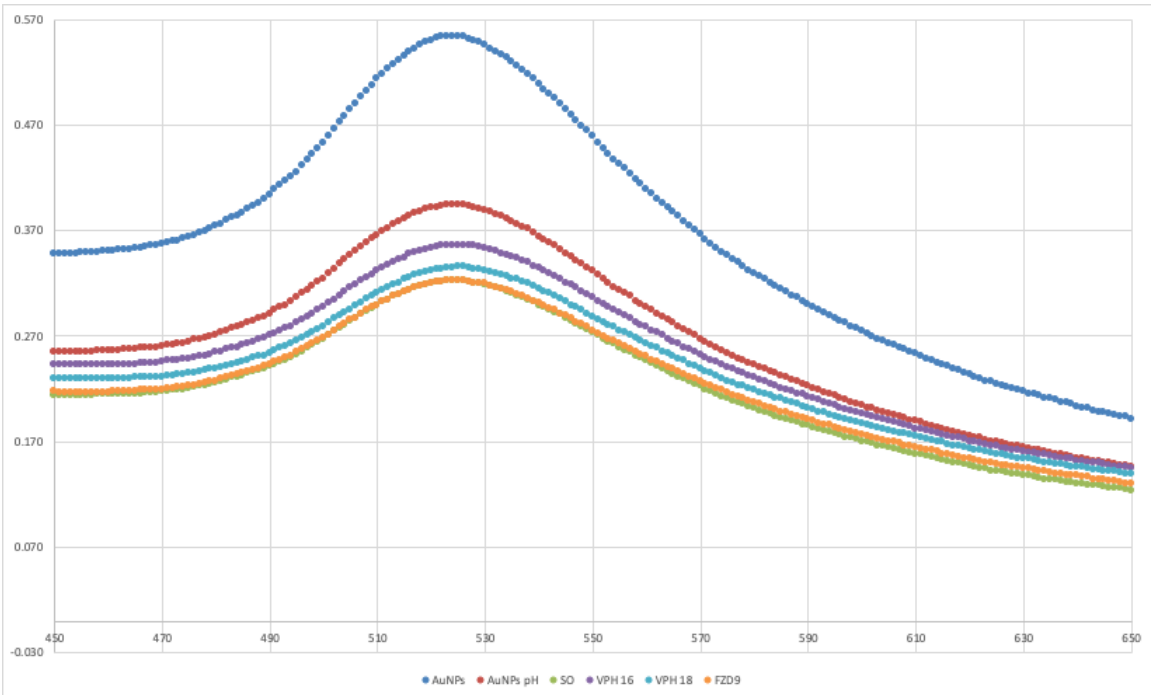


Figura 38. Repetición 3 del barrido espectral con nanopartícula de oro 1x y 100 pg/mL de oligo con metodología de cambio de pH y sin calentamiento de nanopartícula y oligo.

Aunque seguir por el camino de ajustar el pH ocasiona cambios más significativos, es importante denotar que existe la posibilidad que al disminuir el oligo no se tenga alguna modificación significativa porque en realidad no se está uniendo a la nanopartícula, pero sí al ADN. Esto genera muchas estructuras complejas interactuando de manera incorrecta con la nanopartícula haciendo modificaciones en las absorbancias; esta hipótesis requiere más comprobación.

De los resultados obtenidos podemos concluir: una concentración de 100 pg/mL de oligo genera el mismo efecto plasmón que 2 μ M, utilizar pH 7, o fisiológico, permite visualizar el efecto plasmón y un cambio de coloración, además, realizar un calentamiento previo a 50 °C del material genético genera un efecto plasmón a un pH de 4.0, y la combinación de un calentamiento previo a 50 °C del material genético junto con la modificación de pH de las AuNPs favorece un efecto plasmón mayor que sin esta combinación.

Para futuras repeticiones del experimento se planea modificar la metodología al utilizar un sonicador para la destrucción del pellet después de centrifugar. También se propone realizar nuevamente un “Salt-Aging” utilizando una metodología modificada de acuerdo a la investigación de Larginho y asociados, donde se usa NaCl y SDS como tratamiento para funcionalizar AuNPs con sondas Thiol [40].

1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1] NIH, «Cancer of any site - Cancer Stat Facts», National Cancer Institute NIH, 2023. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html> (accedido 22 de septiembre de 2023).
- [2] NIH, «Estadísticas del cáncer», Instituto Nacional del Cáncer, 2020. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas#:~:text=EI%20c%C3> (accedido 22 de septiembre de 2023).
- [3] World Health Organization: WHO, «Cáncer OMS», WHO.INT, 2022. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accedido 22 de septiembre de 2023).
- [4] C. De Martel, D. Georges, F. Bray, M. J. Ferlay, y G. M. Clifford, «Global burden of cancer Attributable to infections in 2018: A Worldwide Incidence analysis», The Lancet

- Global Health, vol. 8, n.o 2, pp. e180-e190, feb. 2020, doi: 10.1016/s2214-109x(19)30488-7.
- [5] G. Santos-López, L. Márquez-Domínguez, J. Reyes-Leyva, y V. Vallejo-Ruíz, «[General Aspects of Structure, Classification and Replication of Human Papillomavirus].», PubMed, vol. 53 Suppl 2, pp. S166-71, ene. 2015, [En línea]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26462512>
- [6] S. Choi, A. Ismail, G. Pappas-Gogos, y S. Boussios, «HPV and cervical Cancer: A review of epidemiology and screening uptake in the UK», Pathogens, vol. 12, n.o 2, p. 298, feb. 2023, doi: 10.3390/pathogens12020298.
- [7] «Risk factors: infectious agents», National Cancer Institute, 2019. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents#human-papillomaviruses-hpvs> (accedido 26 de septiembre de 2023).
- [8] «STD Facts - Human papillomavirus (HPV)», CDC, 2022. <https://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpv.htm#:~:text=You%20can%20get%20HPV%20by,have%20no%20signs%20or%20> (accedido 26 de septiembre de 2023).
- [9] S. Vázquez-Vega, «Prevalencia del virus del papiloma humano oncogénico en pacientes con lesión cervical», Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, vol. 58, n.o 3, ago. 2021, doi: 10.24875/rmimss.m20000027.
- [10] American Cancer Society, «How is a cytology test done? | Cytology tests for cancer», American Cancer Society, 2023. <https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/tests/testing-biopsy-and-cytology-specimens-for-cancer/cytology-types.html> (accedido 27 de septiembre de 2023).
- [11] A. Chrysostomou y L. G. Kostrikis, «Methodologies of primary HPV testing currently applied for cervical cancer screening», Life, vol. 10, n.o 11, p. 290, nov. 2020, doi: 10.3390/life10110290.
- [12] N. Bhatla y S. Singhal, «Primary HPV screening for cervical cancer», Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology, vol. 65, pp. 98-108, 2020, doi: 10.1016/j.bpobgyn.2020.02.008.
- [13] S. K. Katirachi, M. P. Grønlund, K. K. Jakobsen, C. Grønhøj, y C. Von Buchwald, «The prevalence of HPV in oral cavity squamous cell carcinoma», Viruses, vol. 15, n.o 2, p. 451, feb. 2023, doi: 10.3390/v15020451.

- [14] M. Poljak, B. J. Kocjan, A. Oštrbenk, y K. Seme, «Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update», *Journal of Clinical Virology*, vol. 76, pp. S3-S13, mar. 2016, doi: 10.1016/j.jcv.2015.10.023.
- [15] W. Hou y S. B. Cronin, «A review of Surface Plasmon Resonance-Enhanced Photocatalysis», *Advanced Functional Materials*, vol. 23, n.o 13, pp. 1612-1619, oct. 2012, doi: 10.1002/adfm.201202148.
- [16] J.-H. Lee, B.-C. Kim, B.-K. Oh, y J. Choi, «Highly sensitive localized surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of HIV-1», *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 9, n.o 7, pp. 1018-1026, oct. 2013, doi: 10.1016/j.nano.2013.03.005.
- [17] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, y P. Estrela, «Introduction to biosensors», *Essays in Biochemistry*, vol. 60, n.o 1, pp. 1-8, jun. 2016, doi: 10.1042/ebc20150001.
- [18] Dau, Fuentes, y Gutierrez, «Fabricación de biosensores nanoestructurados no invasivos para monitoreo y detección de enfermedades», ITESO PAP, 2020.
- [19] Becerra, «Pruebas in vitro de respuesta plasmónica en nanopartículas de oro en el Parque Tecnológico del ITESO», ITESO PAP, 2022.
- [20] Becerra, Lobato, Rodríguez, y Camacho, «Pruebas in vitro de respuesta plasmónica en nanopartículas de oro en el Parque Tecnológico del ITESO I», ITESO PAP, 2019.
- [21] ITESO, «Misión y Visión», ITESO, 2023. https://iteso.mx/web/general/detalle?group_id=49094 (accedido 29 de septiembre de 2023).
- [22] ITESO, «ITESO», ITESO, 2021. <https://www.iteso.mx/documents/2624322/0/Orientaciones+fundamentales+del+ITESO.pdf/4831d49f-7335-47f7-8cdd-d5df274b74e8> (accedido 29 de septiembre de 2023).
- [23] A. I. Toro-Montoya y L. J. Tapia-Vela, «Virus del papiloma humano (VPH) y cáncer», *Medicina y Laboratorio*, vol. 25, n.o 2, pp. 467-483, abr. 2021, doi: 10.36384/01232576.431.
- [24] Alfaro y Fournier, *Virus del Papiloma Humano*, vol. 1. 2013, pp. 211-217. [En línea]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2013/rmc132d.pdf>
- [25] K. Szymonowicz y J. Chen, «Biological and clinical aspects of HPV-related cancers», *Cancer biology and medicine*, vol. 17, n.o 4, pp. 864-878, ene. 2020, doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0370.

- [26] S. Choi, A. Ismail, G. Pappas-Gogos, y S. Boussios, «HPV and cervical Cancer: A review of epidemiology and screening uptake in the UK», *Pathogens*, vol. 12, n.o 2, p. 298, feb. 2023, doi: 10.3390/pathogens12020298.
- [27] G. Santos-López, L. Márquez-Domínguez, J. Reyes-Leyva, y V. Vallejo-Ruíz, «[General Aspects of Structure, Classification and Replication of Human Papillomavirus].», *PubMed*, vol. 53 Suppl 2, pp. S166-71, ene. 2015, [En línea]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26462512>
- [28] S. De Salud, «Cáncer de cuello uterino», *gob.mx*, 2012. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/cancer-de-cuello-uterino> (accedido 29 de septiembre de 2023).
- [29] S. Vázquez-Vega, «Prevalencia del virus del papiloma humano oncogénico en pacientes con lesión cervical», *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, vol. 58, n.o 3, ago. 2021, doi: 10.24875/rmimss.m20000027.
- [30] Mateos, Pérez, Pérez, y Rodríguez, «Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano», *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*, vol. 57, 2018, [En línea]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia57.pdf>
- [31] H. Wang, Z. He, X. Han, D. Zhang, y S. Zhang, «Prediction value with a novel and accurate tissue-based human papillomavirus detection method in low-grade squamous intraepithelial lesions», *Cancer Medicine*, vol. 11, n.o 13, pp. 2576-2587, mar. 2022, doi: 10.1002/cam4.4634.
- [32] E. Ferrari, «Gold Nanoparticle-Based Plasmonic biosensors», *Biosensors*, vol. 13, n.o 3, p. 411, mar. 2023, doi: 10.3390/bios13030411.
- [33] J. Dong, P. L. Carpinone, G. Pyrgiotakis, P. Demokritou, y B. M. Moudgil, «Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method», *Kona Powder and Particle Journal*, vol. 37, n.o 0, pp. 224-232, ene. 2020, doi: 10.14356/kona.2020011.
- [34] S. Zeng, K. Yong, I. Roy, X. Q. Dinh, X. Yu, y F. Luan, «A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications», *Plasmonics*, vol. 6, n.o 3, pp. 491-506, abr. 2011, doi: 10.1007/s11468-011-9228-1.
- [35] MERCK, «Gold Nanoparticles: Properties and Applications», MERCK, 2023. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/biosensors-and-imaging/gold-nanoparticles> (accedido 20 de noviembre de 2023).

- [36] P. V. Baptista et al., «Nanoparticles in molecular diagnostics», en Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2011, pp. 427-488. doi: 10.1016/b978-0-12-416020-0.00011-5.
- [37] L. K. Sørensen et al., «Nature of the anomalous size dependence of resonance red shifts in ultrafine plasmonic nanoparticles», Journal of Physical Chemistry C, vol. 126, n.o 39, pp. 16804-16814, sep. 2022, doi: 10.1021/acs.jpcc.2c03738.
- [38] P. Pourali, V. Dzmitruk, O. Benada, M. Svoboda, y V. Benson, «Conjugation of microbial-derived gold nanoparticles to different types of nucleic acids: Evaluation of transfection efficiency», Scientific Reports, vol. 13, n.o 1, sep. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-41567-7.
- [39] A. Maslova y I. Hsing, «Thiol-free oligonucleotide surface modification of gold nanoparticles for nanostructure assembly», Nanoscale advances, ene. 2019, doi: 10.1039/c8na00148k.
- [40] M. Larginho et al., «Gold nanoprobe-based non-crosslinking hybridization for molecular diagnostics», Expert Review of Molecular Diagnostics, vol. 15, n.o 10, pp. 1355-1368, ago. 2015, doi: 10.1586/14737159.2015.1077704.
- [41] M. Majdinasab, M. Aminlari, M. H. Sheikhi, M. Niakousari, y S. Shekarforoosh, «Detection of INVA gene of Salmonella by DNA-gold nanoparticles biosensor and its comparison with PCR», Journal of Experimental Nanoscience, vol. 8, n.o 2, pp. 223-239, feb. 2013, doi: 10.1080/17458080.2011.569575.

2. Productos

Tabla 3: Ficha descriptiva de los datos obtenidos.

Nombre y código del PAP	4D08 B Programa de apoyo a centros de investigación externos II en conjunto con el proyecto 4I03 Dispositivos Médicos Nanoestructurados.
Nombre del proyecto	Pruebas <i>in vitro</i> de respuesta plasmónica en nanopartículas de oro en el Parque Tecnológico del ITESO II
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Recopilación de gráficas e imágenes de los resultados obtenidos durante la experimentación de este proyecto con el fin de tener una perspectiva de comparación con investigaciones previa.

Autores:	José Federico Lobato Martínez David Andrés Camacho Morales.
----------	--

Tabla 4: Ficha descriptiva del reporte de proyecto recopilación de imágenes.

Nombre y código del PAP	4D08 B Programa de apoyo a centros de investigación externos II en conjunto con el proyecto 4I03 Dispositivos Médicos Nanoestructurados.
Nombre del proyecto	Pruebas <i>in vitro</i> de respuesta plasmónica en nanopartículas de oro en el Parque Tecnológico del ITESO II
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Recopilación de graficas e imágenes sobre los resultados obtenidos durante la experimentación de este proyecto, con el fin de tener una perspectiva de comparación en investigaciones previas, discusión sobre los resultados para generar puntos de mejora en la continuación del proyecto.
Autores:	José Federico Lobato Martínez David Andrés Camacho Morales.

Tabla 5: Ficha descriptiva del reporte de proyecto.

Nombre y código del PAP	4D08 B Programa de apoyo a centros de investigación externos II en conjunto con el proyecto 4I03 Dispositivos Médicos Nanoestructurados.
Nombre del proyecto	Pruebas <i>in vitro</i> de respuesta plasmónica en nanopartículas de oro en el Parque Tecnológico del ITESO II
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Discusión sobre los resultados para generar puntos de mejora en la continuación del proyecto.
Autores:	José Federico Lobato Martínez y David Andrés Camacho Morales.

Tabla 6: Ficha descriptiva del reporte para síntesis de AuNPs.

Nombre y código del PAP	4D08 B Programa de apoyo a centros de investigación externos II en conjunto con el proyecto 4I03 Dispositivos Médicos Nanoestructurados.
-------------------------	--

Nombre del proyecto	Pruebas <i>in vitro</i> de respuesta plasmónica en nanopartículas de oro en el Parque Tecnológico del ITESO II
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Metodología de Turkevich modificada para la síntesis de AuNPS de 20 nm.
Autores:	José Federico Lobato Martínez y David Andrés Camacho Morales.

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

3.1 Sensibilización ante las realidades

David Andrés Camacho Morales:

A medida que avanzaba en el proyecto a lo largo del semestre y llevaba a cabo investigaciones y platicaba con personas sobre el proyecto, pude identificar las oportunidades que ofrece la biotecnología al aprovechar procesos e innovaciones para brindar beneficios significativos a la población en general. La disponibilidad de nuevas metodologías accesibles para la detección temprana en enfermedades virales se vuelve crucial para su tratamiento, especialmente en el caso de enfermedades que afectan a un gran número de personas en México. Esto nos permite prevenir el desarrollo de enfermedades más graves. Además, creo que la participación en proyectos con un enfoque social contribuye a sensibilizarnos, recordándonos como profesionales la responsabilidad de enfrentar las realidades que nos rodean y trabajar hacia el bien común.

José Federico Lobato Martínez:

Este es el segundo semestre que he llevado este proyecto y me sigue llamando la atención las aplicaciones que podría tener en otras áreas pues las nanopartículas son relativamente fáciles de sintetizar, usar, funcionalizar; posiblemente si se sigue estudiando o analizando esta tecnología podría ayudar a muchas personas. Me di cuenta de que este biosensor podría ayudar a personas con VPH, porque son pruebas accesibles y precisas, específicamente a mujeres mexicanas. Por ello, me gustó mucho involucrarme en este proyecto y haber estudiado esta carrera, porque, aunque a veces te plantean las aplicaciones industriales, la generación de productos, ventas y biomoléculas de interés, muchas veces hay aplicaciones que también generan todo lo anterior, pero conllevan un impacto social.

La detección de enfermedades a tiempo, junto con una educación temprana en pro de evitar o disminuir los casos de enfermedades de transmisión sexual son las mejores formas de

combatir los virus oncogénicos. Este proyecto se enfocó en generar un biosensor de bajo costo, haciendo uso de nanopartículas de oro, lo que haría una detección fiable, accesible, rápida y no invasiva. El saber que hay personas que no van al doctor por falta de dinero es alarmante, siempre se ha considerado la salud un derecho de todos, pero no de la misma calidad. Es un preocupante saber que el dinero compra una mejor salud, por ello es importante generar tecnologías novedosas pero también accesibles, no sirve de nada algo que pueda salvar vidas si no pudiera salvar las de todos.

Creo que este sentimiento de preocupación, molestia y tristeza viene de que en mi familia ha habido casos de detección tardía, a mi papá se le generó una dislipidemia que le ocasionó diabetes porque se detectó muy tarde. Hay varios casos parecidos en mi círculo familiar cercano, y el saber que podría hacer algo por evitar detecciones tardías y generar posibles tratamientos pone un peso sobre mí, pero también una oportunidad de aplicar mi carrera para generar un alto impacto en la sociedad.

3.2 Aprendizajes logrados

David Andrés Camacho Morales:

Adquirí conocimientos sobre la operación de los biosensores, así como el entorno necesario para obtener un buen funcionamiento, ya que carecía de un entendimiento profundo sobre su función y su aplicación en procesos específicos, también obtuve aprendizajes en diversas disciplinas que contribuyeron al proyecto. Por ejemplo, logré obtener una menor variación entre síntesis de AuNPs, así como un mejoramiento en el proceso de la producción de nanopartículas. Aunque no participé directamente en el diseño del oligo, encontré fascinante su concepción, además, considero que fortalecí mis habilidades de trabajo en equipo, ya que en un principio se definieron de manera clara las responsabilidades de cada uno de los individuos involucrados en el proyecto. Esta estructura nos facilitó la elaboración de un horario de trabajo más organizado y una comunicación más afectiva entre los mismos integrantes del equipo y los asesores de nuestro proyecto.

José Federico Lobato Martínez:

Principalmente desarrollé la síntesis de nanopartículas, nunca lo había hecho y este semestre fue necesario todo el semestre, esto es algo que no se ve en biotecnología. También desarrollé la realización de material visual, tratamos de tener presentaciones cada semana con los profesores y la presentación final con ayuda de la Dra. Blanca quedó muy bien, aprendí mucho en esta última porque fue difícil sintetizar y dejar en claro el proceso metodológico que se siguió. Aprendí a expresar mis ideas de manera estructurada, poder tomar decisiones en equipo y, en general, organizar un trabajo equitativo.

El mayor reto fue hacer el escrito, considero que es un punto de mejora muy grande, a veces mis ideas no quedan completamente desarrolladas y es confuso lo que escribo, aun así, las revisiones de las entregas lo hacen más ameno porque es posible ir resolviendo comentarios poco a poco y se evita hacer una entrega y revisión muy grande. Me di cuenta de que era capaz de hacer la síntesis, metodologías y mediciones cuando empezamos a tener resultados interesantes, no considero que sean finales, pero se tuvo una mejoría.

Considero que me volví más sensible a las problemáticas que se tienen en México respecto a la salud pública, las estadísticas se me hacían impresionantes, la cantidad de permanencia de VPH en mujeres es muy grande, es preocupante la falta de educación sexual y principalmente de prevención de enfermedades, ya no se tienen campañas de vacunación tan exhaustivas como antes. Creo que me dejó mucho personalmente este PAP, principalmente porque quiero enfocar mi carrera profesional a la investigación y considero que en mi vida personal, me dará mucha más gratificación saber que lo que hice tuvo un impacto en la vida de las personas.

3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP).

David Andrés Camacho Morales

Competencia		Evidencia	Relevancia/Fortaleza*	Competencias Nuevas	Competencias potencializadas
Conocimientos	investigación en base de datos	Revise diferentes artículos sobre la información necesaria para realizar esta investigación.	Es relevante debido a que es necesario comprobar la teoría con la parte práctica	Logré adquirir el conocimiento sobre la síntesis de nanopartículas y lograr sentirme cómodo produciendo nuevas AuNPs	Logré mejorar el trabajo en los laboratorios de nanotecnología, unificando la síntesis de nanopartículas para obtener una menor variación entre lote
	Uso de herramientas bioinformáticas	Revise distintas herramientas con el fin de alimentar más el conocimiento para el proyecto	Es importante revisar estas herramientas con el fin de tener un mejor acercamiento al proyecto.		
	Conocer la metodología para la síntesis de nanopartículas	Se estuvo mejorando la metodología para lograr una producción más estable de las nanopartículas	Debido a que es una materia prima vital para el proyecto es muy importante tener la metodología muy establecida		
	Manejo de instrumentos de Laboratorio	Al ser la continuación de proyecto, ya me encuentro cómodo con el proceso que realizamos al igual que los equipos que utilizamos	Es relevante debido a que conozco cómo funciona el proceso y la teoría detrás de los equipos a utilizar		

Habilidades	Técnicas de laboratorio	Utilice las habilidades aprendidas en mis materias previas.	Es vital debido a que si no se tiene los resultados no son satisfactorios	Logré sentirme mucho más cómodo a diferencia de los semestres anteriores a realizar las corridas experimentales solo. Lo que me ayudo a conocer mucho más los equipos de laboratorio	Potencialicé las técnicas de laboratorio, así como la interpretación de los resultados.
	Interpretación de resultados	Participo en la interpretación de los resultados obtenidos durante la practica experimental.	El lograr conectar la parte experimental con la teórica es fundamental.		
	Optimización de proceso	Optimizamos el proceso de tratamiento de la muestra para lograr hacerlas en un menor tiempo.	Es muy importante la optimización del proceso debido a que nos permite hacer el doble de pruebas durante la semana		
	Resolución de problemas	Utilizar la retroalimentación de los encargados de proyectos así como la investigación que se realiza durante el proyecto. Consultar diferentes puntos de vista para obtener una mejor visión del problema	Es importante ya que logramos tener mucho en cuenta los comentarios de los profesores PAP para obtener los mejores resultados posibles.		

Actitudes	Buenas practicas en el laboratorio	Se obtuvieron experimentos satisfactorios, asi como un buen uso de técnicas adquiridas previamente.	El tener un orden en el trabajo experimental es necesario para obtener resultados objetivos.	Logré obtener una línea directa de dialogo con los asesores de mi proyecto	Potencialicé la escucha activa tanto de mis compañeros de proyecto así como con mis asesores
	Dialogo interdisciplinario	Participamos en las reuniones con las diferentes disciplinas dentro del proyecto y tome en cuenta las aportaciones hacia el proyecto	Diferentes disciplinas pueden aportar conocimiento para un bien común		
	Escucha activa	Se tomo muy en cuenta a los profesores encargados y a los alumnos que participaron en el proyecto con el fin de tener una mejora.	El tomar en cuenta las diferentes aportaciones de personas durante el proyecto nos ayuda para los puntos de mejora		
	Profesionalismo	Escuchar de manera consiente todas las retroalimentaciones para obtener un proyecto de gran calidad.	Es importante porque se busca obtener el mejor resultado posible para la resolución de este proyecto		

Competencia		Evidencia	Relevancia/Forceza*	Competencias nuevas	Competencias potencializadas
Conocimientos	Diseño de experimentos.	A lo largo de mi carrera he tenido materias en las cuales es necesario el generar experimentos, determinar variables a modificar y que sean relevantes en la investigación.	Al seguir con esta investigación, en el semestre anterior fue necesario modificar algunas metodologías que se usaban y generar nuevas, por lo que esta competencia servirá para evaluar nuevas variables a modificar.	En este semestre fue necesario analizar resultados pasados, con esto logré analizar, leer e investigar investigaciones publicadas.	Potencialicé mi análisis de artículos, propuesta de proyectos y metodologías validadas y respaldadas por bibliografía.
	Herramientas de investigación.	Es necesario justificar todo lo que se sabe, de donde se obtiene la información, que modificaciones y porque se hacen en el experimento.	Debido a la necesidad de evaluar los resultados con algunos ya obtenidos, investigar para generar un contexto del proyecto, esta competencia es de uso para encontrar esa información		
	Uso de bases de datos y sitios de bioinformática.	He tomado algunas clases y cursos de donde obtener bases de datos de genomas y ADN.	En alguna parte del proyecto se realizaron investigaciones de las secuencias de ADN a usar, el saber que existen estos sitios servirá para comprender el trabajo anterior.	Fue necesario evaluar las temperaturas críticas de los ADNs, aprendí un nuevo software que usamos con el Dr. David, con este fue posible determinar la temperatura de	

	Principios de programación.	Hay algunas herramientas que se han usado con anterioridad como la maquina Opentrons	El uso de estas máquinas, saber operarlas y programarlas puede funcionar para generar protocolos que puedan ser usados por cualquier persona que cuente con una maquina similar	apertura del ADN viral.	empezó desde una propuesta con modelos en computadora.
	Síntesis de nanopartículas	En los dos periodos anteriores de trabajo fue necesario sintetizar nanopartículas para usar en las mediciones y funcionalización.	Aunque se aprendió lo básico, nunca se han realizado de manera individual, por lo que será un reto hacerlas y aplicar los conocimientos generados con el departamento de nanotecnología.	En este semestre fue necesario sintetizar por nuestra cuenta, aprendí a interpretar gráficos UV-Vis de estas AuNPs para determinar tamaño y posible morfología	Repetimos constantemente la síntesis, no fue algo que nos salió a la primera, con esto reforcé el análisis de metodologías, estandarización y optimización, considero que podría comprender mejor síntesis de otros materiales
Habilidades	Creación de material visual para presentaciones	Se han realizado dos carteles para presentar y presentaciones semestrales y semanales de entrega de resultados.	En este periodo se buscará presentar en algún congreso un poster y también hacer un buen material visual ya sea poster o presentación al final del semestre, por lo que esta experiencia será de importancia para lograrlo	Si digo que aprendí poco sobre cómo hacer presentaciones estaría mintiendo, al final estuvimos 3 horas con la Dra. Blanca (Lo agradecemos mucho) revisando la presentación, aprendí como presentar las gráficas, metodologías y como estructurar mejor las ideas presentadas para poder mostrar por completo lo que se hizo, pero evitar cargar demasiado la presentación.	Reforcé el trabajo en equipo, la revisión de material y la realización de gráficas y elementos visuales. En general es un área que me falla mucho, no soy una persona que sepa combinar colores o que le queden bonitas las presentaciones, entonces el tener este tipo de experiencias, ayuda bastante a saber cómo se debe de presentar algo, ya tengo esta presentación como un referente a futuro.

<p>Diseño de experimentos: determinación de reactivos, metodologías de medición.</p>	<p>Se ha trabajado con ADN, enzimas y proteínas que pueden ser difíciles de usar y mantener viables, además se han usado equipos de medición.</p>	<p>Es necesario manipular reactivos que pueden ser sensibles a temperatura y luz, por lo que el saber manipularlos es importante.</p>		
<p>Técnicas básicas y algunas avanzadas de biología molecular.</p>	<p>He realizado PCRs, geles de electroforesis, medios de cultivo, cultivos sólidos y líquidos, esterilización de material y reactivos, uso de KITS, los distintos equipos de laboratorio necesarios, columnas de purificación y extracción y columnas cromatográficas.</p>	<p>Puedo realizar las metodologías de trabajo sin contratiempos, tengo una idea bastante clara de las técnicas que puedo usar y donde podría investigar o preguntar si es que no cuento con alguna habilidad necesaria o tengo duda sobre algo.</p>		
<p>Análisis de resultados</p>	<p>A lo largo de mis estudios he tenido que justificar, discutir e interpretar resultados, es de suma importancia justificarlo con bibliografía y es algo que se ha intentado hacer durante la trayectoria de aprendizaje que he tenido.</p>	<p>Al final de semestre se deben de ir refinando las mediciones y para lograr esto es necesario tener que analizar los resultados, comprenderlos y discutirlos con bibliografía.</p>	<p>Se realizaron escritos parecidos al rPAP para ir dando seguimiento al artículo que posiblemente se publicará, fue necesario mejorar la redacción, saber expresar las ideas y tener una estructura general entendible a cualquier lector.</p>	<p>En este semestre nos enfocamos mucho en determinar por completo que fue lo que se realizaba mal, determinar posibles puntos de mejora y proponer nuevos pasos, para esto fue necesario analizar resultados anteriores e ir escribiendo que fue lo que cambió para llevar un orden y bitácora.</p>

	Realización de artículos de divulgación y ensayos críticos.	Se han escrito distintos artículos de divulgación, algunos ensayos y estoy llevando la materia de inglés para ingenieros donde se buscará mejorar la escritura en español e inglés	El producto final del PAP es un documento donde se recupere todo lo realizado este semestre, se explique de manera que cualquiera lo pueda entender y probablemente publicar al final del proyecto.		
Actitudes	Apertura a distintos puntos de vista, críticas y distintos ambientes de trabajo	En anteriores semestres he tenido distintos equipos, he tenido que explicar y discutir con ellos respecto al trabajo, pero siempre buscando avanzar en conjunto y terminar el trabajo.	Al trabajar con alguien más siempre es necesario tener que compartir tú opinión con otros, saber escuchar y tener un dialogo eficiente para complementar las ideas, por lo que será necesario tener que ser abierto a distintos puntos de vista.	Este semestre fue importante tener un pensamiento crítico y evaluar constantemente resultados y gráficos, por lo que era necesario escuchar a mi compañero, analizar lo que decía y determinar que se iba a hacer en conjunto.	Yo siento que fui más abierto a las opiniones de los demás, ya después de un año de trabajar con los profesores y mi compañero siento que hemos mejorado en la comunicación y por eso hemos trabajado sin contratiempos y en general sin problemas.
	Enfoque en la organización de trabajo, tiempos y tareas a realizar	Se trabajó de manera eficiente en otros semestres y se logró generar un buen entorno de trabajo, no solo para ir al laboratorio sino también para escribir y hacer las presentaciones necesarias.	En este semestre se trabajará con una persona más, por lo que el trabajo será dividido entre dos y la carga laboral tendrá que ser equitativa, el tener que ponernos de acuerdo será necesario para lograr un buen trabajo.		

	Presentaciones públicas y oratoria	En el pasado año se han realizado distintas presentaciones ante jueces y profesores, así como dos exposiciones en congresos.	En este semestre se buscará mejorar la presentación final, será necesario tener que expresar con coherencia los resultados finales para que sean concluyentes ya que es el cierre del proyecto	Hasta este momento puedo confirmar que se mejoró la presentación final, se trabajó suficiente en esta y practicamos para poder explicar a fondo nuestras ideas.	Reforcé principalmente el uso de herramientas visuales, así como el poder hablar, aunque se esté haciendo de manera virtual la presentación considero que es necesario también saber explicar en esta modalidad, ya que en cualquier momento podríamos presentar a alguien en el otro lado del mundo.
	Buenas prácticas de laboratorio	Durante toda mi carrera he realizado laboratorios donde he tenido supervisión de maestros, cuidan que haga las cosas con seguridad, de manera eficiente y de la mejor forma para que pueda obtener los mejores resultados posibles.	En estos proyectos se trabaja de manera individual o en equipo, pero sin un acompañamiento tan cercano del maestro o encargado de proyecto, por lo que es necesario aplicar todos estos conocimientos para no tener problemas en el laboratorio.		