

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 I



ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara

4D08 Desarrollo tecnológico para la sustentabilidad ambiental, energética y
alimentaria I

Pruebas *in vitro* de respuesta plasmónica en nanopartículas de oro en el
Parque Tecnológico del ITESO

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, Alejandro Becerra Zendejas

Profesor PAP: Dr. David José Mendoza Aguayo

Tlaquepaque, Jalisco, diciembre, 2022

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	7
1.3 Identificación de la(s) problemática(s)	8
1.4 Planeación de alternativa(s)	8
1.5 Desarrollo de la propuesta de mejora	12
1.6 Valoración de productos, resultados e impactos	28
1.7 Bibliografía y otros recursos	37
1.8. Anexos generales	¡Error! Marcador no definido.
2. Productos	40
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia	40
3.1 Sensibilización ante las realidades	41
3.2 Aprendizajes logrados	41

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

Según la Secretaría de Salud, en Jalisco, se estima que del 50 al 80% de la población femenina adquieren en algún punto de su vida, el virus del papiloma humano (VPH). Si esta enfermedad se detecta en estado temprano, la tasa de sobrevivencia es de 5 años para el 92% de los casos, aunque solo el 42% de las mujeres reciben un diagnóstico en esta etapa. El proyecto “Pruebas *in vitro* de respuesta plasmónica en nanopartículas en el Parque Tecnológico del ITESO”, está ligado con el proyecto de “Fabricación de biosensores nanoestructurados no invasivos para monitoreo y detección de enfermedades”; ambos tienen el propósito de generar un biosensor a partir de las nanopartículas de oro, pero el presente proyecto tiene como enfoque investigar el potencial que tiene para detectar el VPH de tipo 16. Mediante el uso de nanopartículas de oro con sonda y muestras de ADN de diferentes virus, se tiene el objetivo de encontrar la concentración necesaria de ADN para poder obtener un resultado óptimo en el biosensor, para finalmente usar la muestra de un paciente y detectar de manera eficiente un positivo o negativo del VPH tipo 16, a un precio más accesible. A partir de los resultados, se generaron gráficas que muestran que efectivamente se tiene un acoplamiento de las sondas con el ADN, pero no hay un desplazamiento esperado al momento de realizar un barrido espectrofotométrico, además de la falta de un cambio de color en las muestras como un detector visual.

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 buscan construir conocimientos para dar respuestas a problemáticas en un contexto específico y 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 se lleva a cabo en las instalaciones del Parque Tecnológico del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO), ubicado en la Calle Independencia 1080, detrás del campus principal de dicha universidad, en conjunto con el Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales. Este recinto cuenta con las

herramientas necesarias para la realización del proyecto, al igual que proporciona la ayuda de profesionales que garantizan que este trabajo sea un éxito.

Este proyecto experimental, dirigido por el Dr. David José Mendoza Aguayo, tiene precedentes desde el 2019, generando avances gracias a la investigación, trabajo y experimentación de alumnos. El objetivo principal es sintetizar biosensores nanoestructurados de bajo costo y no invasivos, a partir del uso de nanopartículas de oro (AuNPs) y ADN del Virus del Papiloma Humano (VPH) 16 y 18.

Los objetivos específicos para el semestre de otoño 2022 son:

- Realizar electroforesis y cuantificación de las muestras de ADN para conocer su concentración y tener un resultado visual de las mismas.
- Comparar la inmovilización de las AuNPs, con los resultados obtenidos en primavera del 2022, para así confirmar el protocolo realizado.
- Determinar el comportamiento de las AuNPs después de añadir el ADN problema, mediante un barrido con espectrofotómetro. Con respecto al resultado, se busca encontrar la concentración correcta de ADN para añadir a las AuNPs, evitando su precipitación espontánea.

Se obtuvieron muestras de VPH 16, 18 y un gen precursor de cáncer Fzd9 por parte del Dr. David Mendoza para ser utilizadas en la experimentación. Para conocer la cantidad de muestra que se tiene y de la pureza de la misma, será necesario realizar un análisis de las muestras de ADN a partir de una electroforesis y una cuantificación; de ser necesario, posteriormente se llevará a cabo una purificación.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

En México, desde el año 2006, el cáncer de mama se encuentra como la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. Se estima que se tienen aproximadamente 20,444 casos en mujeres al año, siendo 35.4 casos por cada 100,000 mujeres. La segunda causa de muerte por cáncer en mujeres se atribuye al cáncer del cuello uterino. Se estiman 13,960 casos en mujeres al año, siendo 23.3 casos por cada 100,000 mujeres. En el 2013, específicamente en

el grupo de mujeres de 25 años en adelante, se registraron 3,771 defunciones, siendo 11.3 defunciones por 100,000 mujeres [1].

Ahondando en la temática del cáncer, éste puede provenir de los virus, tal es el caso del Virus del Papiloma Humano (VPH), el cual puede causar cáncer de cuello uterino, genital u orofaríngeo, transmitiéndose principalmente a partir de contactos sexuales [2]. Los virus VPH 16 y 18 son aquellos que causan casi el 70% de los casos de cánceres cervicales [3].

En Jalisco, según la Secretaría de Salud (2021), se estima que entre el 50 al 80% de la población femenina adquirirá, en algún punto de su vida, este virus. Más del 80% de las infecciones por VPH son pasajeras y la mortalidad por cáncer cérvico uterino es baja, registrándose en el año 2020 una tasa de 4.39 por cada 100 mil mujeres, sin embargo, en México, el 99% de los cánceres se encuentra relacionado con este virus. También se informó que el cáncer es una de las principales causas de muerte, siendo uno de los factores contribuyentes el estado de la inmunosupresión del paciente, así como la presencia del VPH [4].

Antes de iniciar con las investigaciones del VPH, en otoño 2020 se llevó a cabo la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa a partir de 4 métodos diferentes en presencia de sustratos de nanohilos de níquel y oro. Después, en primavera 2021, se tuvo como objetivo trabajar con ADN para emplearlo en un biosensor dirigido al diagnóstico de enfermedades, específicamente VPH. Para el ciclo otoño 2021, se realizó la extracción de ADN de levaduras para la obtención de secuencias conservadas a partir de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), con el fin de inmovilizarlas posteriormente en AuNPs (nanopartículas de oro) [5] [6].

En primavera 2022, se valoraron las inmovilizaciones con AuNPs de diferentes tamaños utilizando 3 sondas: cisteína forward, cisteína reverse y tiol forward. Además, se realizó un protocolo a detalle para inmovilizar a las AuNPs al igual que su comportamiento en un barrido espectrofotométrico. Finalmente, en verano 2022 se observó el comportamiento de las AuNPs al ligarlas con la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés). En

otoño 2022 se pretende experimentar con el comportamiento del ADN al ser añadido a las AuNPs, con el objetivo de encontrar la concentración necesaria para su reacción sin precipitar a las AuNPs. Se podrán obtener resultados visibles, como es el cambio de color de la solución al reaccionar y además se espera tener una diferencia de barrido con respecto al barrido de las AuNPs sin ADN.

1.2 Caracterización de la organización

La investigación se lleva a cabo en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO), Universidad Jesuita de Guadalajara, Jalisco, México. El PAP está adscrito al Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales (DPTI), quien está a cargo de este proyecto es el Dr. David Mendoza. De acuerdo con el portal de la institución, la misión del ITESO es inspirar e impulsar los procesos de formación y acompañamiento. El portal continúa: “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” [7]. Adicionalmente, se estipula la visión de la universidad: “somos, en la universidad, un centro de referencia para el conocimiento y la vivencia de la espiritualidad ignaciana. Nuestra propuesta de formación y acompañamiento está en constante diálogo 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”. Finalmente, 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 constante de la realidad” [8].

Algunas de las personas que contribuyen a que el presente PAP se realice son el Dr. David Mendoza, quien asesora y verifica los pasos a realizar cada semana. El técnico Fabián de la Peña, quien entrega el material necesario para cada semana, además de organizar los espacios del Laboratorio de Biotecnología. Mi compañera Natalia Zermeño, becario del PAP, me apoya realizando algunas tareas y haciendo una agenda con lo que se lleva a cabo semanalmente.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

El VPH está altamente relacionado con el cáncer cervicouterino, origina el 99.7% de los casos de este tipo de padecimiento que, a la vez, representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas [9]. Es importante resaltar el precio de las pruebas de VPH, ya que pueden llegar a costar de \$600.00 a \$3,000.00 [10]]. Si esta enfermedad se detecta en estado temprano, la tasa de sobrevivencia es de 5 años para el 92% de los casos, aunque solo el 42% de las mujeres con este padecimiento reciben un diagnóstico en esta etapa, según la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA) [11]. Estos datos han generado interés en el desarrollo de un biosensor no invasivo y de bajo costo, por lo que desde el periodo de primavera 2021, se encaminó este proyecto a tal objetivo.

La manera en la que se realizan pruebas de VPH en la actualidad es por medio de una frotación delicada por el tejido del cuello uterino, extrayendo una muestra de células para ser sometidas a pruebas. Esta prueba tiene el propósito de buscar la presencia de la infección cervical teniendo en cuenta los tipos de VPH con alto riesgo, ya que estos tienen mayores posibilidades de evolucionar a precáncer y cáncer en el cuello uterino. También se puede hacer junto con una prueba de Papanicolaou, debido a que se pueden utilizar las mismas muestras, para determinar el riesgo que se tiene de cáncer cuello uterino [12]. Este tipo de pruebas alejan a las personas a tomarlas ya que por mal información, piensan que podrían salir lastimadas, además de que los precios son algo elevados.

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, recuperándose, 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 PAP; no obstante, esta prueba se hace a mujeres entre 30 a 60 años, no siendo recomendable para menores de 30 años [13].

En cuanto a la tipificación del virus, se realizan diversos métodos 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 evidenciar exámenes citológicos o histopatológicos los cuales permiten detectar el genoma e identificar el tipo viral que se encuentra involucrado. Por su parte, también se utilizan pruebas serológicas que tienen su base en la detección de anticuerpos y la respuesta inmunitaria a nivel celular, procedente de la infección viral. Sin embargo, la sensibilidad de las pruebas previamente mencionadas es baja al compararse con la detección de ADN viral por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que su detección es de 50-70% [14]. Por otro lado, en cuanto a 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 o propiedades espectrales. Pueden llegar a medir desde 1 nm hasta 100 nm aproximadamente, pudiendo ser sintetizadas para su bioconjugación con un oligonucleótido, anticuerpos, aptámeros u otras biomoléculas apropiadas, siendo parte de una biodetección [15]. Debido a su tamaño, las partículas tienen una buena relación “volumen-superficie”, haciéndolas ideales para enlaces simultáneos de múltiples ligando en una sola nanopartícula, al ser expuestas a una gran concentración de las moléculas bioactivas. Debido a 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

de su alternativa más común, las AuNPs, suelen ser de menor costo, además el tiempo de resultados es bastante rápido y se obtiene una respuesta visual.

Las AuNPs, son funcionalizadas añadiendo primero las sondas de tiol y se esperan 24 horas para asegurar su enlace con las AuNPs. Después se agrega a la solución un buffer de sal aumentando su concentración cada 6 horas. Pasado el tiempo, se analiza su comportamiento en el espectrofotómetro, llevando el punto más alto de absorbancia de 520 nm de las AuNPs sin sonda, a alrededor de 550 nm dando la imagen de un desplazamiento en las gráficas, asegurando así que se tiene un acoplamiento del ADN con las AuNPs [17]. En la figura 1 se puede observar el comportamiento de las AuNPs en un rango de 400 a 800 nm, se utilizó como ejemplo la gráfica del triplicado de Blancos con sonda (Blanco C.S) que son las nanopartículas de oro con sonda sin ADN y Blancos sin sonda (Blanco S.S) que son solo las AuNPs.

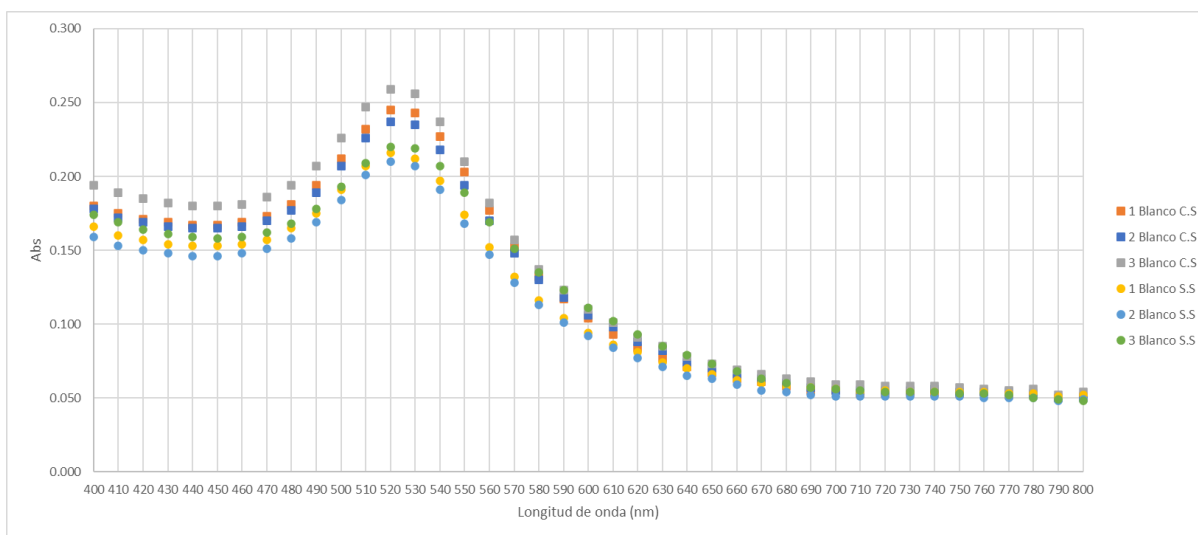


Figura 1. Comportamiento de las AuNPs y AuNPs con sonda.

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	Semana
Electroforesis y Cuantificación.	AD, FD, MP, CFL,CE,EF AN	2																
Purificación	CF,MP,AN	2																
Funcionalización de AuNPs	AD,CFL,EF,IBA AN	3																
Experimentación con diferentes concentraciones de ADN	AD, EF																	
Análisis de resultados y detalles finales	AD, AN,EF, EX																	
Revisión del avance 4 por parte del director de proyecto	AD																	
Presentación final de Proyecto	IC,CC,AR,PA																	

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>
AD	Asesoría Dr. David Mendoza
FD	Foto documentador
MP	Microplaca para Espectrofotómetro
CFL	Cámara de Flujo Laminar
CE	Cámara de Electroforesis
EF	Espectrofotómetro
CF	Centrífuga
IBA	Incubadora con Agitación
AN	Apoyo de Natalia Zermeño
EX	Excel
IC	Investigador a cargo del proyecto
CC	Coordinador de la carrera
AR	Asesores del RPAP
PA	Profesores asistentes

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

AuNPs

Las AuNPs son ampliamente utilizadas en el sector biomédico debido a sus propiedades ópticas y físicas que tienen la facilidad de tener una resonancia de plasmón de superficie. Además, tienen un coeficiente molar de extinción, siendo ideal para procesos de etiquetado al igual que la formación de imágenes o para detectar una gran cantidad de analitos [18]. Las AuNPs son tan pequeñas como lo son las proteínas o el ADN, y al tener una preparación tan sencilla, pueden tener propósitos como biosensor, vacuna o hasta de una entrega de

medicamentos de una manera más directa y sin ser dañina para la salud. Su tamaño puede ser de 1 nm hasta 100 nm aproximadamente, generalmente se encuentran en suspensión coloidal, que consiste en un núcleo con átomos de oro y una capa en la superficie con cargas negativas.

Hay diferentes procedimientos para la síntesis de AuNPs, dependiendo del que se utilice, serán las características físicas que las AuNPs pueden tener, como su forma o tamaño. Estos procedimientos pueden ser físicos, químicos o biológicos, siendo el método químico el más común de utilizar. Este método está basado en una reducción química consecutiva a la estabilización, lo que evita el acoplamiento de nanopartículas [18].

El método de reducción con citrato o también conocido como el método de Turkevich, es el más utilizado para la síntesis de AuNPs, se emplean las soluciones ácido clorhídrico y ácido cítrico [19]. Los citratos son ligandos con poca afinidad a las AuNPs por lo que pueden ser remplazadas por otros ligandos. De esta manera se producen nanopartículas de alrededor de 20 nm, aunque al ajustar las concentraciones se pueden tener resultados de 16 nm hasta 147 nm aproximadamente.

Efecto Plasmón y plasmones de superficie

El efecto plasmón es la capacidad de las nanopartículas de oro de cambiar la absorbancia y reflexión de la luz visible. De esta manera se distorsiona el haz de luz, ocasionando un cambio de color. El tamaño de la partícula también tiene un impacto en este efecto, el cual se puede observar al realizar un barrido espectrofotométrico.

Las propiedades ópticas de las AuNPs son afectadas directamente por la resonancia de plasmón de la superficie (RPS). Esta resonancia es la frecuencia electrónica que ocurre en la superficie de las AuNPs y coincide con las ondas magnéticas. A un rango aproximado de 520 nm, el efecto plasmón presenta un incremento abrupto de la absorbancia, mientras que en las AuNPs se puede presenciar un cambio de color a morado entre la longitud de onda de 520 a 574 nm [21].

Visualización de las AuNPs

Las soluciones de AuNPs coloidales pueden ser analizadas en rangos de longitud de onda de rojo a morado-azulado, aunque esta cambia conforme la resonancia de plasmón de superficie es alterada por la oscilación de los electrones en la superficie de la AuNPs. Este comportamiento depende de la distancia que hay entre AuNPs, al ser menor que el tamaño de las nanopartículas, la resonancia de las AuNPs empieza a hibridar lo que causa que el máximo pico de absorción se desplace a una longitud de onda más larga, esto genera un cambio de color visible en la solución o en un barrido de espectroscopia UV-Vis. Hay un cambio de la resonancia plasmónica en las AuNPs cuando se inmoviliza el ADN, esto se puede observar al realizar un análisis con espectrofotómetro ya que se genera una disminución de la banda debido a la concentración de partículas. Esta concentración permite que las AuNPs se utilicen como biosensores ópticos [21] [22] [23].

Grupo tiol y su atracción a la superficie de las AuNPs

Las AuNPs tienen una carga negativa en la superficie, lo que genera que las moléculas que tienen grupos tiol sean atraídas fácilmente a la superficie, lo que causa un intercambio de ligando con el citrato y así desarrollando una monocapa superficial, aumentando la estabilidad de las AuNPs. Las cadenas simples, formadas por una sola cadena de nucleótidos, también llamadas sondas, tienen un tamaño de alrededor de 20 a 35 pb y son funcionalizadas con grupos tiol con el propósito de establecer una unión de sonda con las AuNPs de manera estable como se presenta en la figura 2, Es necesario generar una repulsión electrostática entre las cargas negativas de las sondas y de las nanopartículas mediante soluciones salinas. Estas soluciones, además de causar la repulsión electrostática para permitir la unión, también pueden ocasionar una precipitación de las AuNPs, por lo que es necesario agregar la solución con extremo cuidado. También es necesario realizar un pretratamiento de las sondas, para así tener una inmovilización adecuada de sonda y AuNPs con el propósito de tener una fuerte repulsión electrostática que mantenga a las nanopartículas en solución coloidal [6].

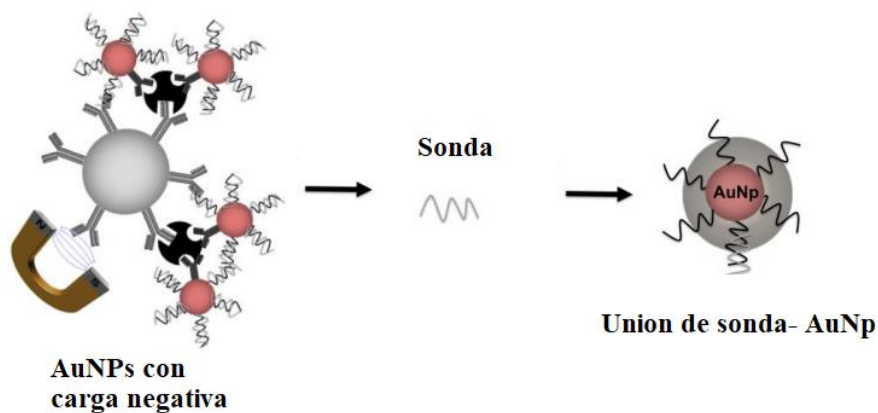


Figura 2. Diagrama de unión sonda-AuNP [23]

Salt-aging, como método para inmovilización de sonda-AuNP

Uno de los métodos más utilizados para la inmovilización de la unión sonda-AuNP, es el llamado “Salt-aging” desarrollado por Mirkin y su equipo (1996). El método se basa en agregar pequeñas concentraciones de sal a ciertos intervalos de tiempo, hasta llegar a la concentración deseada con el propósito de mantener la estabilidad de las nanopartículas y evitar su precipitación [24].

Diseño de sondas

En el PAP primavera 2022 se diseñaron y sintetizaron 3 sondas diferentes que se presentan en la tabla 3, por IDT (Integrated DNA Technologies) para posteriormente ser tratadas con cloruro de sodio (NaCl) a diferentes concentraciones a ciertos intervalos de incubación como se describe en los siguientes apartados.

Tabla 3. Secuencias de sondas sintetizadas en primavera 2022

Nombre de la secuencia	Secuencia
Tiol fwr	/5Thiol MC6-D/CTGCCATATCTACTTCAGAACTAC
Cis fwr	/5AmMC6/CTGCCATATCTACTTCAGAACTAC
Cis rev	/5AmMC6/GTAGTTTCTGAAGTAGATATGGCAG

Los virus de VPH tienen un vector circular de aproximadamente 8,000 pb. En este vector se encuentran los genes E1-E7, encargados de la replicación viral y regular la transcripción. Los genes E5, E6 y E7 interactúan con la célula hospedera para infectar basándose en la transcripción viral con E2, de esta manera se une a los cromosomas mitóticos de la célula, permitiendo así establecer el ADN viral dentro de las células en división. En la figura 3 se muestran las diferentes partes del vector [25] [26] [27]. El diseño de estas sondas tiene el propósito de ser utilizadas con VPH, utilizando las secuencias del vector que se mantienen entre una misma especie, para así generar una distinción entre organismos que funciona como un patrón de identificación [28]. Para el diseño de las sondas se utilizó la fracción L1, que es altamente conservada entre especies.

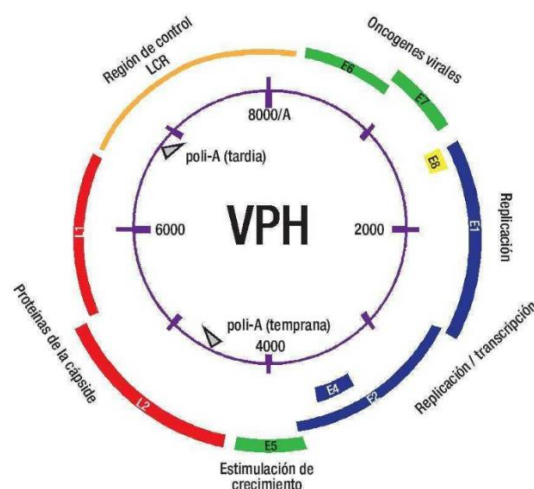


Figura 3. Parte del vector circular del VPH [29]

Uso de ADN de VPH tipo 16, 18 y FZD9 y sus concentraciones a utilizar

Como ya se mencionó con anterioridad, el propósito del presente PAP es que las AuNPs inmovilizadas puedan detectar material genético del VPH tipo 16, pero debido a la similitud del VPH 16 y VPH 18, se utiliza el ADN del VPH 18 como un falso positivo. Además, se utiliza un tercer material genético completamente diferente a los dos para ver el comportamiento que este tiene con las nanopartículas. El gen FZD9 codifica la proteína Frizzled-9 (Fz-9) en humanos, se encuentra en el cromosoma 7 y su delección está relacionada con el Síndrome de Williams [30].

Se hicieron tres pruebas diferentes de las concentraciones de ADN utilizadas en las nanopartículas, 100, 125 y 150 pg/mL. Se escogieron estas concentraciones a partir del artículo de Jin-Ho Lee y su equipo (2013), donde se realiza un experimento con AuNPs con un tamaño muy similar al estudiado. En el artículo se menciona que la experimentación fue realizada en los rangos de concentración de 200 fg/mL siendo la máxima de 125 pg/mL, por lo que en el presente PAP se optó por primero utilizar la concentración más alta para determinar su comportamiento [17]. Cabe destacar que la experimentación en este artículo fue con el gen del VIH-1.

Electroforesis

Las muestras fueron proporcionadas por el Centro de investigación Biomédica de Occidente (CIBO). Debido al color en el que se presentaban las muestras, fue necesario someterlas a electroforesis para corroborar su pureza. El objetivo de la electroforesis es separar las moléculas por medio de un campo eléctrico, determinando así qué ADN se encuentra en las muestras proporcionadas.

Para realizar la electroforesis, se preparó gel de agarosa al 1%, se pesaron 0.25g de agarosa en una Balanza de Precisión Nimbus®. Se añadieron 25 mL de TAE 1x en un matraz Erlenmeyer de 250 mL para después diluir la agarosa con la solución. Utilizando un horno de microondas se calentó la solución por 5 segundos, agitándolo cada vez que se terminaba el tiempo programado. Se continuó con este procedimiento hasta que se obtuvo una solución homogénea. En este punto se agregaron 5µL de SYBR safe en el matraz y nuevamente se agitó. Tomando el soporte del portagel previamente construido, se añadió la solución, como se presenta en la figura 4, y también se agregó el peine en la posición correcta (la parte más ancha del peine hacia la pared del portagel más cercana).

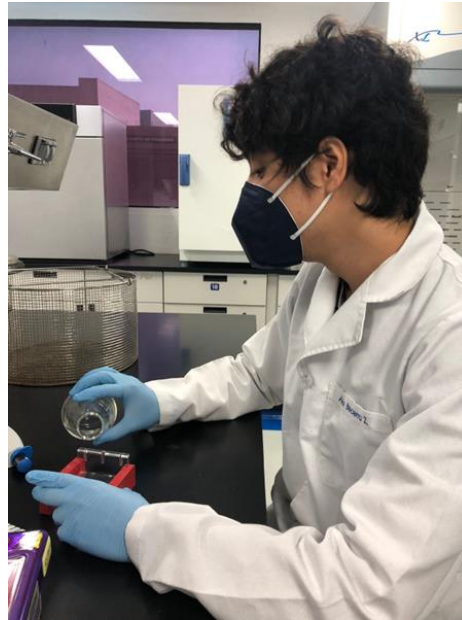


Figura 4. Vertiendo la solución de agarosa sobre el soporte de portagel

Se retiraron las almohadillas del soporte de portagel y se colocó en la cámara de electroforesis, cuidando que los pocillos estuvieran más cercanos al cátodo (denotado por el color negro). Se cubrió la cámara de electroforesis con TAE 1X hasta sobrepasar el soporte de gel. Se presenta un diagrama en la figura 5 de los pasos utilizados durante esta parte de la electroforesis.



Figura 5. Diagrama del gel de agarosa para Electroforesis

Una vez transcurridos 3 minutos, se retiró el peine del soporte del gel. En una superficie estéril se mezclaron 2µL de buffer de carga, 1µL de ADN regla y se añadió 9µL de agua

calidad MiliQ, se resuspendió utilizando una micropipeta de 0.5- 10 μL , y se añadió en el primer pocillo esta solución. Para las muestras de ADN, en una superficie estéril se añadieron 2 μL de buffer de carga, 4 μL de muestra de ADN, se resuspendió utilizando la micropipeta de 0.5 – 10 μL (con una nueva punta), y la mezcla fue añadida en el siguiente pocillo. Esto se hizo seis veces ya que se añadieron dos veces las tres muestras. Para finalizar, como se presenta en la figura 6, se tapó la cámara de electroforesis, y se conectó a un regulador de voltaje, se programó a 100 V por 35 min.

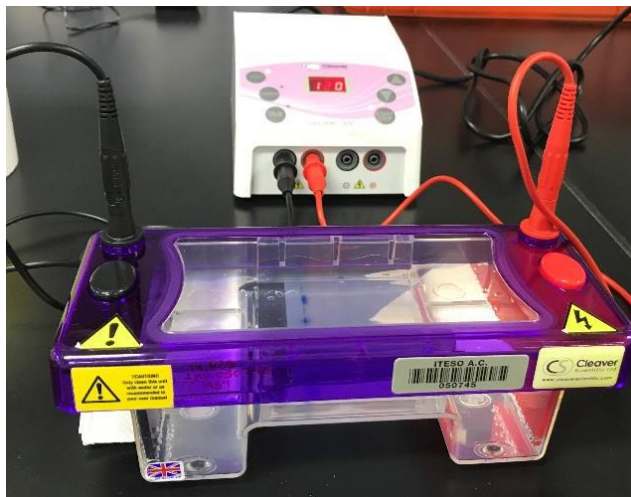


Figura 6 Cámara de electroforesis conectada al regulador de voltaje.

Después de este proceso, se llevó el gel al fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+ de Bio-Rad™ Laboratories para revelar los resultados, obteniendo la figura 7. Se observó que en los pocillos donde se encuentran las muestras había dímeros, por lo que se optó por purificar las muestras obtenidas.

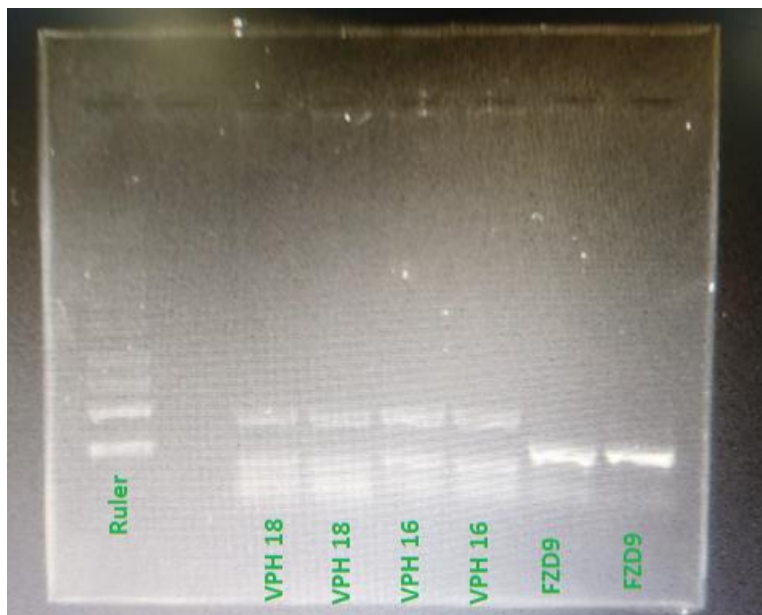


Figura 7. Electroforesis del ADN por duplicado de VPH 18, 16 y FZD9 (en ese orden)

Purificación

Utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System que se presenta en la figura 8, se purificaron las muestras de VPH 18, 16 y FZD9. Se siguieron los pasos que se presentan en el protocolo proporcionado por Promega.

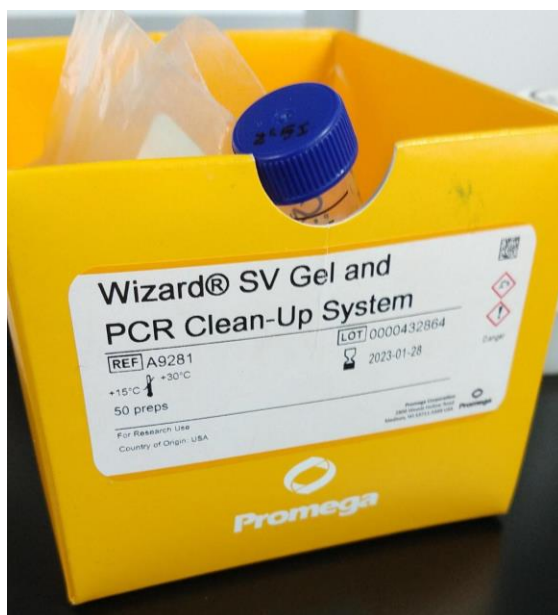


Figura 8. Kit de purificación de ADN

Se añadió un tubo de mini columna en un tubo recolector por cada muestra a purificar. Se transfirieron las muestras a las mini columnas y se incubaron por 1 min. Se tomó el tubo recolector junto con la mini columna y se centrifugaron en un Gyrozen Refrigerated, High-Speed Micro Centrifuge 1730R a 14,000 RPM, 4°C por 1 min. Se removió la mini columna del ensamblado y se decantó el tubo recolector. Nuevamente se agregó la mini columna al tubo recolector.

Se realizó un lavado de la columna añadiendo 700µL de Membrane Wash Solution previamente diluido con 95% de etanol a la mini columna junto con el ensamblado. Nuevamente se centrifugó el ensamblado completo por 1 min a 14,000 RPM, 4°C. Se decantó el tubo recolector y se ensambló con la mini columna. Este proceso se repitió, pero con 500µL de “Membrane Wash Solution” y esta vez la centrifugación duró 5 min. Se decantó el tubo recolector, se ensambló con la mini columna y se volvió a centrifugar por 1 min, para evaporar todo el etanol residuo.

Con cuidado se transfirió la minicolumna a un tubo de microcentrífuga (1.5 mL), evitando que se moje la base de la columna. Se añadió 50 µL de agua libre de nucleasas directamente en el centro de la columna evitando tocar la membrana. Se incubó por 1 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó por 1 minuto a 14,000 rpm, 4 °C.

Se desechó la mini columna y se almacenó el tubo de microcentrífuga en refrigeración a menos de 4°C. Se realizó una cuantificación de las muestras para conocer la concentración de ADN que tenían; el proceso se menciona de manera detallada en el siguiente apartado.

Cuantificación de ADN

Se hizo la cuantificación de ADN a cada una de las tres muestras en cinco eventos: 1, 15 y 21 de septiembre del 2022, así como el 11 y 13 de octubre del 2022. Se utilizó el método de absorbancia UV-Vis con el espectrofotómetro de microplaca Multiskan™ GO de Thermo Scientific™. Se midió la absorbancia de 1 µL de muestra de ADN diluida en 1µL de agua ultrapura a 260 y 280 nm utilizando la µDrop™ plate de Thermo Scientific™. Dicho valor de respuesta a 260 nm fue empleado en la ecuación de Lambert-Beer (ecuación 1), para la µDrop Plate (ecuación 2), que permitió obtener el valor de la concentración.

$$A = \varepsilon * b * C$$

Ecuación 1. Ley de Lambert-Beer

$$\text{Concentración } dsDNA_{260} = Abs_{\lambda} * \left(50 \frac{\mu g}{ml} \right) * \left(\frac{10 mm}{0.52 mm} \right)$$

Ecuación 2. Ley de Lambert-Beer para la μ Drop Plate

Donde la concentración del ADN se obtiene en $\mu\text{g/mL}$, Abs_{λ} es el valor obtenido de la muestra por el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm menos el valor obtenido del blanco a la misma longitud, los 50 $\mu\text{g/ml}$ es el valor que tiene el ADN con respecto a la absorbancia y los 10mm/ 0.52 mm es el valor obtenido a partir del grosor de la μ Drop plate (Al final se toma en cuenta el factor de dilución). Con el mismo método de cuantificación de ADN, se estableció la relación 260/280 que arrojó los datos de pureza (tabla 4).

Tabla 4. Concentración de ADN de las muestras VPH 18, 16 y FZD9 después del proceso de purificación

Muestras	Concentración $\mu\text{g/mL}$
VPH 18	119.23
VPH 16	148.08
FZD9	130.77

Para verificar la purificación de las muestras, se realizó una electroforesis a cada uno de los 3 tipos de ADN por duplicado y se observó en fotodocumentador de geles ChemiDoc™ XRS+ de Bio-Rad™ Laboratories. En la figura 8 se presenta la electroforesis revelada.

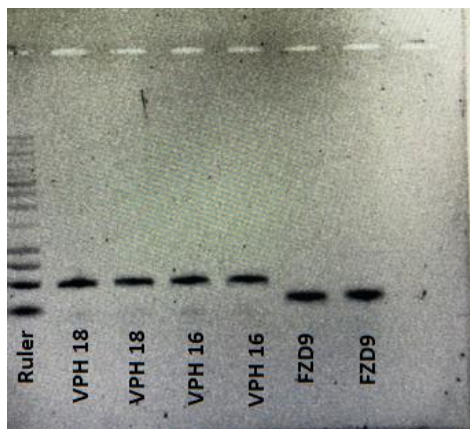


Figura 9. Electroforesis de las muestras purificadas

Prueba in vitro con AuNPs

Los pasos siguientes son parte del protocolo estandarizado realizado en primavera 2022, por los estudiantes Alejandra Dau, Ailed Fuentes y Aracely Gutiérrez bajo la supervisión del Dr. David Mendoza. La experimentación fue realizada por triplicado, en otras palabras, se realizaron 3 tubos de microcentrífuga con la solución de AuNPs sin sonda (blanco -), 3 tubos con solución de AuNPs y sonda pretratada (blanco +), y 3 tubos con AuNPs, sonda pretratada para cada concentración y cada muestra de ADN, en las figura 9 y 10 se presentan los blancos – y blancos +, respectivamente. Para esto, se llevó a cabo el pretratamiento de la sonda, utilizando el oligonucleótido Tiol fwr con la secuencia /5Thiol MC6-D/CTGCCATATCTACTTCAGAACTAC, diseñado por el PAP primavera 2022 y cuyo proveedor es IDT (Integrated DNA Technologies).

Pretratamiento del oligonucleótido forward con calor

Se disolvieron 2 μ M del oligonucleótido modificado de tiol fwr en condiciones estériles, en 50 μ L de agua miliQ estéril. Después se incubaron en un IKA Dry Block Heater 1 a 70°C por 10 minutos y se mantuvieron a esa temperatura hasta su uso. En las figuras 10 y 11 se presentan los triplicados de los blancos obtenidos en la experimentación del día 6 de octubre, a simple vista no se puede observar una diferencia, pero a partir de un barrido se puede apreciar con mayor detalle.



Figura 10. Triplicado de blancos sin sonda (Blancos-)



Figura 11. Triplicado de blancos con Sonda (Blancos+)

Previo a la inmovilización de la sonda, se prepararon tres soluciones de NaCl en buffer de fosfato (PBS) 0.01M (que además contiene 0.137 M de NaCl), pH 7.0, a 0.050, 0.055 y 0.20M. Los detalles de los reactivos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Cantidades de especies utilizadas para la preparación de soluciones de NaCl

Concentración de NaCl (M)	Buffer PBS 0.001M (mL)	Agua miliQ estéril (mL)	NaCl (g)
0.050	36.5	63.5	0
0.055	40	60	0
0.200	100	0	0.35

Inmovilización de las AuNPs basado en “Salt-aging”

Una vez transcurridos los 10 min del IKA Dry Block Heater 1 en el cual estaba sometido la sonda, se mezclaron por goteo con 450 μL de AuNPs “rojas” (20 nm de diámetro aproximadamente), y se dejaron reposar a 32°C durante 24 h a 150 RPM en una incubadora orbital. Después de estas 24 h, se adicionaron 200 μL de una solución de NaCl 0.05 M (buffer de fosfato (PBS), 10 mM, pH 7.0) para llevar la solución a una concentración de NaCl 0.014 M y nuevamente se incubó a 32°C durante 6 h, a 150 RPM. Pasadas las 6 h, se aumentó la concentración de NaCl a 0.05 M añadiendo 200 μL de buffer de NaCl a 0.2 M, y se incubó por última vez a 32°C durante 6 h [30]. Durante todo el proceso se privaron los tubos de microcentrífuga de exposición a la luz. Transcurridas las 6 h se propuso un modelo de experimentos a distintas concentraciones de ADN y por triplicado. Las muestras ADN se encontraban a 100, 125 y 150 pg/mL

Prueba in vitro con AuNPs + ADN

Utilizando la ecuación de dilución que se presenta en la ecuación 3, se obtuvieron las cantidades necesarias para cada muestra. Después se preparó cada tubo de microcentrífuga, con la solución de AuNPs ya inmovilizadas con la sonda, a su respectiva concentración; se presenta la tabla 6 donde se muestran las cantidades necesarias en μL .

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Ecuación 3. Dilución, masa por volumen

Tabla 6. Volumen necesario para llevar la solución de AuNPs de 900 μL a la concentración deseada

Concentración de ADN (pg/mL)	VPH 18 (μL)	VPH 16 (μL)	FZD9 (μL)
100	1.67	0.83	0.87
125	2.09	1.03	1.09
150	2.5	1.24	1.31

Se tuvo como volumen final en cada tubo de microcentrífuga 900 μL , por lo que fue necesario quitar el volumen que sería añadido de ADN. Antes de agregar el ADN correspondiente a

cada tubo, primero se realizó un pequeño stock de cada ADN, para llevarlos a un pretratamiento en el IKA Dry Block Heater 1 a 95°C por 10 min. Después de realizar estos cálculos al igual que el pretratamiento, y separando los blancos, se añadió el volumen necesario de cada muestra a los tubos de microcentrífuga correspondientes. En la figura 12 se presentan las muestras de VPH 16 a una concentración de 125 pg/mL para poder compararlas con las figuras 13 y 14.



Figura 12. AuNPs más una concentración de 125pg/mL de VPH 16

Se pasaron 100 y 200 μ L de cada tubo de microcentrífuga a una microplaca de 96 pocillos como se presenta en la figura 13. Los pocillos con 100 μ L fueron diluidos con agua libre de nucleasas y además se añadió en un pocillo aparte buffer de NaCl a 0.55 M para utilizarlo como blanco al momento de leerlo con el espectrofotómetro.

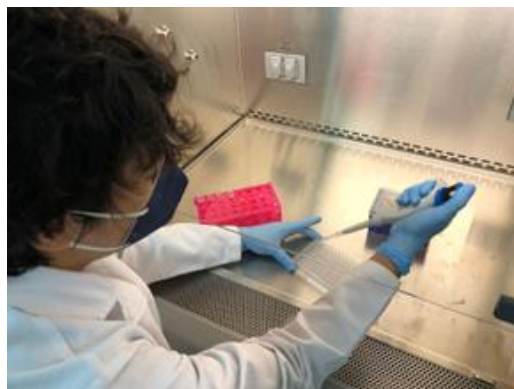


Figura 13. Agregando 200 μ L y 100 μ L de solución de AuNPs con ADN a la microplaca

La microplaca se llevó al espectrofotómetro Multiskan™ GO de Thermo Scientific™ para realizar un barrido de 400 a 800 nm como se puede observar en la figura 14. Se utilizó el

software con el que viene el equipo para poder tener un mejor control desde una computadora.



Figura 14. Análisis de la microplaca con el espectrofotómetro

Multiskan™ GO de Thermo Scientific™

Las soluciones se centrifugaron en el equipo Gyrozen Refrigerated, High-Speed Micro Centrifuge 1730R a 12,000 RCF, 4°C por 20 min. Esta centrifugación se realizó para aumentar el acoplamiento de la sonda con el ADN, y además descartar el ADN y sonda que no fueron unidas y así tener un resultado más limpio. En la figura 15 se observa la solución después de la centrifugación, obteniendo un pellet en la parte inferior del tubo.



Figura 15. AuNPs con ADN de VPH 16 después de la centrifugación

Se tomó con cuidado 100 y 200 μL del sobrenadante obtenido de cada tubo de microcentrífuga y se añadió a la microplaca para nuevamente ser analizado con el espectrofotómetro además de añadir otros 100 μL de agua libre de nucleasas a los 100 μL de muestra, para tener un volumen total de 200 μL . Esta vez se realizó un barrido de 200 a 800

nm para observar si se encuentran picos elevados a la longitud de onda en la que los ácidos nucleicos absorben la luz con una mayor intensidad que es a 260 nm [31].

Se decantó el volumen faltante teniendo cuidado de no tirar también el pellet generado por la centrifugación dejando aproximadamente 100 μ L de solución. Se añadieron 500 μ L del buffer salino a 0.55 M para, con cuidado, llevar la solución a un volumen total de 600 μ L, aproximadamente, y a una concentración cercana a la que estaba originalmente. En la figura 15 se presentan las AuNPs después de este proceso, comparándolas con la figura 12, se aprecian más tenues.

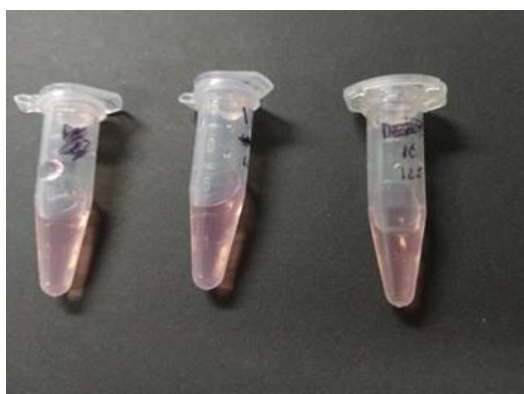


Figura 16. AuNPs con ADN de VPH 16 después de la Re-suspensión

Se tomaron nuevamente 100 μ L de la solución de AuNPs para después ser diluidos en 100 μ L de agua libre de nucleasas y 200 μ L directos, ambos se añadieron a la microplaca para analizarlas en el espectrofotómetro. Este tercer y último análisis tiene como propósito comparar los resultados con el primer análisis y ver si realmente se obtuvo un resultado más claro.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Se realizaron dos pruebas completas de la experimentación, dando como resultado 162 muestras analizadas. El documento con los datos crudos, al igual que con todas las gráficas realizadas y fotos tomadas a las muestras se presenta al final de este documento, en el apartado de productos. Cabe destacar que por la pureza obtenida de la muestra de VPH 18 se tuvo que utilizar un mayor volumen de muestra para llegar a la misma concentración que las

otras muestras, por lo que fue necesario nuevamente obtener muestras de ADN y por sí mismo llevarlas a electroforesis para observar su pureza, purificarlas y finalmente cuantificarlas. Las gráficas mostradas en este documento fueron realizadas a partir del promedio de todas las repeticiones.

Las figuras 17, 18 y 19 son el promedio de los resultados obtenidos de ambos días de los blancos (negativo y positivo) pasado por los diferentes procesos. Se puede observar que en todas las gráficas el comportamiento del blanco positivo es mayor en absorbancia que el negativo, esto se debe a la presencia de sonda en la solución. Es por esto, que se espera que las muestras experimentales a diferentes concentraciones se encuentren entre estos dos barridos, marcando el mínimo y máximo que se podría tener en absorbancia.

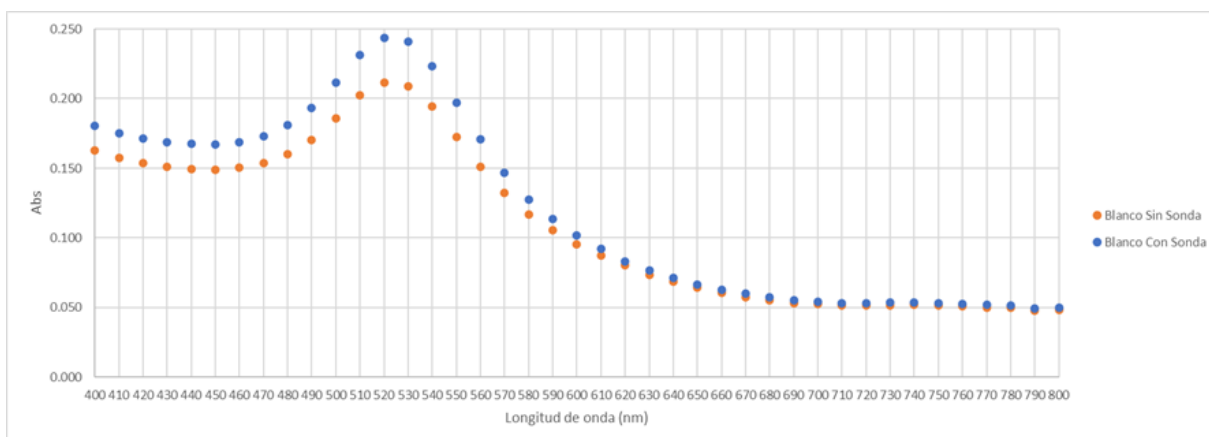


Figura 17. Blancos sin centrifugación

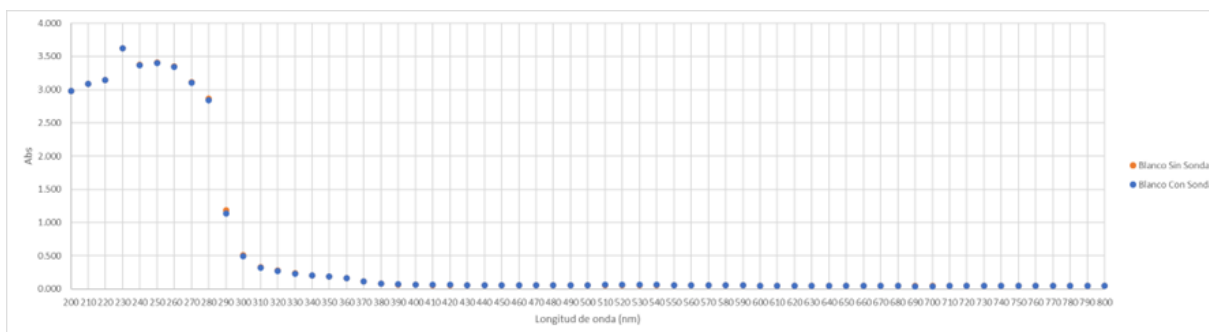


Figura 18. Sobrenadante de blancos (después de centrifugar)

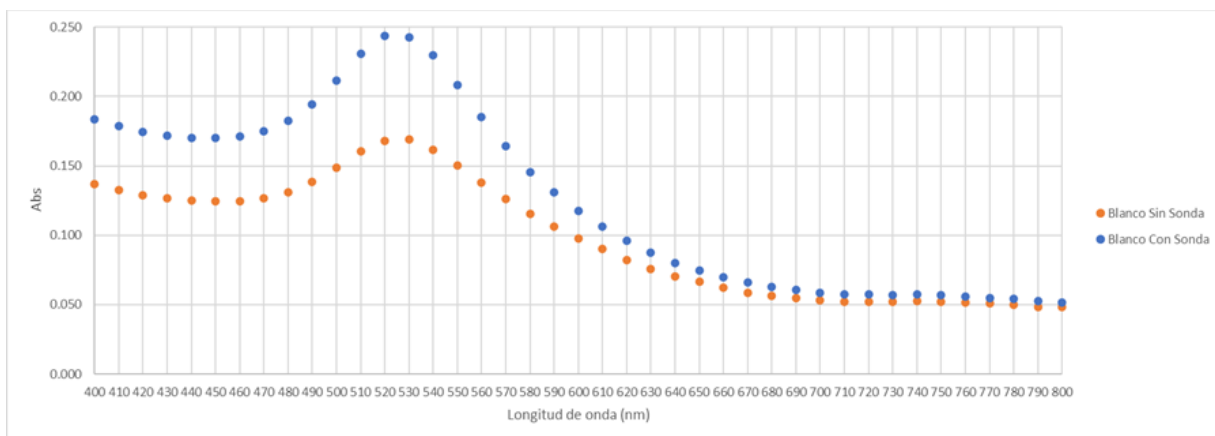


Figura 19. Blancos resuspendidos con buffer salino

En la figura 20 se presentan los blancos – (A) al igual que los blancos + (B) respectivamente, se puede observar que los blancos + se encuentran levemente más rojizos. Este coloramiento diferente se puede deber a la presencia de la sonda, aunque es necesario realizar más repeticiones para poder confirmarlo.

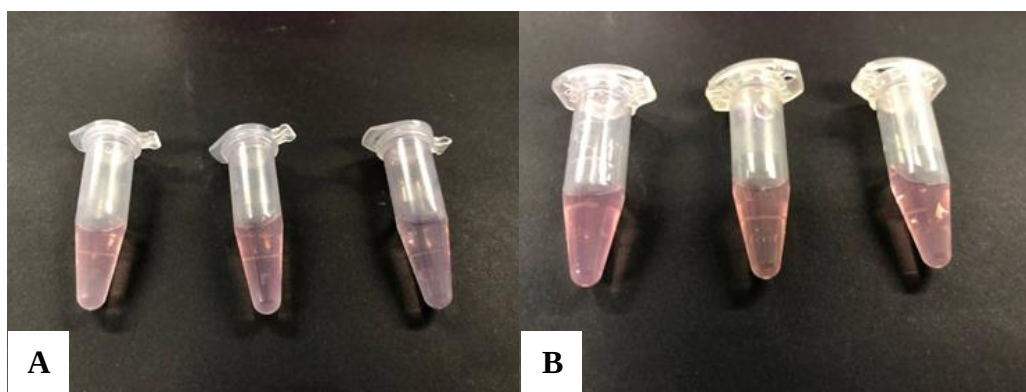


Figura 20. Blancos sin sonda (A) y Blancos con sonda (B)

En las figuras 21, 22 y 23, se presentan las AuNPs con las muestras de VPH 16, 18 y FZD9 comparándolas a diferentes concentraciones. Se puede apreciar en la figura 21 que a una concentración de VPH 16 a 125 pg/mL hay un leve desplazamiento hacia la derecha a comparación del blanco con sonda.

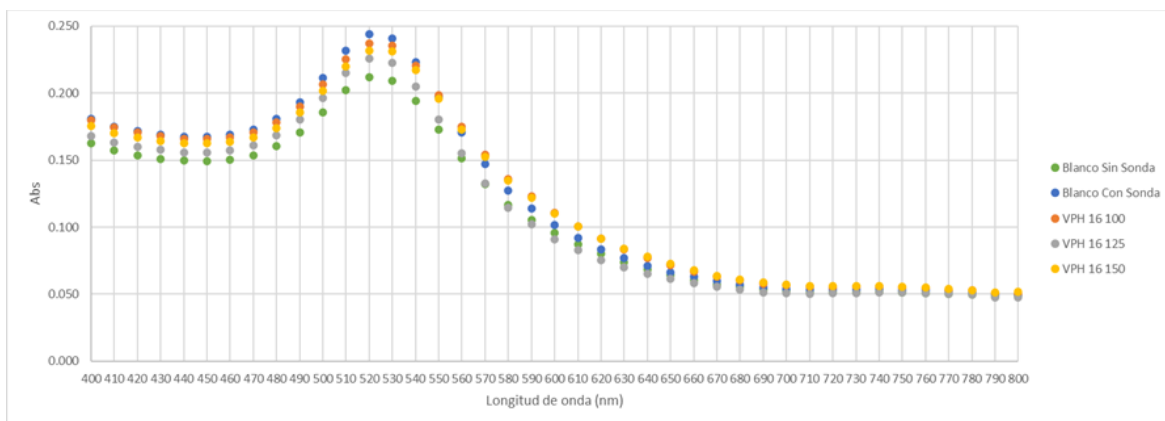


Figura 21. Comportamiento de las AuNPs al añadir VPH 16 a diferentes concentraciones

En la figura 22 se observa que el comportamiento del VPH 18 a las concentraciones 125 y 150 pg/mL son muy similares a las del blanco con sonda, destacando la experimentación con la concentración de 100 pg/mL ya que este sale del rango del blanco sin sonda. Esto se puede deber a una disminución de la absorbancia debido al acoplamiento del ADN a las AuNPs ya que es mucho menor la absorbancia que las AuNPs sin sonda. También existe la posibilidad de que, al ser la muestra más sucia, esto haya afectado de alguna manera a las AuNPs.

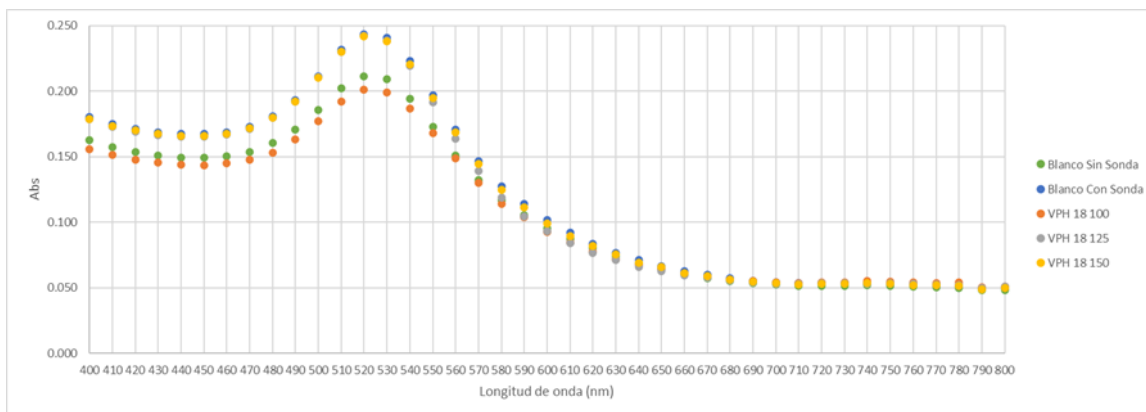


Figura 22. Comportamiento de las AuNPs al añadir VPH 18 a diferentes concentraciones

En la figura 23 se presenta el comportamiento del FZD9, este parece que disminuye la absorbancia con respecto al aumento de la concentración de la muestra, lo que se puede deber a la interferencia del ADN con las AuNPs y no necesariamente de un acoplamiento, ya que no hay un desplazamiento de los barridos con respecto a los blancos. Esto es parte del resultado que se esperaba ya que no hay manera en la que FZD9 se acople con la sonda añadida.

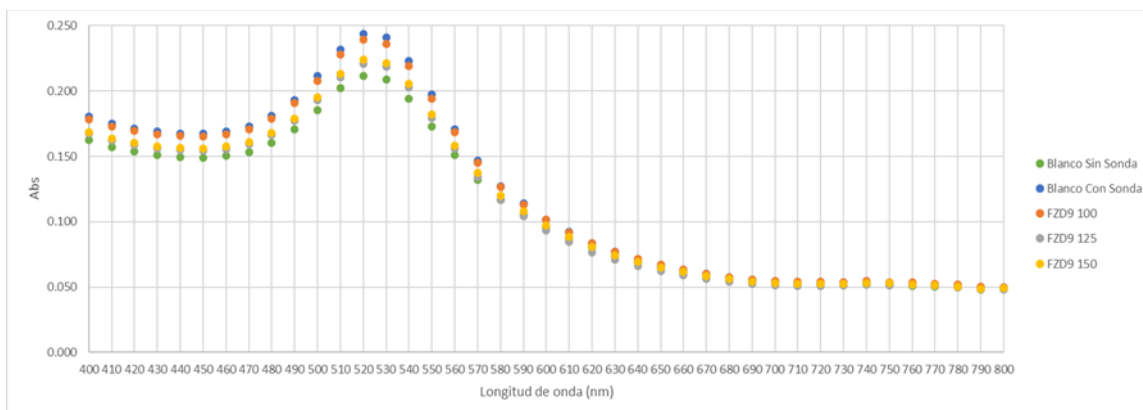


Figura 23. Comportamiento de las AuNPs al añadir FZD9 a diferentes concentraciones

En la figura 24 se presentan las imágenes de las AuNPs con VPH 16, 18 y FZD9 respectivamente. Todas a una misma concentración y por triplicado; entre ellas destacan las AuNPs con FZD9, ya que son los tubos que tienen una coloración más tenue, aunque esto se puede deber a la luz de la foto.



Figura 24. AuNPs con una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ de VPH 16 (A), 18 (B) y FZD9 (C)

En las figuras 25, 26 y 27 se presentan las AuNPs, después del proceso de centrifugación y solo analizando el sobrenadante. El análisis de este proceso sería con un barrido de 200 a 800 con el propósito de observar un aumento de absorbancia a la longitud de onda de 260 nm. Al observar las figuras 25, 26 y 27, se puede concluir que no hay diferencia significativa entre las diferentes concentraciones por lo que se concluye que el comportamiento del aumento de absorbancia en un rango de 200 a 280 nm es una huella, es decir, que es una característica que no cambia significativamente aun con diferentes concentraciones y muestras.

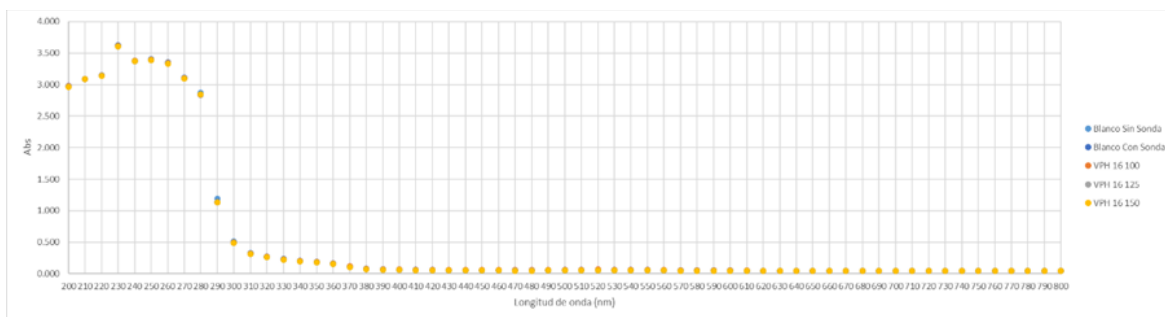


Figura 25. Sobrenadante de AuNPs con muestra de VPH 16 (después de centrifugar)

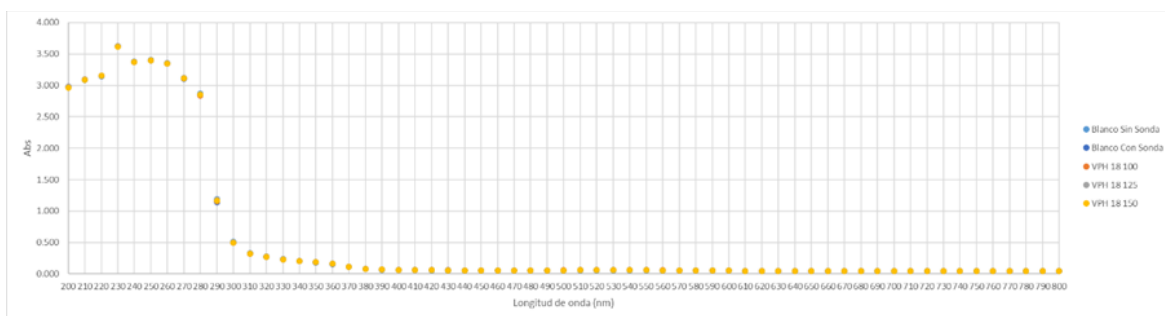


Figura 26. Sobrenadante de AuNPs con muestra de VPH 18 (después de centrifugar)

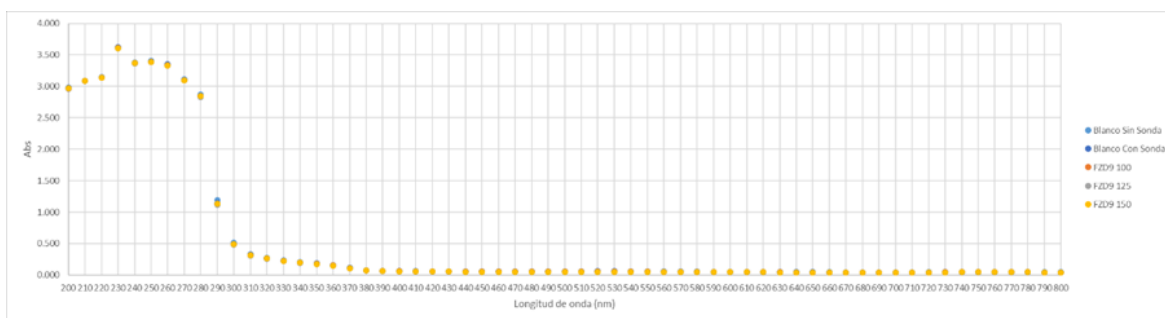


Figura 27. Sobrenadante de AuNPs con muestra de FZD9 (después de centrifugar)

Se presenta la figura 28 donde se observa un cambio visual de las muestras en comparación con las figuras anteriores. En todas se observa un pellet de color morado-rojizo, aunque no hay ninguna destacable, las que tienen un tono más rojizo en el sobrenadante, es debido a su manipulación.

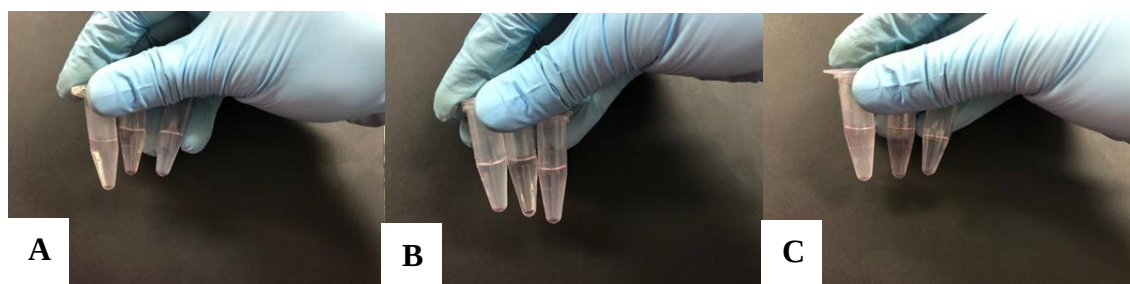


Figura 28. AuNPs con ADN de VPH 16 (A), 18 (B) y FZD9 (C) después de la centrifugación

Las figuras 29, 30 y 31 son los resultados obtenidos de las AuNPs con VPH 16, 18 y FZD9, respectivamente, después de decantar el sobrenadante y obtener el pellet. Posteriormente se resuspendieron las AuNPs en buffer salino para llevarlas a un volumen y concentración inicial.

En la figura 29 se observa el comportamiento del VPH 16, si se compara con los blancos, se puede apreciar un ligero desplazamiento a la derecha en el barrido de la concentración de 150 pg/mL. Esto se puede deber a un acoplamiento del ADN con las AuNPs aunque este movimiento no es significativo en comparación con los resultados que se presentan en la investigación realizada por Jin-Ho Lee y compañía (2013) donde se está experimentando con AuNPs pero utilizando como metabolito muestras de VIH-1 a unas concentraciones de 1 pg/mL a 125 pg /mL. En dicha investigación se aprecia un comportamiento similar a las AuNPs con las que se trabajó en el presente estudio [17].

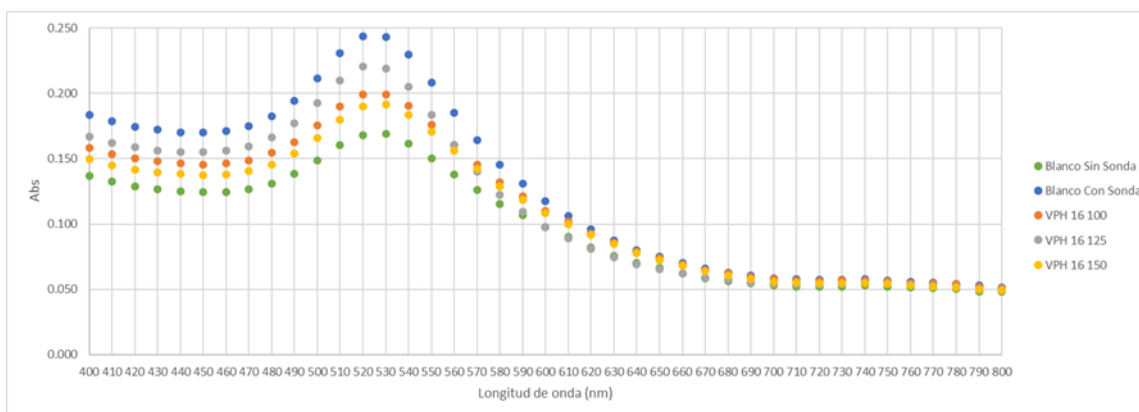


Figura 29. AuNPs con muestra de VPH 16 resuspendidas en buffer salino

En la figura 30, el comportamiento del VPH 18 a las concentraciones de 125 y 150 pg/mL es inusual, ya que sobrepasa, o es muy similar, al comportamiento del blanco con sonda. La concentración a 100 pg/mL también tiene un ligero desplazamiento al igual que una disminución de absorbancia, esto se puede deber a la gran similitud que tiene el ADN de VPH 18 y 16, aunque este desplazamiento no es significativo.

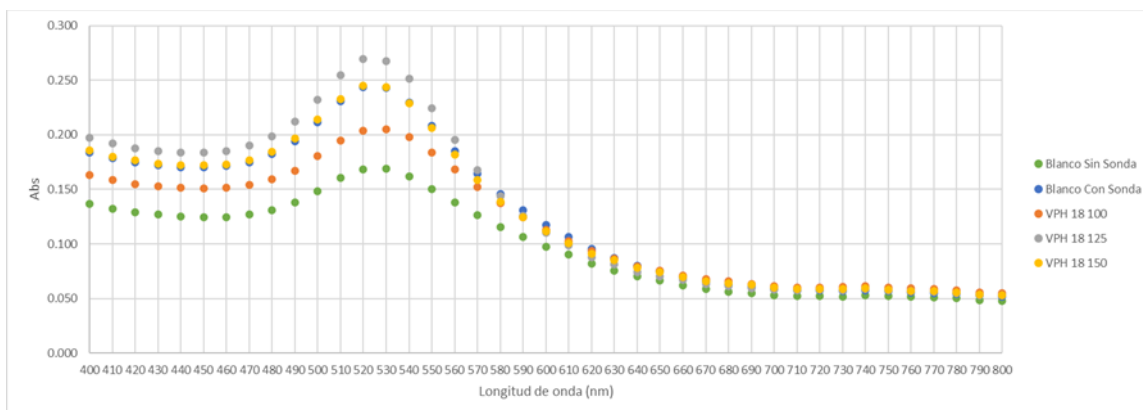


Figura 30. AuNPs con muestra de VPH 18 resuspendidas en buffer salino

En la figura 31 se presenta el comportamiento de las muestras de FZD9, donde se ve nuevamente lo que parece ser una disminución de la absorbancia con respecto al aumento de la concentración de ADN. Esto se puede deber por el ADN presente en la solución que está interfiriendo con la lectura o también, de un acoplamiento entre sonda y ADN, pero no necesariamente la sonda estando acoplada con las AuNPs.

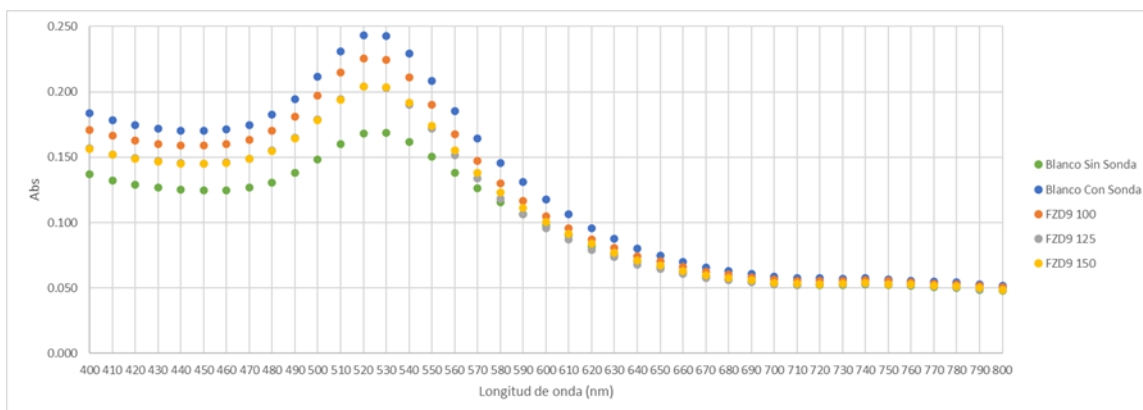


Figura 31. AuNPs con muestra de FZD9 resuspendidas en buffer salino

Se presenta la figura 32 donde se observa el resultado de la resuspensión en las muestras. Todas se ven aún más tenues que las no centrifugadas, a excepción del VPH 18, donde una de las muestras presenta un oscurecimiento. Esto se puede deber a la manipulación que se tuvo de las muestras.

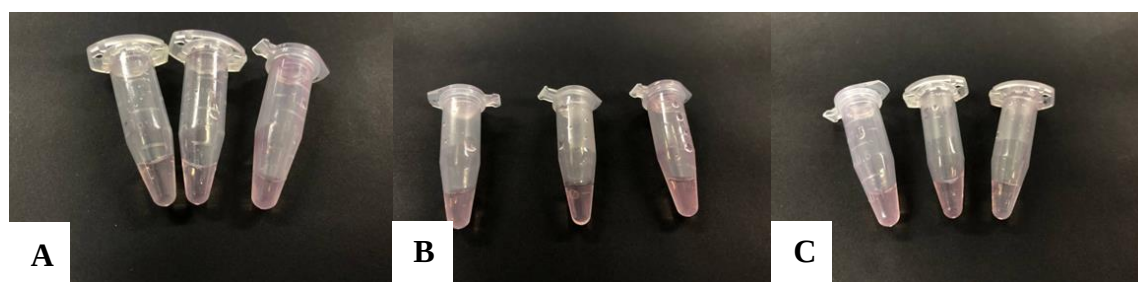


Figura 32. AuNPs con VPH 16 (A), 18 (B) y FZD9 (C) a 125 pg/mL resuspendidas

Aunque no se presentó un desplazamiento significativo de algún barrido con respecto a los blancos, sí se observaron leves respuestas cuando se trabajaba con las muestras de VPH 18 y 16, corroborando que las sondas utilizadas sí son afines a estas. Hay un gran impacto con respecto al volumen a utilizar cuando se trabaja con ADN que no se encuentra purificado, por lo que es necesario realizar con la mayor delicadeza la purificación. El aumento de las concentraciones de ADN disminuye la absorbancia de la muestra analizada lo que se puede deber a una interferencia del ADN con las AuNPs y no necesariamente a un acoplamiento. Además, En todos los análisis se presentaba el mismo comportamiento a la longitud de onda de 200 a 280 nm, sin importar concentraciones o muestra, esto puede ser una característica de las AuNPs o el buffer salino que se le añadió.

Al realizar la centrifugación, se suele precipitar algunas AuNPs disminuyendo la absorbancia con respecto a los blancos, aunque las gráficas obtenidas a partir de la resuspensión eran más claras que los datos obtenidos a partir de las AuNPs no resuspendidas. También se puede verificar de manera visual el acoplamiento de las AuNPs con el ADN, en esta experimentación no se pudo observar con claridad un cambio de color, a excepción de cuando se centrifugaban las nanopartículas. Por lo que, si se observó una precipitación de estas, pero fue inducida y no debido al acoplamiento.

Se propone realizar una centrifugación antes de añadir el ADN, con el propósito de aumentar el acoplado de AuNPs con sonda, y así disminuir las sondas no acopladas con las AuNPs. También se propone disminuir las concentraciones de muestra para observar su comportamiento y así encontrar la concentración mínima necesaria para obtener una respuesta. Además, en las próximas corridas se utilizarán nuevas AuNPs, por lo que se

compararán resultados de los barridos al igual que los resultados visuales y así descartar que las AuNPs utilizadas durante esta experimentación fueron funcionalizadas de manera incorrecta.

1.7 Bibliografía y otros recursos

- [1] G. d. México, «Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino,» Gobierno de México, 08 Septiembre 2015. [En línea]. Available: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica#:~:text=Anualmente%20se%20estima%20una%20ocurrencia,35.4%20casos%20por%20100%20C000%20mujeres.&text=El%20c%C3%A1ncer%20del%20cuello%20uterino%20es%20la%20segunda%20causa%20de,23.3%20caso.> [Último acceso: 30 Septiembre 2022].
- [2] A. Colqui, «COESIDA,» Gobierno del Estado de Jalisco, 2016. [En línea]. Available: coesida.jalisco.gob.mx/vih-e-its/prevencion-del-its/virus-del-papiloma-humano. [Último acceso: 28 Septiembre 2022].
- [3] S. d. Salud, «Virus del Papiloma HUmano o papilomavirus,» Gobierno de México, 2015. [En línea]. Available: <https://www.gob.mx/salud/articulos/virus-del-papiloma-humano-vph-o-papilomavirus>. [Último acceso: 28 Septiembre 2022].
- [4] S. d. Salud, «El cáncer Cericouterino es una enfermedad prevenible y curable,» Secretaría de Salud, 2021. [En línea]. Available: <https://ssj.jalisco.gob.mx/prensa/noticia/10075>. [Último acceso: 28 Septiembre 2022].
- [5] D. Minakshi, K. H. Shim, S. A. Seong y K. Y. Dong, «Review on gold nanoparticles and their applications,» *Toxicology and Environmental Health Sciences*, vol. 3, pp. 193-205, 2011.
- [6] L. Biwu y L. Juewen, «Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry,» *Analytical Methods*, vol. IX, pp. 2633-2643, 2017.
- [7] Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente, «Portal ITESO,» 2022. [En línea]. Available: https://iteso.mx/web/general/detalle?group_id=49094. [Último acceso: 30 septiembre 2022].
- [8] Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente, «Comunicación Oficial,» Orientaciones fundamentales del ITESO, 10 febrero 2003. [En línea]. Available: <https://www.iteso.mx/documents/2624322/0/Orientaciones+fundamentales+del+ITESO.pdf/4831d49f-7335-47f7-8cdd-d5df274b74e8>. [Último acceso: 30 septiembre 2022].
- [9] S. Vázquez-Vega, K. Juárez-González, V. Paredes-Cervantes, M. Martínez-Salazar, S. Gordillo-Rodríguez, C. Vera-Arzave, M. Martínez-Meraz, P. Sánchez-Suárez y 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, nº 3, 2021.
- [10] B. Sandoval, «Forbes México,» 20 agosto 2021. [En línea]. Available: [https://www.forbes.com.mx/el-costo-economico-y-emocional-de-contraer-el-virus-de-papiloma-humano/#:~:text=Su%20costo%20es%20de%20entre%20\\$2,000%20y%20\\$3,000.&text=El%20PCR%20nos%20permite%20saber%20qué%20tipo%20de%20VPH%20se%20porta.](https://www.forbes.com.mx/el-costo-economico-y-emocional-de-contraer-el-virus-de-papiloma-humano/#:~:text=Su%20costo%20es%20de%20entre%20$2,000%20y%20$3,000.&text=El%20PCR%20nos%20permite%20saber%20qué%20tipo%20de%20VPH%20se%20porta.) . [Último acceso: 30 septiembre 2022].
- [11] Secretaría de Salubridad y Asistencia, «Secretaría de Salud,» 25 marzo 2022. [En línea]. Available: <https://www.salud.cdmx.gob.mx/boletines/25mar2022-realizo-sedesa-114-mil-331-tamizajes-para-detectar-vph-ar-humano-que-provoca-cancer>. [Último acceso: 30 septiembre 2022].
- [12] A. M. Content, «El VPH y las pruebas del VPH,» American Cancer Society, 2020. [En línea]. Available: https://www.cancer.org/es/saludable/causas-del-cancer/agentes-infecciosos/vph/vph-y-pruebas-para-vph.html#escrito_por. [Último acceso: 2022].
- [13] MedlinePlus, «Prueba del Virus del papiloma humano,» MedlinePlus, [En línea]. Available: <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/prueba-del-virus-del-papiloma-humano-vph/>. [Último acceso: 28 Septiembre 2022].
- [14] G. Z y A. Rodríguez, «Métodos utilizados en la identificación del virus de papiloma humano,» *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 2010. [En línea]. Available: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272010000100008&lng=es&tlng=es.. [Último acceso: 30 Septiembre 2022].
- [15] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne y M. K. Danquah, «Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations", Beilstein Journal of Nanotechnology,» *Journal of Nanotechnology*, pp. 1050-1074, 2018.
- [16] M. K. S. G. R. Rudramurthy, «Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: an update,» *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 23, nº 8, pp. 1185-1204, 2018.
- [17] L. Jin-Ho, K. Byung-Chan, O. Byung-Keun y C. Jeong-Woo, «Highly sensitive localized surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of HIV-1,» Elsevier, 2013. [En línea]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23506952/>. [Último acceso: 2022].
- [18] D. Minakshi, S. Kyu Hwan, A. A. Seong Soo y Y. Dong Kee, «Review on gold nanoparticles and their applications,» *Toxicology and Environmental Health Sciences*, vol. 3, pp. 193-205, 2011.
- [19] R. González Antón, «Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con 1-dodecanotiol en un sistema bifásico,» *Universidad de Valladolid*, pp. 1-176, 2016.
- [20] D. A. Cruz, M. C. Rodríguez, J. M. López, V. M. Herrera, A. G. Orive y A. H. Creus, «Nanopartículas Metálicas y Plasmones de Superficie: Una Relación Profunda,» *Avances en Ciencias e Ingeniería*, vol. 3, nº 2, pp. 67-78, 2012.

- [21] A. M. Ihsan y F. J. Al-Gawhari, «Gold Nanoparticle: Synthesis, Functionalization, Enhancement, Drug Delivery and Therapy: A Review,» *A multifaceted review*, vol. 11, nº 6, pp. 888-910, 2020.
- [22] J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin y R. L. Letsinger, «One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 9, pp. 1959-1964, 1998.
- [23] L. J. A., «Nanopartículas de oro para biosensado colorimétrico de ácidos nucleicos. Sistemas, aplicaciones y perspectivas de futuro,» Julio 2020. [En línea]. Available: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/151253/L%20c3%b3pez%20%20Nanopart%20c3%adculas%20de%20oro%20para%20biosensado%20colorim%20c3%a9trico%20de%20%20c3%a1cidos%20nucleicos.%20Sistemas%20c2%20aplicaciones%20y%20perspectivas%20de%20futuro.pdf?sequence=3&isAll>. [Último acceso: 12 Noviembre 2022].
- [24] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic y J. J. Storhoff, «A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials,» *Nature*, vol. 382, pp. 607-609, 1996.
- [25] L. J. Castro-Muñoz, J. Manzo-Merino y J. O. Muñoz-Bello, «The Human Papillomavirus (HPV) E1 protein regulates the expression of cellular genes involved in immune response.,» *Scientific Reports*, vol. 9, 2019.
- [26] F. M. Sverdrup, L. C. Sheahan y S. A. Khan, «Development of human papillomavirus plasmids capable of episomal replication in human cell lines,» *Gene Therapy*, vol. 6, pp. 1371-1321, 1999.
- [27] A. Harari, Z. Chen y R. D. Burk, «Human Papillomavirus Genomics: Past, Present and Future,» *Karger*, vol. 45, pp. 1-18, 2014.
- [28] A. Nagar y M. Hashler, «Fast discovery and visualization of conserved regions in DNA sequences using quasi-alignment,» *BMC Bioinformatics*, vol. 14, 2013.
- [29] G. Z. Lelo de Larrea, F. M. Molina, C. F. Ferreyra, J. Á. Morales, M. L. Rivas y G. Malagón, «Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano,» *Elsevier*, vol. 10, nº 5, pp. 288-294, 2011.
- [30] S.-H. Chen, K.-I. Lin, T. Chuan-Yi, Sheng-Lung, C. Yao-Chen, L. Yi-Rou, W. Jui-Ping y L. Chih-Sheng, «Optical detection of human papillomavirus type 16 and type 18 by sequence sandwich hybridization with oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles,» *IEEE Trans Nanobioscience*, vol. 8, nº 2, pp. 120-131, 2009.
- [31] Secretaría de Salubridad y Asistencia, «Secretaría de Salud,» 25 marzo 2022. [En línea]. Available: <https://www.salud.cdmx.gob.mx/boletines/25mar2022-realizo-sedesa-114-mil-331-tamizajes-para-detectar-vph-ar-humano-que-provoca-cancer>. [Último acceso: 30 septiembre 2022].
- [32] N. Bloise, A. Massironi, C. Pina, J. Alongi, S. Siciliani, Á. Manfredi, M. Biggiogera, M. Rossi, P. Ferruti, E. Ranucci y L. Visai, «Extra-Small Gold Nanospheres Decorated With a Thiol Functionalized Biodegradable and Biocompatible Linear Polyamidoamine as Nanovectors of Anticancer Molecules,» *Functionalized Nanocarriers for Theranostics*, 2020.

2. Productos

Tabla 7. Ficha descriptiva de los Análisis de Barrido

Nombre y código del PAP	4D08 Desarrollo tecnológico para la sustentabilidad ambiental, energética y alimentaria I
Nombre del proyecto	Pruebas in vitro de respuesta plasmónica en nanopartículas de oro en el Parque Tecnológico del ITESO
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Gráficas e imágenes de los barridos a 400-800 nm de las muestras obtenidas a partir de espectrofotometría, con el propósito de observar el comportamiento de las gráficas y compararlas con las fotos de las muestras.
Autores:	Alejandro Becerra Zendejas y Natalia Ramírez Zermeño

Tabla 8. Ficha descriptiva de los Datos Crudos

Nombre y código del PAP	4D08 Desarrollo tecnológico para la sustentabilidad ambiental, energética y alimentaria I
Nombre del proyecto	Pruebas in vitro de respuesta plasmónica en nanopartículas de oro en el Parque Tecnológico del ITESO
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Recopilación de los datos capturados durante el semestre otoño 2022, al igual que los promedios de todos los días, de esta manera se tiene una mejor organización de la información.
Autores:	Alejandro Becerra Zendejas y Natalia Ramírez Zermeño

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

El impacto que este proyecto puede tener es bastante amplio, y durante todo mi proceso en el PAP me topaba con nuevas ideas al respecto. La primera de ellas siendo el potencial que tiene en el área médica, no solo como biosensor para VPH, si no como biosensor para VIH o también me he topado con investigación que intentan realizar biosensores de cáncer a partir de AuNPs. Siendo muy importante la detección en etapa temprana en este tipo de enfermedades, para poder generar el mejor resultado posible. Otro aspecto importante que también paso por mi mente al estar realizando el PAP, es la gran cantidad de desechos que se podrían estar generando al final de este proyecto, ya que se espera tener como resultado final un dispositivo desechable donde se utilice una pequeña cantidad de muestra y AuNPs para obtener un resultado visual, esto al ser un dispositivo con posibles muestras infectadas se tiene que desechar, por lo que también podría ocasionar un impacto ambiental. Por último, aunque la detección del VPH suele ser enfocada en mujeres porque tiene la posibilidad de generar cáncer cérvico uterino, también los hombres pueden ser hospederos de este virus y pasarlo a las mujeres, es importante también tener en cuenta el potencial que tiene la detección de este virus por igual, y no solo en este aspecto, si no en muchos otros aspectos relacionados al área de salud donde la mujer es la que usualmente tiene que pasar por métodos más complicados, tal es el caso de los métodos anticonceptivos, como lo son las pastillas hormonales o el DIU.

3.2 Aprendizajes logrados

Siempre estuve seguro de las capacidades que tengo, pero el haberme adentrado a un área en la que no tenía experiencia en ningún sentido, además de haber estado por lo menos 6 meses sin experiencia en el laboratorio ya que estuve en el extranjero, me hizo dudar de algunas acciones y decisiones que tomaba durante este proyecto. Agradezco mucho que al final no estuviera realizando toda la parte experimental de manera individual, ya que de haber sido así, no hubiera podido realizar la misma calidad de trabajo.

Me gustaría mencionar también que no tiene nada de malo pedir ayuda aun cuando es algo muy sencillo, saber que hay personas que tienen más experiencia que uno y por ende pueden dar mejores respuestas o explicar algo que en su momento me costaba trabajo entender o hacer. Pude volver a retomar ciertos temas que ya había olvidado, como es el caso de trabajar con ADN, realizar electroforesis, purificaciones (que nunca antes había tenido la oportunidad de hacerlo solo) y cuantificación, además de todos los pasos que realicé para funcionalizar y añadir el ADN a las AuNPs. Agradezco mucho la oportunidad que tuve, aun trabajando solo y de poder sobresalir y nunca rendirme, incluso cuando sentía que las cosas iban para mal.

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

Los comentarios escritos en diferente color, corresponden a las competencias final (salida al PAP).

Categorizar los elementos, si es un conocimiento, una habilidad, una actitud,	Competencia		Evidencia	Relevancia/Fortaleza*
	Conocimientos	Electroforesis	Realicé varios geles al igual que la inserción de DNA en ellos.	Puedo confirmar si la muestra de ADN recibida se encuentra en buen estado o hay alguna mutación. Reconocer dímeros además de ahora tener más experiencia.
		Cuantificación	Experimenté en algunas prácticas de laboratorio.	Puedo confirmar la cantidad de ADN que se encuentra en la muestra proporcionada. Entender la ecuación con la que se trabaja, sus elementos y recordar los pasos.
		Termograma de PCR	Diseñé en evaluaciones y en prácticas de laboratorio.	Puedo realizar un diseño para insertar/eliminar alguna sección de ADN.

		Bioinformática	Tuve una clase al respecto al igual que una evaluación.	Puedo investigar las proteínas o metabolismos que se encuentran en la muestra de estudio.
		Quorum Sensing	Leí artículos además de tomar clases al respecto.	Puedo entender el comportamiento de los microorganismos y ayudar a proponer ideas si esto ocasiona algún problema.
		Secuenciación de genes	Realice prácticas y actividades al respecto.	Puedo conocer el gen con el que se está trabajando y de esta manera proponer primers.
		Purificación	Durante el PAP realicé 2 purificaciones	Ahora tengo más confianza al realizarlo
		Utilizar el espectrofotómetro	Estuve realizando los análisis con el espectrofotómetro	Puedo utilizarlo sin la necesidad de una retroalimentación, además de trabajarlo desde un ordenador .
	Habilidades	Experiencia con Snapgene, Kegg, entre otros	Realicé actividades y tomé clases al respecto	Puedo investigar con facilidad las secciones de un gen al igual que los diferentes metabolismos de un organismo.
		Conocimientos básicos de Softberry y STRING.	Participé en una competencia donde se pusieron a prueba estos conocimientos.	Puedo investigar acerca de las proteínas y promotores que tiene un gen.
		Práctica en la realización de procesos simulados con SuperPro.	Mis conocimientos fueron evaluados por un experto en el tema, por	Puedo realizar una simulación de un proceso de escala piloto a una escala mayor.

			medio de un proyecto.	
		Entendimiento en la realización de geles de agar e inserción de ADN	Realicé en repetidas ocasiones estas técnicas durante mis prácticas de laboratorio.	Puedo realizar geles de agar con facilidad al igual que la inserción de ADN
		Pipetear de manera correcta y tener cuidado con las puntas	Realicé una gran cantidad de muestras de AuNPs (Aprox. 150)	Ahora se me facilita ordenar los eppendorf en la gradilla para evitar confusiones, además de ser más delicado al momento de pipetear.
	Actitudes	Solución de problemas bajo presión	Participé en competencias donde tenía un tiempo determinado para realizar una actividad.	Puedo trabajar con fluidez aun en circunstancias agitadas. Aun bajo presión entregar resultados, y también solucionar problemas que se me presentan en el momento.
		Entusiasmo e interés por aprender	Estuve desde mi niñez aprendiendo nuevas habilidades ya sean musicales, deportivas o educacionales.	Puedo encontrar el atractivo en nuevas cosas, aun en cosas que no estoy familiarizado
		Disposición para investigar nuevos conceptos o información	Trabajé en actividades de la universidad donde era necesario investigar más a fondo sobre un tema para encontrar la solución de un problema.	Puedo indagar por internet para informarme de una mejor manera, o también comunicarme con algún contacto para que me apoye.

		Apoyo y buen trato a compañeros de trabajo	Ayude a mis compañeros de equipo cuando me lo pedían ya sea para explicar o dar mi opinión al respecto	Puedo trabajar con facilidad con otros compañeros y auxiliarlos de ser necesario. Aunque no estaba inscrita al PAP, fue favorable el trabajo en equipo con mi compañera.
		Buena comunicación en el equipo de trabajo	Notifiqué a la persona encargada al igual que a mi equipo los problemas que se llegaron a mostrar durante una actividad	Puedo hacer saber de lo que se ha realizado en el trabajo y si es necesario pedir ayuda.
		Trabajar individualmente	Durante gran parte del PAP estuve trabajando por mi cuenta	Confió más en mí mismo, aprendo de mis errores y me doy mérito al realizar correctamente el trabajo.
		Aprender a pedir ayuda	Varias veces durante el PAP sentí que pegaba con la pared y no sabía cómo seguir adelante, pero reconocí que había gente que me apoyaba.	Reconozco que uno solo no puede realizar todo, y que hay otras personas que tienen más experiencia que están dispuestas a ayudarme.

Puedo percibir la diferencia en los conocimientos que tenía antes y después de terminar el PAP, además de la confianza que ahora me tengo a mi mismo y el potencial que veo en mí. Además, quiero reconocer que la genética me atrae mucho y por lo mismo decidí quedarme en el proyecto para ver cómo este puede llegar a evolucionar. Aunque siempre hay cosas que se pueden mejorar, estoy más que satisfecho por lo que pude aprender, crecer y mejorar como estudiante y también como persona, ya sea fuera y dentro del PAP.