



Acta de Correcciones al Proyecto de Grado Ingeniería Biomédica

Fecha: 23 de julio del 2024

Autores: Juan José López Abella y María Paula Valencia Piedrahita

Nombre del Proyecto de Grado: Desarrollo de una prueba de flujo lateral con nanopartículas de oro conjugadas para la detección selectiva de variantes de alto riesgo del Virus del Papiloma Humano (VPH)

Director: Andrés Jaramillo Botero

Como indica el artículo 2.27 de las Directrices de Trabajo de Grado, he verificado que los estudiantes indicados arriba han implementado todas las correcciones que los Jurados del Proyecto de Grado definieron que se efectuaran, como consta en el Acta de Calificación correspondiente.

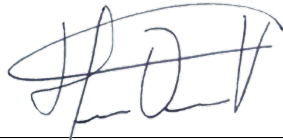
Firma de Director(a) del Proyecto de Grado

Nota de Aceptación

Aprobado por el Comité de Trabajo de Grado en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Pontificia Universidad Javeriana para optar al título de Ingeniero Biomédico.

Camilo Rocha

Dr. Hernán Camilo Rocha Niño
Decano Facultad de Ingeniería y Ciencias



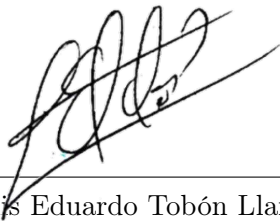
Dr. Hernán Darío Vargas Cardona
Director Carrera Ingeniería Biomédica



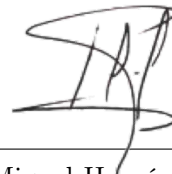
Dr. Andrés Jaramillo Botero
Director Trabajo de Grado



Dr. Carlos Enrique Navarro Chica
Co-Director Trabajo de Grado



Dr. Luis Eduardo Tobón Llano
Jurado 1



Dr. Pedro Miguel Hernández Acosta
Jurado 2



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Cali

**Facultad de Ingeniería
y Ciencias**

Ingeniería Biomédica

TRABAJO DE GRADO

Desarrollo de una prueba de flujo lateral con
nanopartículas de oro conjugadas para la detección
selectiva de variantes de alto riesgo del Virus del
Papiloma Humano (VPH)

Juan José López Abella
Maria Paula Valencia Piedrahita

Director

Dr. Andrés Jaramillo Botero

Codirector

Dr. Carlos Enrique Navarro Chica

23 de julio de 2024

Santiago de Cali, 22 de junio de 2024

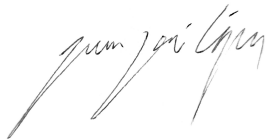
Señores
Pontificia Universidad Javeriana – Cali
Dr. Hernán Camilo Rocha Niño
Decano
Facultad de Ingeniería y Ciencias
Ciudad

Cordial Saludo.

Por medio de la presente nos permitimos presentarle el Trabajo de Grado titulado “Desarrollo de una prueba de flujo lateral con nanopartículas de oro conjugadas para la detección selectiva de variantes de alto riesgo del Virus del Papiloma Humano (VPH)”.

Esperamos que este trabajo reúna todos los requisitos académicos, cumpla el propósito para el cual fue creado y sirva de apoyo para futuros proyectos relacionados con la materia.

Atentamente,



Juan José López Abella



Maria Paula Valencia Piedrahita

Santiago de Cali, 22 de junio de 2024

Señores

Pontificia Universidad Javeriana – Cali

Dr. Hernán Camilo Rocha Niño

Decano

Facultad de Ingeniería y Ciencias

Ciudad

Cordial Saludo.

Certificamos que el presente Trabajo de Grado titulado “Desarrollo de una prueba de flujo lateral con nanopartículas de oro conjugadas para la detección selectiva de variantes de alto riesgo del Virus del Papiloma Humano (VPH)”, realizado por Juan José López Abella y Maria Paula Valencia Piedrahita, estudiantes de Ingeniería Biomédica, se encuentra terminado y puede ser presentado para su sustentación.

Atentamente,



Dr. Andrés Jaramillo Botero
Director Trabajo de Grado



Dr. Carlos Enrique Navarro Chica
Co-Director Trabajo de Grado

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro profundo agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la culminación de este trabajo de grado. En primer lugar, extendemos nuestro más sincero reconocimiento a nuestros directores de tesis, el Profesor Andrés Jaramillo y Carlos Navarro, por su orientación experta, paciencia y apoyo continuo a lo largo de este proceso. Sus consejos sabios y motivación constante fueron fundamentales para llevar a cabo esta investigación.

Agradecemos de manera especial a nuestros padres y familiares por su amor incondicional, apoyo emocional y los sacrificios que hicieron para permitirnos perseguir nuestros sueños académicos. Su aliento constante fue una fuente de fortaleza y motivación a lo largo de este camino.

Finalmente, queremos expresar nuestra gratitud hacia la Pontificia Universidad Javeriana Cali y al Instituto iÓMICAS por proporcionarnos las instalaciones y recursos necesarios para llevar a cabo este estudio. Especial reconocimiento al PhD. Erick Hernández y a la MSc. Ana Zuluaga por su invaluable ayuda en la caracterización de AuNPs mediante el uso del microscopio electrónico de barrido.

Este trabajo de grado no habría sido posible sin el esfuerzo conjunto de cada una de estas personas y entidades. Estamos eternamente agradecidos por su apoyo y confianza en nosotros.

Glosario

Símbolos

A	Absorbancia
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
λ	Longitud de onda
nm	Nanómetro
M	Molar
mM	Milimolar
g	Gramo
mg	Miligramo
μg	Microgramo

Acrónimos y Abreviaturas

Ab	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
ARN	Ácido Ribonucleico
AuNPs	Nanopartículas de Oro
CCU	Cáncer de Cuello Uterino
LFA	Lateral Flow Assay (Ensayo de Flujo Lateral)
IVA	Inspección Visual con Ácido Acético
UV-Vis	Espectrofotometría Ultravioleta-Visible
VPH	Virus del Papiloma Humano

Nomenclatura

Au	Oro
CTAB	Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio
HAuCl₄	Ácido Tetracloroáurico
H₃BO₃	Ácido Bórico
HCl	Ácido Clorhídrico
HNO₃	Ácido Nítrico
Na₃C₆H₅O₇	Tri-sodio Citrato Dihidratado
PBS	Tampón fosfato salino

Términos

ADN Es la molécula compuesta por 2 cadenas enrolladas entre sí debido a las interacciones que se forman entre las bases nitrogenadas complementarias Adenina (A) con Timina (T) y Citosina (C) con Guanina (G), que codifican información genética para el desarrollo y funcionamiento de un organismo [1].

Almohadilla Absorbente La almohadilla de absorción o absorbente es uno de los componentes de los dispositivos de ensayo de flujo lateral (LFA). Está situada al final del dispositivo y cumple una función de absorber el fluido a través de la membrana y recoger el líquido procesado, permitiendo el uso de volúmenes de muestra más grandes, lo que resulta en una mayor sensibilidad del ensayo [2].

Almohadilla de conjugado La almohadilla de conjugado es la segunda parte del mecanismo del ensayo de flujo lateral, y se compone de fibra de vidrio no tejida y allí se encuentra el agente de detección que ya está seco. En la almohadilla de conjugado, los eventos de unión ocurren debido a la presencia de partículas de detección que podrían ser de oro o látex [3].

Membrana de Nitrocelulosa Componente primordial de los dispositivos de LFA, ya que en esta se inmovilizan y retienen los anticuerpos o proteínas utilizados para la detección del ensayo. Esta es una lámina delgada y porosa que tiene alta afinidad por las proteínas y permite el paso de líquidos por capilaridad, facilitando la inmovilización de analitos y la detección precisa de resultados [2].

Almohadilla de muestra Componente inicial en los ensayos de flujo lateral, esta es un pequeño trozo de material absorbente, como una membrana o un papel especial, que se coloca al inicio del dispositivo donde se aplica la muestra. Su función principal es distribuir de manera uniforme la muestra y dirigirla hacia la almohadilla de conjugado [2].

Analito Es la sustancia que se busca detectar. Es decir, es el compuesto o molécula que se quiere identificar en el ensayo. El analito se une al conjugado en la almohadilla de conjugado y luego migra hacia la línea de prueba en la membrana de nitrocelulosa, donde se produce la reacción de captura con los anticuerpos inmovilizados [4].

Antígenos Sustancia que provoca una respuesta inmunitaria que es ajena a un organismo. Los antígenos incluyen toxinas, sustancias químicas, bacterias o virus, además pueden usar como marcadores en pruebas de laboratorio para identificar esos tejidos o células [5].

Aparato Reproductor Femenino Conjunto de tejidos, glándulas y órganos que participan en la procreación, incluye: los ovarios, las trompas de Falopio, el útero, el cuello uterino y la vagina [6].

ARN Es una molécula similar al ADN con la diferencia de que está formado por una única cadena. Una molécula de ARN tiene un eje formado por grupos fosfato alternantes y el azúcar ribosa, donde se encuentran una de las cuatro bases nitrogenadas: Adenina (A), Uracilo (U),

Citosina (C) o Guanina (G) [7]. Una célula puede elaborar diferentes formas de ARN, y en determinados virus este reemplaza al ADN como su material genético [8].

Capacidad Oncogénica Capacidad de ciertas células, virus o agentes químicos de establecer la formación de tumores en un organismo. Esto implica la capacidad de causar transformaciones celulares que conducen a la proliferación descontrolada y la formación de masas tumorales [9].

Detección Temprana Serie de actividades dirigidas a identificar de manera prematura nuevos casos de una enfermedad, con el fin de brindar tratamiento oportuno y obtener una mayor probabilidad de curación [10].

Epítopo Zona específica de la superficie de un antígeno que interactúa con anticuerpos específicos a los cuales se une [11].

Gen p53 Gen que da origen a una proteína con función importante en el control de la división y destrucción de las células. Es un tipo de gen supresor de tumores [12].

Infección de Transmisión Sexual Enfermedad causada por ciertas bacterias, virus u otros microorganismos, que se transmite de una persona a otra a través de la sangre, semen, secreciones vaginales u otros líquidos corporales durante el sexo oral, anal o genital con un compañero infectado [13].

Neoplasia Masa anormal de tejido que aparece cuando las células se multiplican más de lo debido o no se mueren cuando deberían. Pueden ser benignas o malignas (cancerosas) [14].

Oncogén Gen que contiene el potencial de hacer que una célula normal se vuelva cancerosa [15].

Oncoproteína Proteína codificada por un oncogén que se ha integrado en el genoma de una célula eucariota participando en la regulación o síntesis de proteínas ligadas al crecimiento de células cancerosas [16].

Tamización Mecanismo de detección temprana que consiste en la aplicación de pruebas diagnósticas a un grupo de personas sanas con factores de riesgo en común para el padecimiento de una enfermedad [10].

Test de Papanicolau Es una prueba médica que se utiliza para detectar células anormales en el cuello uterino de las mujeres. La prueba se realiza tomando una muestra de células del cuello uterino y examinándolas bajo un microscopio para detectar la presencia de células anormales o cambios precancerosos [17].

Virus Microorganismo infeccioso que consta de un segmento de ácido nucleico (ADN o ARN) rodeado por una cubierta proteica o lipídica denominada cápside. Este se replica al infectar otras células (célula huésped) y usar sus componentes para fabricar copias de sí mismo [18].

Virión Forma extracelular completa e infecciosa de un virus. Unidad fundamental de transmisión viral, que permite la propagación de infecciones virales de una célula huésped a otra y entre organismos [19].

NIC3 Afección precancerosa del cuello uterino que se caracteriza por cambios celulares graves y anormales, aunque no todas las lesiones evolucionarán a cáncer cervicouterino. Es considerada una lesión de alto grado y se asocia con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino [20].

Resumen

El cáncer cervicouterino (CCU) es una preocupación de salud global, especialmente en América Latina, donde sus tasas de mortalidad son elevadas. En Colombia, representa la principal causa de muerte para mujeres entre los 30 y 59 años de edad. El virus del papiloma humano (VPH), particularmente las variantes VPH16 y VPH18, son responsables de la gran mayoría de los casos de cáncer cervical, vulvar, vaginal anal y orofaríngeo en mujeres. A pesar de su importancia, solo el 23.2% de las mujeres en Colombia se han sometido a pruebas de detección del VPH en los últimos cinco años, principalmente debido a la falta de acceso a las mismas, especialmente en áreas rurales y de bajos recursos económicos. Esto evidencia la necesidad de tecnologías de detección innovadoras y asequibles para mejorar el diagnóstico temprano y la prevención de este cáncer. En este documento se describe el desarrollo y la validación de una prueba de flujo lateral competitiva para la detección selectiva de las variantes de alto riesgo, VPH16 y VPH18, utilizando nanopartículas de oro (AuNPs) funcionalizadas con anticuerpos monoclonales para dichas variantes.

Palabras Clave: Cáncer Cervicouterino, Virus del Papiloma Humano (VPH), VPH16, VPH18, Tecnologías de Detección, Nanopartículas de Oro (AuNPs), Prueba de Flujo Lateral.

Abstract

Cervical cancer (CCU) is a global health concern, especially in Latin America, where its mortality rates are high. In Colombia, it represents the main cause of death for women between 30 and 59 years of age. Human papillomavirus (HPV), particularly the HPV16 and HPV18 variants, are responsible for the vast majority of cases of cervical, vulvar, vaginal, anal, and oropharyngeal cancers in women. Despite its importance, only 23.2% of women in Colombia have undergone HPV testing in the last five years, mainly due to lack of access to them, especially in rural and low-income areas. This highlights the need for innovative and affordable detection technologies to improve early diagnosis and prevention of this cancer. This document describes the development and validation of a competitive lateral flow test for the selective detection of high-risk variants, HPV16 and HPV18, using gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with monoclonal antibodies for these variants.

Keywords: Cervical Cancer, Human papillomavirus (HPV), HPV16, HPV18, Screening tests, Gold Nanoparticles (AuNPs), Lateral Flow Assay (LFA).

Índice general

1. Introducción	1
2. Planteamiento del Problema	3
2.1. Formulación	4
2.2. Sistematización	4
3. Justificación	7
4. Objetivos	9
4.1. Objetivo General	9
4.2. Objetivos Específicos	9
5. Marco de Referencia	11
5.1. Áreas Temáticas	11
5.2. Marco Teórico	11
5.2.1. Diseño Experimental	11
5.2.2. VPH	13
5.2.3. Prueba de Flujo Lateral	36
5.3. Trabajos Relacionados	38
6. Materiales y Métodos	43
6.1. Materiales y reactivos	43
6.1.1. Materiales Generales	43
6.1.2. Reactivos	43
6.1.3. Equipos e Instrumentación	44
6.2. Desarrollo Experimental	44
6.2.1. Síntesis de AuNPs	44
6.2.2. Funcionalización AuNPs	45
6.2.3. Caracterización AuNPs	46
6.2.4. Caracterización del Proceso de funcionalización y detección	46
6.2.5. Ensayo Flujo Lateral	46
6.2.6. Análisis Estadístico	48
6.2.7. Proceso general para la elaboración del dispositivo de flujo lateral	48
7. Resultados y Discusión	51
7.1. Síntesis de AuNPs haciendo uso de la metodología de superficie de respuesta	51
7.2. Funcionalización de AuNPs – Nanobiosensor colorimétrico	56
7.3. Ensayos Flujo Lateral	62

7.3.1. Determinación de sensibilidad del dispositivo de flujo lateral	64
7.3.2. Determinación de selectividad del dispositivo de flujo lateral	66
8. Conclusiones	69
9. Trabajos futuros	71
Bibliografía	73

Índice de figuras

5.1. Ejemplificación niveles y tratamientos de un diseño experimental. Diseño experimental para verificar influencia de los factores de temperatura y velocidad, cada uno a 2 niveles, donde se realizan 4 tratamientos en la combinación de niveles requerida. (Fuente: [21])	12
5.2. Ejemplificación metodología de superficie de respuesta.	13
5.3. Estructura del genoma viral del VH16 (Fuente: [22])	14
5.4. Estructura de los papilomavirus.	15
5.5. Estructura terciaria de L1. (B-I) señalan las láminas β . (h1-h5) señalan las hélices α . (B-C, C-D, D-E, F-G, H-I) representan los lazos interlaminares. (C) representan los extremos C-terminal. (N) representan N-terminal (Fuente: [23]).	16
5.6. Proceso natural de infección del VPH y asociación con cáncer. (Fuente: [22])	18
5.7. Proceso regulación del ciclo celular. A) Célula epitelial no infectada. B) Célula epitelial infectada por VPH (Fuente: [9]).	19
5.8. Algoritmo de programa de vigilancia epidemiológica (Fuente: [22]).	20
5.9. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Fuente: [24]).	23
5.10. Toma de muestra para la detección de ADN de alto riesgo del VPH. La muestra se toma de la misma manera en que se toma para la prueba de Papanicolaou haciendo uso de un cepillo para extraer células del cuello uterino (Fuente: [25]).	24
5.11. Fotografías de epitelio cervical con reacción de hibridación positiva para: A. ADN de VPH tipo 6, B. ADN de VPH tipo 11 (Fuente: [26]).	25
5.12. Esquema para la reacción de detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos en la técnica Cervista HPV HR y Cervista HPV 16/18 (Fuente: [26]).	26
5.13. Pasos para la detección de VPH con prueba Aptima HPV (Fuente: [27])	27
5.14. Esquema ilustrativo de una citología cervicouterina (Fuente: [10]).	28
5.15. Esquema ilustrativo de una coloscopia (Fuente: [28]).	29
5.16. Fotografías de tejido de tinción con ácido acético para inspección visual (Fuente: [28]).	29
5.17. Operación y componentes típicos de un biosensor. A) El bioreceptor reconoce el analito y envía la señal de reconocimiento. B) El analito no corresponde al determinado por el bioreceptor, no se reconoce y no se envía señal (Fuente: [29]).	30
5.18. Clasificación de Biosensores	31
5.19. Estructura de un Anticuerpo. Estructura en Y: regiones Fab conformadas por cadena VL y VH. Base conformada por cadenas VH. (Fuente: [30]).	32
5.20. Principio detección biosensor con anticuerpo. Biosensor conformado por anticuerpos detectan los antígenos correspondientes, lo que envía la señal de reconocimiento (Fuente: [29]).	32
5.21. Resonancia del Plasmón de Superficie en AuNPs a) Luz incidente en la nanopartícula; b) campo eléctrico en el tiempo; c) nube electrónica en interacción (Fuente: [31]).	35

5.22. Esquema del proceso de síntesis nanopartículas de oro. El citrato de sodio y los iones de sodio entran en una reacción Redox, donde el citrato de sodio recude al oro con valencia +3 a átomos de valencia 0, esto permite la creación de semillas de oro y finalmente la formación de nanopartículas (Fuente: [32]).	36
5.23. Esquema estructural de una prueba de flujo lateral (Fuente: [33]).	37
6.1. Síntesis de AuNPs por método inverso.	45
6.2. Esquema ensayo de flujo lateral por método competitivo.	47
6.3. Esquema proceso de preparación almohadilla de conjugado y membrana de nitrocelulosa.(Fuente: [34])	47
6.4. Paso a paso para la obtención del dispositivo de flujo lateral	49
7.1. Gráfica de probabilidad normal de residuos para tamaño.	52
7.2. Gráfica de Residuos vs Orden de Ejecución para tamaño.	52
7.3. Diagrama de pareto para variable de salida.	53
7.4. Ecuación 1: Modelo matemático para el tamaño de las AuNPs según la MSR.	54
7.5. Caracterización de AuNPs por microscopía electrónica de barrido (SEM) (CLARA, TESCAN).	55
7.6. Nanopartículas funcionalizadas vs nanopartículas en presencia de proteína.	56
7.7. Grafica de absorbancia y longitud de onda para AuNPs funcionalizadas con Anti-VPH16-L1 y prueba de detección para proteína VPH16-L1.	57
7.8. Caracterización del tamaño de las AuNPs durante la funcionalización y detección con la proteína VPH16-L1.	58
7.9. Caracterización de la carga de las AuNPs durante la funcionalización y detección con la proteína VPH16-L1.	59
7.10. Caracterización del índice de dispersión de las AuNPs durante la funcionalización y detección con la proteína VPH16-L1.	60
7.11. Grafica de absorbancia y longitud de onda en los distintos pasos de la funcionalización con proteína VPH16-L1.	61
7.12. Experimentos de reconcentración AuNPs para mejorar la percepción cambio de color de la prueba con proteína VPH16-L1.	62
7.13. A) Ensamblaje dispositivo de flujo lateral. De izquierda a derecha: Almohadilla de muestra, almohadilla de conjugado, membrana de nitrocelulosa y almohadilla de absorción B) Carcasa dispositivo final	62
7.14. Dispositivo inicial de flujo lateral para la detección de la proteína VPH18-L1. A) Control negativo del dispositivo de flujo lateral, con señal en línea de prueba (izquierda) y de control (derecha). B) Control negativo del ensayo de flujo lateral con carcasa abierta.	63
7.15. Control negativo dispositivo de flujo lateral. A) Vista frontal. B) Vista lateral.	63
7.16. Control positivo prueba flujo lateral. A) Control positivo para VPH16-L1 B) Control positivo para VPH18-L1.	64

7.17. Prueba de sensibilidad VPH16-L1. A) Muestra sin proteína. B) Muestra a 2 µg/mL. C) Muestra a 3 µg/mL. D) Muestra a 4 µg/mL. E) Muestra a 5 µg/mL. F) Muestra a 8 µg/mL.	65
7.18. Prueba de sensibilidad VPH18-L1. A) Muestra sin proteína. B) Muestra a 2 µg/mL. C) Muestra a 3 µg/mL. D) Muestra a 4 µg/mL. E) Muestra a 5 µg/mL. F) Muestra a 8 µg/mL.	66
7.19. Pruebas de selectividad para dispositivo de flujo lateral de detección VPH16-L1. A) Proteína VPH16-L1. B) Proteína VPH16-E6. C) Proteína VPH16-E7, D) VPH18-E7. E) BSA. F) SARS-CoV-2 SPIKE. G) Proteína VPH18-L1	67
7.20. Pruebas de selectividad para dispositivo de flujo lateral de detección VPH18-L1. A) Proteína VPH18-L1. B) Proteína VPH16-E6. C) Proteína VPH16-E7, D) VPH18-E7. E) BSA. F) SARS-CoV-2 SPIKE. G) Proteína VPH16-L1	68

Índice de cuadros

5.1. Clasificación de los VPH de acuerdo con el riesgo oncogénico y las enfermedades asociadas	17
5.2. Estrategias de prevención de Cáncer Cervicouterino Minsalud.	21
5.3. Clasificación y características de Biosensores con AuNPs	34
7.1. Atributos de diseño experimental de superficie de respuesta.	51
7.2. Tratamientos del diseño experimental de superficie de respuesta.	51
7.3. Análisis de varianza para variable de salida.	53
7.4. Factores y condiciones del experimento	54
7.5. Triplicado de síntesis de AuNPs con condiciones según diseño experimental en el software STATGRAPHICS Centurion XIX.	54
7.6. Síntesis de AuNPs con protocolo establecido.	55
7.7. Caracterización del tamaño de las AuNPs durante la funcionalización y detección con VPH16-L1.	57
7.8. Caracterización de la carga de las AuNPs durante la funcionalización y detección con la proteína VPH16-L1.	59
7.9. Caracterización del índice de dispersión de las AuNPs durante la funcionalización y detección con la proteína VPH16-L1.	60
7.10. Determinación de sensibilidad de prueba de flujo lateral con proteína VPH16-L1.	65
7.11. Determinación de sensibilidad de prueba de flujo lateral con proteína VPH18-L1.	65
7.12. Pruebas de selectividad para dispositivo de flujo lateral de detección VPH16-L1.	67
7.13. Pruebas de selectividad para dispositivo de flujo lateral de detección VPH18-L1.	67

Introducción

El cáncer de cuello uterino (CCU) continúa siendo un desafío significativo para la salud femenina a nivel mundial, especialmente en países con ingresos medios y bajos, donde su incidencia y mortalidad son preocupantemente altas [35]. En naciones como Colombia, a pesar de ser prevenible, el CCU predomina como la principal causa de muerte en mujeres entre 30 y 59 años [36]. Las variantes 16 y 18 del virus del papiloma humano (VPH) son responsables de la mayoría de los casos de CCU y lesiones precancerosas [37]. Sin embargo, las técnicas de tamizaje actuales, como la citología convencional y las pruebas de detección de VPH, enfrentan desafíos en términos de efectividad, accesibilidad y costos asociados. Ante esta problemática, surge la necesidad de desarrollar metodologías más eficaces para la detección temprana del CCU.

Los ensayos de flujo lateral (LFA) son los enfoques más recientemente utilizados para la detección y cuantificación de distintos analitos, incluidos diferentes virus. Los protocolos basados en LFA se han aplicado ampliamente en el monitoreo ambiental, seguridad alimentaria y el diagnóstico temprano de diversas enfermedades debido a su simplicidad, eficiencia y bajo costo [38]. A diferencia de los métodos convencionales, las pruebas de LFA pueden utilizarse fuera de laboratorios de alta tecnología, aplicándose en salas de hospital, clínicas, centros de salud, consultorios médicos e incluso pueden ser utilizados por los mismos pacientes para el autodiagnóstico.

En este contexto, se propone una investigación centrada en la creación de una prueba de flujo lateral basada en el uso de nanopartículas de oro. Esta técnica busca ofrecer una herramienta de detección más accesible, precisa y eficiente, con capacidad para identificar selectivamente variantes de alto riesgo del VPH, como el VPH16 y VPH18. El desarrollo de una prueba de flujo lateral permitiría un paso importante hacia la prevención del CCU. Al proporcionar una alternativa más precisa y accesible a las técnicas de detección actuales, se espera que esta innovación tenga el potencial de no solo mejorar las posibilidades de diagnóstico temprano, sino que también contribuya a reducir la mortalidad asociada al CCU, particularmente en países con sistemas de salud menos desarrollados. Este avance podría significar una transformación significativa en la lucha contra el CCU, beneficiando a las mujeres al brindarles una herramienta efectiva para la detección precoz y el manejo oportuno de esta enfermedad.

En este documento se mostrará la investigación realizada para la obtención de un prototipo de prueba de flujo lateral (LFA), comenzando con el planteamiento del problema, su justificación y los objetivos propuestos. En este, se abordará un marco teórico que destaca las características biomoleculares del VPH, las tecnologías disponibles para su identificación y como es realizado actualmente el tamizaje de CCU. También se abordarán las propiedades de los biosensores, la síntesis de nanopartículas y la aplicación de pruebas de flujo lateral. A partir de esta base teórica, se presentarán los resultados obtenidos en la construcción de la prueba, incluyendo la síntesis de AuNPs,

su funcionalización con los anticuerpos de las variantes VPH16-L1, VPH18-L1 y el protocolo final de ensamblaje de la LFA. Finalmente, se expondrán las conclusiones derivadas del estudio y se señalarán posibles líneas de investigación para el futuro.

Planteamiento del Problema

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la principal causa de muerte, y el cáncer de cuello uterino (CCU) es el cuarto tipo más frecuente en las mujeres alrededor del mundo. Para el 2020, se tenía una incidencia estimada de 604,000 nuevos casos y 342,000 muertes; de las cuales el 90 % tuvieron lugar en países de ingresos medio y bajo [39].

Así mismo, según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la tasa de mortalidad en América Latina y el Caribe es 3 veces más alta que en Norteamérica, y si se continúa con las tendencias actuales, el número de muertes aumentará en un 45 % para el 2030 [35].

En Colombia, el CCU es la principal causa de muerte en mujeres entre 30 y 59 años, aun siendo un cáncer prevenible [36]. De acuerdo con el Ministerio de Salud y Protección Social y la Liga Colombiana Contra el Cáncer, se presentan anualmente 4,742 nuevos casos y de estos, 2.490 muertes; es decir, más de la mitad de las mujeres diagnosticadas, mueren por esta enfermedad [36]. Así mismo, según cifras de la Cuenta de Alto Costo (CAC), al 31 de diciembre de 2022, se reportaron 30.997 casos prevalentes de CCU, representando un incremento del 17 % en proporción a los casos reportados en el año 2021 [40]. Durante el periodo más reciente analizado, comprendido entre el 2 de enero 2021 y el 1 de enero 2022, se presentaron 2.587 nuevos casos, de los cuales 71.4 % de ellos fueron de CCU invasivo, donde el 92 % fueron clasificados en etapas II y III [40]. De esta forma, se pone en evidencia como el diagnóstico tardío representa un reto importante en el sistema de salud colombiano.

A diferencia de otros canceres, el CCU cuenta con un agente causal: el virus del papiloma humano (VPH), del cual existen actualmente alrededor de 200 variantes [37]. De estas variantes, la 16 y 18, son responsables del 70 % de los casos de CCU y de lesiones precancerosas [37]. El VPH se transmite por contacto sexual, y aunque el cuerpo de la mayoría de las mujeres es capaz de combatir la infección, factores de riesgo como fumar, dieta inadecuada, defensas bajas, ingesta de pastillas anticonceptivas por un tiempo prolongado, múltiples gestaciones o infección por VIH, usualmente conducen a la generación del CCU [37].

La mortalidad por CCU está asociada a condiciones socioeconómicas desfavorables, encontrándose un mayor riesgo de mortalidad en regiones rurales dispersas, con bajo acceso a los servicios de salud y en grupos de menor nivel educativo [41]. De acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología (INC), al ser el VPH un virus de transmisión sexual, la infección por VPH se ve favorecida por la promiscuidad sexual, en particular las áreas cercanas a los ríos navegables han mostrado una mayor prevalencia de enfermedades de transmisión sexual, y por ende una alta incidencia de CCU [42]. Otros factores como la distancia que aparta la mayoría de los municipios de Colombia de los grandes centros poblados, diferencias de tamización y tratamiento, y la fragmentación del sistema de salud, se han visto involucrados en la incidencia de CCU a causa de la infección por VPH [42].

De acuerdo con la guía de tamización de neoplasias de cuello uterino del Ministerio de la Protección Social y el INC, actualmente en Colombia existen 3 pruebas de tamización estandarizadas para CCU: la citología convencional, la prueba de detección ADN del VPH y las técnicas de inspección visual [43]. Se ha evidenciado como la citología convencional no tiene impacto en la mortalidad si se realiza como una técnica de tamización de oportunidad, es decir si se realiza de forma esporádica y no hace parte de programas organizados de seguimiento activo de todas las mujeres pertenecientes a la población objetivo [43]. En cuanto a las pruebas de detección de VPH, estos han presentado una mayor sensibilidad frente a la citología, sin embargo, al ser una prueba de detección de ADN, necesita de amplificación y pruebas basadas en hibridación que constituyan un programa organizado de cobertura y seguimiento; lo que implica altos costos de reactivos, además del uso de equipos y personal especializado. Por último, las técnicas de inspección visual se han estipulado como una técnica de tamizaje para poblaciones con condiciones especiales de acceso, sin embargo, se ha concluido que estas pruebas no deben de incorporarse como estrategia de tamización primaria, debido a que se presenta una gran variabilidad en valores de sensibilidad y especificidad dependientes del observador de la prueba [43].

Debido a la prevalencia de las infecciones por VPH, y a la mayor sensibilidad y efectividad en la detección de lesiones precancerosas proporcionada por las pruebas de detección de este virus, la OMS ha destacado la importancia de emplear una estrategia de tamizaje con una prueba de VPH, por sobre estrategias de tamizaje de inspección visual o citología [44]. Sin embargo, a pesar de la innegable capacidad y flexibilidad que ofrecen tanto los métodos convencionales basados en PCR como las técnicas de secuenciación para el análisis y detección de ADN-VPH, ambos enfrentan un desafío común: su difícil implementación en entornos de atención médica cercanos al paciente y el lento tiempo de respuesta [45]. Esto se atribuye principalmente a la necesidad de equipos especializados y personal capacitado, lo que eleva los costos del análisis y dificulta su portabilidad. La complejidad asociada con la miniaturización de estos ensayos, los costos de los reactivos, los requisitos de procesamiento de la muestra y el consumo de energía también contribuyen a esta complicación [45].

Ante los desafíos inherentes en los métodos convencionales de los programas de tamizaje de VPH, se ha destacado la necesidad de contribuir desde la ingeniería biomédica al mejoramiento e innovación en las tecnologías de tamizaje, proporcionando una herramienta que permita la detección de las variantes de alto riesgo del virus, VPH16 y VPH18, contribuyendo así a la prevención y el manejo eficaz del CCU.

2.1. Formulación

¿Cómo desarrollar una prueba de flujo lateral utilizando nanopartículas de oro para la detección selectiva de dos variantes de alto riesgo del Virus del Papiloma Humano (VPH), VPH16 y VPH18?

2.2. Sistematización

- ¿Cuáles son las características moleculares para la identificación y caracterización del VPH?

- ¿Cuáles son los métodos más eficaces para sintetizar y biofuncionalizar AuNPs garantizando su reproducibilidad y control?
- ¿De qué forma se puede garantizar la estabilidad de las AuNPs para ser implementadas en una prueba de flujo lateral?
- ¿De qué forma se puede validar y optimizar los parámetros de una prueba de flujo lateral?
- ¿Cómo se puede evaluar de la sensibilidad y especificidad de la prueba de flujo lateral empleando material recombinante en pruebas de control positivo y negativo?

Justificación

El CCU es la segunda causa de muerte para las mujeres en Colombia, con una tasa de mortalidad de 10.9 por cada 100.000 mujeres [46]. La detección tardía del VPH es la causa número uno para el desarrollo de este tipo de cáncer, siendo el 99.7% de los casos de CCU causados por esta infección [47]. A pesar de la importancia de la detección temprana del VPH, en Colombia solo el 23,2% de las mujeres se realizaron una prueba de detección del VPH en los últimos cinco años [48]. Además, las pruebas de detección actuales para el VPH son costosas y no son asequibles en todas las regiones de Colombia, especialmente en las zonas rurales y de bajos recursos económicos [49].

La población rural presenta un acceso más limitado al servicio de salud debido a las largas distancias, altos costos de transporte y servicios que no cubren la demanda de la población rural [48]. Por lo tanto, se hace necesario desarrollar tecnologías accesibles y efectivas que permitan una detección temprana del VPH. En este sentido, el desarrollo de una prueba de flujo lateral que incorpora AuNPs para la detección rápida y sensible del VPH 16 y 18 podría ser una solución efectiva y asequible para la detección temprana del VPH en áreas rurales y de bajos recursos económicos [50]. Esta tecnología ofrece la ventaja de ser portátil, de bajo costo y fácil de usar, lo que la hace especialmente adecuada para su implementación en áreas con recursos limitados. Adicionalmente, avances en el desarrollo de biosensores que incorporan AuNPs, como aquellos basados en métodos electroquímicos para la detección del VPH [50] o en la detección de células de CCU como se demostró para la línea celular HeLa [51], respaldan la viabilidad y relevancia de esta tecnología para la detección temprana del VPH.

El desarrollo de una prueba de flujo lateral que incorpora AuNPs funcionalizadas con anticuerpos específicos a las variantes de VPH16 y 18, se fundamenta en la necesidad de proporcionar a las mujeres un mayor acceso a pruebas de detección del VPH de alto riesgo, con el potencial de contribuir a la prevención y control del CCU a nivel nacional e internacional.

Objetivos

4.1. Objetivo General

Diseñar una prueba de flujo lateral en la que se usen nanopartículas de oro funcionalizadas que permita la detección selectiva de las variantes de alto riesgo del Virus del Papiloma Humano, VPH16 y VPH18.

4.2. Objetivos Específicos

- Analizar las características biomoleculares del VPH que permitan su identificación y caracterización.
- Sintetizar nanopartículas de oro (AuNPs) de manera reproducible que proporcionen el tamaño y la estabilidad adecuadas para su uso en una prueba de flujo lateral.
- Desarrollar una prueba de flujo lateral que use AuNPs conjugadas con anticuerpos específicos a las variantes VPH16 y VPH18, que permitan su detección selectiva.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad de la prueba mediante material recombinante en pruebas de control positivo y negativo.

Marco de Referencia

5.1. Áreas Temáticas

- Ingeniería en medicina y biología - Ingeniería biomédica - Biotecnología.
- Ingeniería en medicina y biología - Ingeniería biomédica - Punto de atención.
- Ingeniería - Investigación y desarrollo.
- Ingeniería en medicina y biología - Biología - Bioquímica - Proteínas.
- Ingeniería en medicina y biología - Biología - Procesos biológicos - Biología molecular.
- Ingeniería en medicina y biología - Biología - Nanobiociencia - Nanobiotecnología.
- Nanotecnología - Bionanotecnología - Nanosensores.
- Nanobiotecnología - Nanoestructuras - Nanopartículas.

5.2. Marco Teórico

5.2.1. Diseño Experimental

El diseño de experimentos (DDE) es la aplicación del método científico, que permite generar conocimiento acerca de un sistema o un proceso mediante el análisis de datos utilizando modelos estadísticos para observar la interacción entre las variables independientes y como estas afectan a la variable dependiente [52]. El diseño de experimentos consiste en determinar cuáles pruebas se deben de realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas, y de esa manera clarifica los aspectos inciertos de un proceso para resolver un problema o lograr mejoras [21].

Un experimento es un cambio en las condiciones de operación de un sistema o proceso, que se hace con el objetivo de medir el efecto del cambio en una o más propiedades del producto o sistema experimental [21]. En un experimento intervienen distintos tipos de variables o factores: variables respuesta, factores controlables, factores no controlables, factores estudiados, y niveles de tratamientos. Los factores controlables son variables del proceso y métodos experimentales que se pueden fijar a un nivel dado, mientras que los factores no controlables no se pueden fijar durante el proceso normal del experimento [21]. Por otro lado, los factores estudiados corresponden a las

variables que se investigan en el experimento para observar cómo influyen en la variable respuesta [21]. Finalmente, los niveles son los diferentes valores que se asignan a cada factor estudiado en un DDE, y los tratamientos o punto de diseño, son la combinación de niveles de todos los factores estudiados [21] (Figura 5.1).

Nivel de velocidad	Nivel de temperatura	Tratamiento	y
1	1	1	?
2	1	2	
1	2	3	
2	2	4	

Figura 5.1: Ejemplificación niveles y tratamientos de un diseño experimental. Diseño experimental para verificar influencia de los factores de temperatura y velocidad, cada uno a 2 niveles, donde se realizan 4 tratamientos en la combinación de niveles requerida. (Fuente: [21])

5.2.1.1. Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (MRS) es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo [53]. La MSR permite encontrar los valores óptimos para las variables independientes que maximizan, minimizan o cumplen ciertas restricciones en la variable respuesta [53]. De esta forma permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir las que dan valores óptimos de uno o varias características del resultado de este [21].

La MSR trabaja dentro de la región experimental, la cual es el espacio delimitado por los rangos de experimentación con cada factor, y la región de operabilidad, la cual está delimitada por el conjunto de puntos o condiciones donde el proceso puede ser operado [21]. En la fase inicial de una MSR, se busca identificar la región de respuesta óptima en cualquier lugar de la región de operabilidad, dentro o fuera de la región experimental inicial [54] (Figura 5.2). Para esto, inicialmente se utilizan experimentos factoriales completos 2^k o fraccionarios 2^{k-p} , y una vez identificada la región de respuesta óptima, se requieren al menos tres niveles para cada factor y el diseño debe de tener $1+2k+k(k-1)/2$ puntos distintos para estimar los parámetros de un modelo de regresión cuadrática [54]. Sin embargo, utilizar factoriales 3^k requiere un número de combinaciones de tratamiento poco práctico, por lo cual se recomienda usar diseños centrales compuestos propuestos por Box y Wilson, así como los diseños Box-Behnken [54].

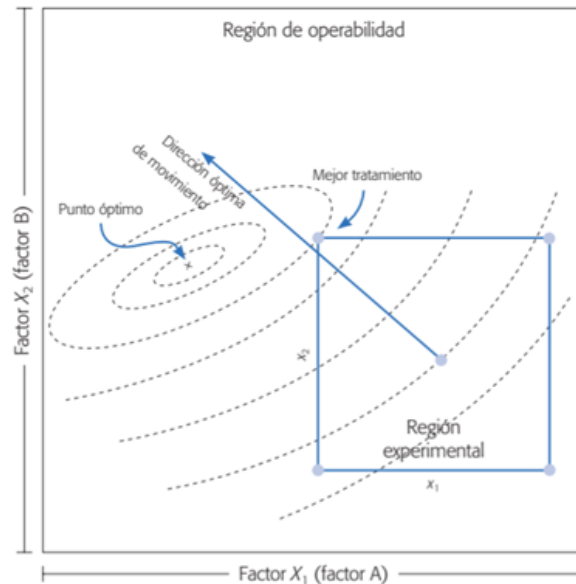


Figura 5.2: *Región operabilidad y región experimental donde trabaja la MSR delimitadas por factores experimental A y B. Se identifica hacia donde se debería de mover las condiciones de estos factores mediante en análisis del mejor tratamiento (mejor combinación de niveles al analizar la región experimental), para así obtener el punto óptimo (mejor combinación posible en toda la región de operabilidad)* [21]

5.2.2. VPH

Características Generales del VPH

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un virus no envuelto, de ADN de doble cadena que pertenece a 5 de los 18 géneros de la familia Papillomaviridae, los cuales incluyen la mayoría de los virus de alto riesgo: alfa, beta, gamma, mu y un [22]. Los papilomavirus se caracterizan por ser virus desnudos, sin envoltura, lo cual lo hace menos antigénico, es decir cuenta con menos antígenos, lo que puede disminuir la respuesta inmunitaria del cuerpo a este. Estos miden entre 45nm a 55nm de diámetro, con una cadena de ADN de aproximadamente 8.000 pares de bases repartidas entre 9 o 10 regiones codificantes y la región no codificante [22].

La región no codificante (LCR), no codifica proteínas, pero contiene elementos necesarios para la regulación de la expresión de los genes, la replicación del genoma y su ensamblaje en partículas virales. Las regiones codificantes se dividen en 8 para genes de expresión temprana o E (“early”) y 2 de genes de expresión tardía o L (“late”), siendo E o L dependiendo de si son expresados antes o después de la síntesis del ADN destinado a ser ensamblado en las partículas de progenie viral. Los genes E1, E2 y E4 codifican para proteínas que regulan la expresión viral, y los genes E5, E6 y E7 codifican para las oncoproteínas que participan en la transformación de la célula hospedadora. Por

otro lado, los genes tardíos L1 y L2 codifican para las proteínas estructurales de la cápside [55]. En la figura 5.3 se ejemplifica las regiones codificantes y no codificantes del ADN viral del VPH, así como la función de los genes más importantes.

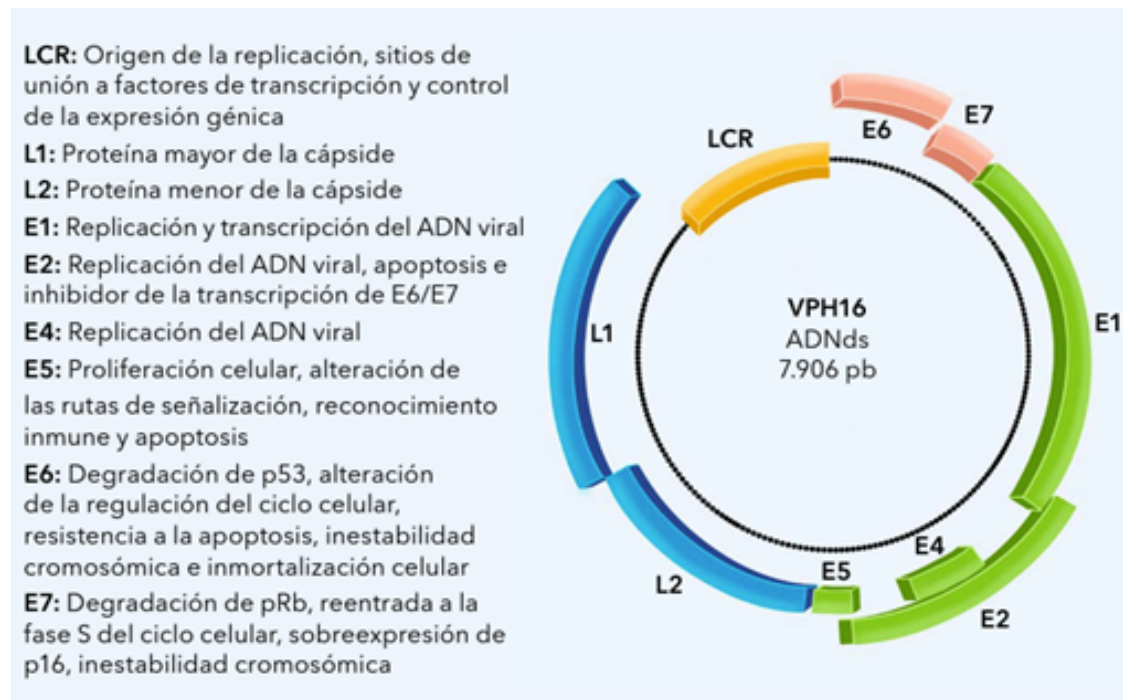


Figura 5.3: Estructura del genoma viral del VH16 (Fuente: [22])

La proteína L1 es el elemento estructural primario, encontrándose 360 copias de la proteína organizada en 72 capsómeros, cada uno de los cuales está compuesto por 5 monómeros de 55 kDa (compuestos por 504 aminoácidos) que se unen para formar un pentámero. Los pentámeros de la proteína L1 interactúan con la proteína L2, la cual tiene un tamaño de aproximadamente 75 kDa, formando la cápside del virus. La proteína L2 es un componente menor que está presente en el centro de los capsómeros pentavalentes en los vértices del virión, esta interactúa con el ADN y se cree que facilita el ensamblaje del virión [56] (Figura 5.4).

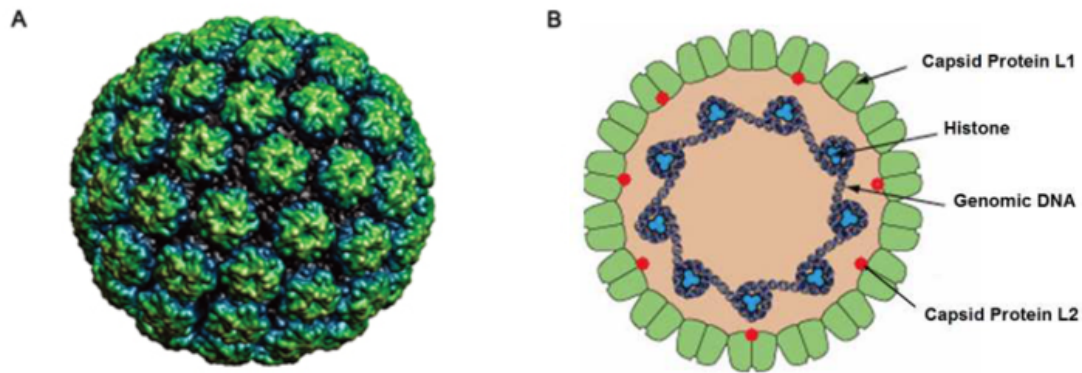


Figura 5.4: A) Imagen en 3D de un virón reconstruido por microscopía crioelectrónica. B) Diagrama de la cápside del VPH [57]

La proteína L1 consta de una importancia especial debido a que le otorga estabilidad a la cápside del virus mediante el establecimiento de interacciones intra e interpentaméricas, lo que asegura la integridad viral al contener epítopes que inducen una respuesta inmune protectora [58]. La proteína L1 representa el 80 % del total de la proteína del virus [23].

En la estructura tridimensional de esta proteína se identifican 3 regiones definidas: el núcleo y los extremos amino y carboxilo [59]. El extremo amino se compone de los primeros 19 aminoácidos, los cuales son altamente conservados entre los diferentes genotipos, lo que puede sugerir que estos son los responsables del ensamblaje del virus [58]. En la región del núcleo, se encuentran los aminoácidos del 20 al 382, los cuales se pliegan fundamentalmente en forma de 11 láminas β (β -B1, β -B2, β -C, β -D, β -E, β -F, β -G1, β -G2, β -H1, β -H2, β -I), las cuales están conectadas entre sí por los lazos o bucles expuestos en la superficie del capsómero (B-C, C-D, D-E, E-F, F-G, H-I) [54]. Entre los lazos F-G y H-I, y las láminas β -F y β -G1, se establecen puentes de hidrógeno que mantienen los monómeros de L1 juntos y confieren estabilidad a la estructura terciaria de barril [54] (Figura 5.5).

Por otro lado, los aminoácidos del 383 al 504 están en el extremo carboxilo, donde se ubican en forma de cinco hélices α (h1-h5) [23]. Las hélices α h4 y α h5, tienen la lámina β -J, la cual ancla el brazo C-terminal a la región central o núcleo de la proteína. Este segmento actúa como una bisagra que facilita los reordenamientos espaciales que debe hacer el extremo carboxilo para asegurar la estabilidad de la cápside viral [58]. Las 3 hélices (h2-h4) son las responsables de establecer contacto con los otros monómeros [58], mientras que la hélice α h1 interacciona con las láminas β -E y β -F en la parte del núcleo de la proteína [56]. El extremo carboxilo también es responsable de mantener la integridad de la proteína L1. Adicionalmente, la cápside es susceptible a la digestión proteolítica por tripsina [58].

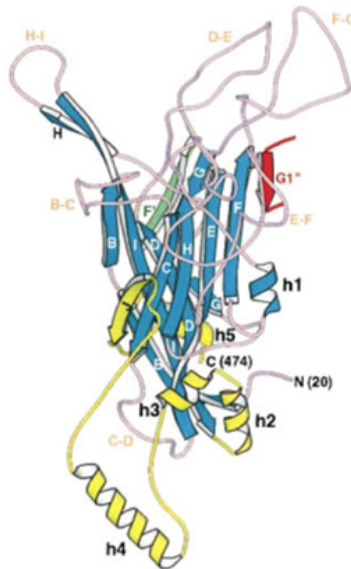


Figura 5.5: Estructura terciaria de L1. (B-I) señalan las láminas β . (h1-h5) señalan las hélices α . (B-C, C-D, D-E, F-G, H-I) representan los lazos interlaminares. (C) representan los extremos C-terminal. (N) representan N-terminal (Fuente: [23]).

Clasificación Clínico-patológica del VPH

Actualmente se han descrito más de 200 tipos de VPH, con distintas variantes y subtipos, cuyas manifestaciones clínicas incluyen un amplio espectro de lesiones proliferativas en la piel, las mucosas, laringe y del tracto anogenital [60]. Del grupo de las mucosas genitales, existen 40 tipos que se subdividen en 2 grupos según su capacidad oncogénica: grupo de riesgo bajo o no oncogénico y grupo de riesgo alto u oncogénicos. Los VPH de bajo riesgo están asociados a lesiones condilomatosas o verrugas genitales, además de papilomatosis respiratoria recurrentes en niños y adolescentes, pero presentan un riesgo muy bajo de lesiones neoplásicas [9]. Por otro lado, los VPH de alto riesgo son los más frecuentes encontrados en lesiones de alto grado y en el cáncer cervical invasor. Este último grupo incluye los VPH 16 y 18, considerados los más virulentos y responsables del 70% de los casos de cáncer cervical, siendo los carcinomas escamosos más relacionados con el 16 y los otros tipos con el 18 [9]. El cuadro 5.1 resume la clasificación de los papilomavirus de acuerdo con su riesgo oncogénico.

Cuadro 5.1: Clasificación de los VPH de acuerdo con el riesgo oncogénico y las enfermedades asociadas. (Fuente: [22])

VPH	Genotipos	Enfermedad asociada
Alto riesgo oncogénico	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59	Cáncer cervical, anal, vaginal, vulvar, orofaríngeo y lesiones precursoras
Bajo riesgo	6, 11	Verrugas genitales, papilomatosis respiratoria recurrente
Probablemente carcinogénico	68	Cáncer cervical
Posiblemente carcinogénicos	26, 30, 34, 53, 66, 67, 70, 73, 82, 85, 97	Incierta

Oncogénesis Viral

Debido a que el VPH es un virus de transmisión sexual, se necesita contacto con la piel genital, mucosas o líquidos corporales de una pareja con lesiones verrucosas o con infección subclínica [21]. El virus infecta tanto a las células basales como las parabasales o células de reserva, a las cuales accede a través de una leve abrasión o microtrauma, generalmente a nivel del introito vaginal. Cuando estas células son infectadas, pueden causar diferentes eventos, el más común se denomina lesión productiva, donde las mismas células inhiben la expresión de los genes virales permitiendo la diferenciación celular a expensas de la pérdida de su capacidad de dividirse. Esta expresión afecta las células que inician su diferenciación escamosa, las cuales en las regiones tempranas del virus permiten la expresión de todos los genes virales con producción de viriones completos justo debajo de la superficie. Estas lesiones se identifican como lesiones de bajo grado asociadas a VPH de riesgo bajo, por otro lado, las lesiones de alto grado se asocian a VPH de riesgo alto, pero no exclusivamente [22].

La infección por VPH incluye procesos como la integración del genoma viral, la división incontrolada y la participación de cambios celulares y epigenéticos [9]. Una vez los VPH llegan a la célula basal, estos pueden permanecer en forma episomal (no integrado a la célula), en estado latente o abandonar la latencia y aprovechar la maduración propia de la célula del epitelio cervical. Al igual que otros virus, los papilomavirus humanos, aprovechan la maquinaria de la célula huésped para replicarse al integrar su propio ADN viral con el ADN de la célula. Aunque no se ha reconocido un receptor específico, se sugiere que la internalización de los viriones se hace por medio de la endocitosis de vesículas recubiertas de clatrina, donde se desarrolla el desencapsulamiento del virus y la posterior liberación del ADN viral [10].

La integración del ADN del VPH con el genoma celular ocurre sin un locus específico de integración, es decir se da en cualquier lugar donde exista fragilidad cromosómica. Una vez realizado este proceso, los VPH expresarán sus genes de forma secuencial paralelo a la maduración del epitelio cervical: Genes tempranos (E1-E8) en las capas basales, y luego sus genes tardíos (L1-L2), en las capas superficiales del epitelio más diferenciado, formando la cápside y permitiendo el ensamblaje

de nuevas partículas virales que repetirán este ciclo [10]. En la figura 5.6 se puede observar el proceso de integración del virus de VPH al epitelio escamoso del cérvix y su progresión hacia el CCU invasivo.

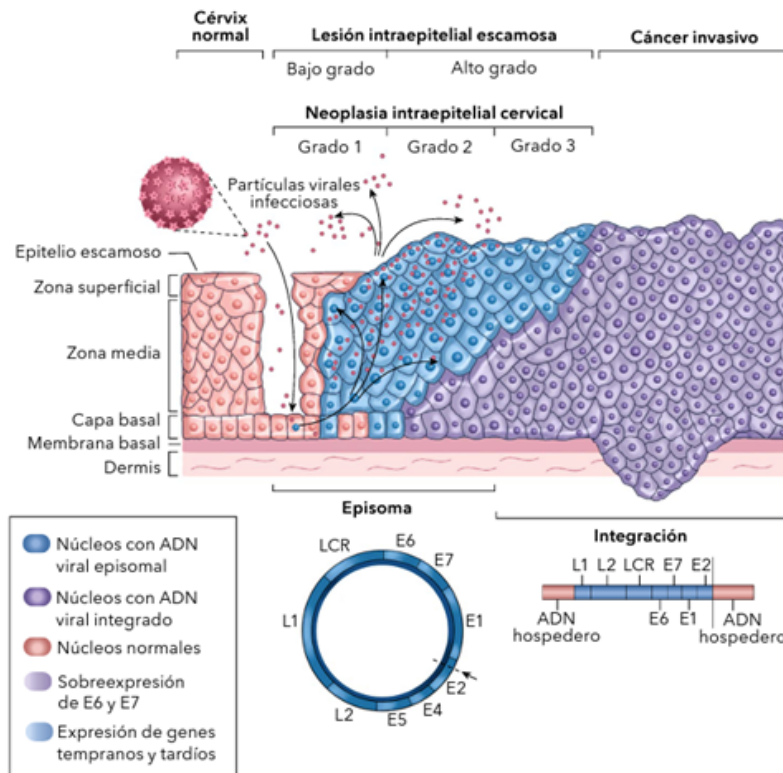


Figura 5.6: Proceso natural de infección del VPH y asociación con cáncer. (Fuente: [22])

Para garantizar su permanencia, el VPH necesita infectar células basales con características de célula madre que tengan capacidad de proliferación, ya que la integración de su ADN es el evento crítico en la carcinogénesis cervical y es consecuente al desarrollo de anomalías cromosómicas que pueden terminar en la transformación tumoral. Igualmente, el estado físico del ADN viral dentro del núcleo de la célula huésped, predice la lesión inducida por este. Si se encuentra en forma episomal, son lesiones intraepitales de bajo grado, mientras que, si se encuentra integrado al genoma celular, son lesiones de alto grado y/o cáncer invasor [9].

En cuanto a la regulación del ciclo celular de la célula huésped por parte del VPH, se conoce que, durante la integración de la secuencia genómica viral, se interrumpe la región E1/E2 de la célula, lo que hace que pierda su capacidad de actuar sobre la región control del ADN del VPH, aumentando la expresión de los genes transformantes [9]. El producto del gen E6 de los VPH de alto riesgo, interfiere con la proteína E6AP que regula la transcripción en las células proliferantes, ocasionando una degradación proteolítica de la proteína p53 mediada por la ubiquitina. En condiciones normales,

la fase S no programada del ciclo celular conduciría a la apoptosis mediada por la proteína p53, sin embargo, en las células infectadas por VPH, este proceso se bloquea por la proteína E6, anulando la dependencia del control del ciclo y retrasando la diferenciación normal de los queratinocitos [9]. Además, la unión de la proteína E7 a la proteína pRB activa el factor de transcripción E2F, desencadenando la expresión de las proteínas necesarias para la replicación del ADN celular [9] (Figura 5.7).

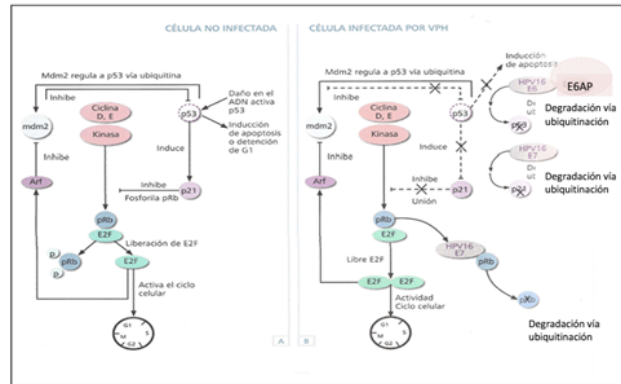


Figura 5.7: Proceso regulación del ciclo celular. A) Célula epitelial no infectada. B) Célula epitelial infectada por VPH (Fuente: [9]).

El proceso de bloqueo de las proteínas p53 y pRb por los genes virales E6 y E7, conduce a una immortalización celular, la célula no solamente es incapaz de eliminar el ADN viral, sino que también se ve imposibilitada para corregir errores intrínsecos al ADN celular, de modo que va acumulando alteraciones genéticas de forma progresiva, convirtiéndose en una célula con fenotipo neoplásico y finalmente en CCU [9].

5.2.2.1. Estrategias de Prevención del Cáncer de Cuello Uterino

Tamización

Debido a la asociación entre la infección por VPH de alto riesgo y el CCU invasor, se han desarrollado políticas de prevención y programas de tamización, tanto en el mundo como a nivel nacional, para predecir e identificar el desarrollo de lesiones precancerosas o cáncer, con el fin de minimizar la tasa de mortalidad en las poblaciones de mayor riesgo.

Un programa efectivo e ideal de vigilancia epidemiológica consta de: la tamización con detección y genotipificación de los VPH de alto riesgo; el triaje de las mujeres positivas en la tamización con realización de citología cervicouterina para determinar la conducta a seguir; la colposcopia y biopsia de aquellas en las se detecta un VPH de alto riesgo y alguna alteración en la citología; y el tratamiento oportuno en las mujeres con lesiones premalignas y con alto riesgo de desarrollar cáncer cervical invasor [22]. En la figura 5.8 se describe el proceso ideal de vigilancia y acompañamiento

de CCU con los pasos anteriormente mencionados de prueba de ADN-VPH, citología de triaje, y manejo y seguimiento a la enfermedad.

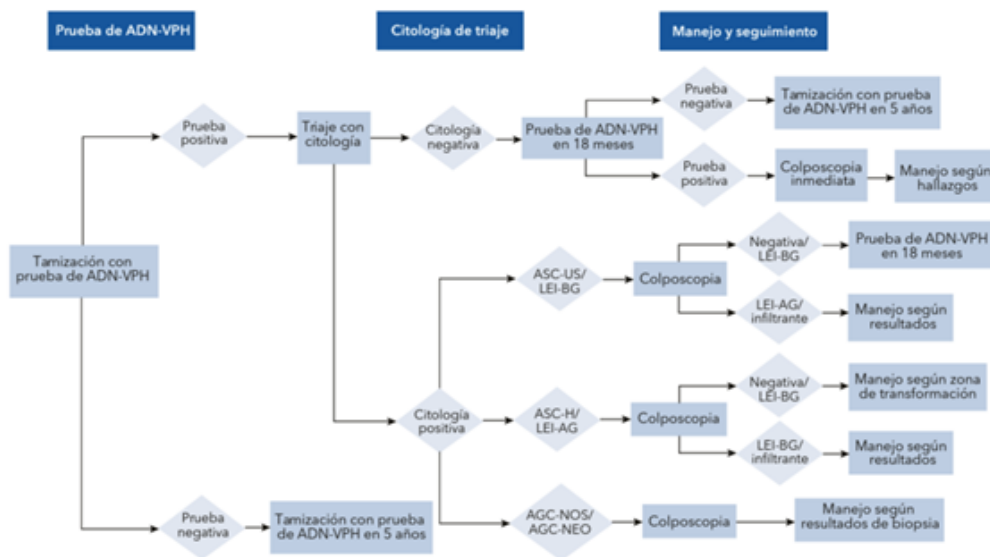


Figura 5.8: Algoritmo de programa de vigilancia epidemiológica (Fuente: [22]).

A pesar de que los anteriores procedimientos son considerados el escenario ideal, actualmente el método más ampliamente utilizado es la citología cervicouterina, seguido por la detección del ADN viral de los tipos de VPH de alto riesgo, o incluso la combinación de las dos anteriores. Igualmente, aunque existe y prevalece la importancia de la vacunación contra el VPH, esta deja por fuera de la prevención a mujeres previamente expuestas al virus y debido a la dificultad de que la población obtenga esquemas de vacunación óptimos, el tamizaje sigue siendo el aspecto fundamental en la prevención del CCU [22].

De acuerdo con la OMS, el control integral del CCU consiste en la prevención primaria, la vacunación contra VPH; la prevención secundaria, detección y tratamiento de las lesiones precancerosas; y la prevención terciaria, diagnóstico y tratamiento del cáncer invasivo, así como los cuidados paliativos [61]. En concordancia con lo anterior, el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, desarrolló una guía práctica clínica para la detección y manejo de lesiones premalignas de cuello uterino en el año 2014. En ella se establece, en base a la manera como se desarrollan las lesiones precancerosas y el cáncer de cuello uterino, las acciones de prevención que se pueden llevar a cabo en 2 momentos: Prevención de infección por VPH y después de la infección por VPH [10]; estas acciones se evidencian en el cuadro 5.2.

Cuadro 5.2: Estrategias de prevención de Cáncer Cervicouterino Minsalud. (Fuente: [10])

Prevención por infección por VPH	Después de la infección por VPH
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Uso de preservativo ▪ Vacuna contra el VPH ▪ Dieta adecuada ▪ No fumar ▪ Iniciar de manera tardía relaciones sexuales ▪ Mejorar hábitos alimenticios que permitan mantener un peso saludable ▪ Realizar actividad física aeróbica intensa, mínimo de 150 minutos semanales, o una combinación equivalente de actividad moderada y vigorosa 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Participar en programas de detección temprana de cáncer de cuello uterino ▪ Dar continuidad al proceso de diagnóstico y tratamiento de lesiones en el cuello uterino ▪ Llevar a cabo el seguimiento de acuerdo con las indicaciones del especialista ▪ Mejorar hábitos alimenticios que permitan mantener un peso saludable ▪ Realizar actividad física aeróbica intensa, mínimo de 150min semanales, o una combinación equivalente de actividad moderada y vigorosa

Prevención Primaria

Debido a que el VPH es un virus que se transmite por vía sexual, la vacunación resulta en la medida de prevención más efectiva a largo plazo para evitar la morbilidad y mortalidad por cáncer cervicouterino. La prevención mediante vacunación está basada en que la proteína L1 de la cápside viral puede ser ensamblada en una partícula similar al virus, al expresarse como proteína recombinante en un sistema eucariota heterogéneo [9].

De esta forma, se creó una vacuna que está compuesta por partículas similares al virus, conservando su geometría, pero que carecen de ADN, y por lo tanto no son infecciosas. Aplicando esta vacuna en etapas tempranas y de infancia, se logra generar una respuesta enérgica de anticuerpos a la proteína L1 del VPH, además de niveles sostenibles de anticuerpos en la localización de la infección primaria [22].

El esquema de vacunación, de acuerdo con el ministerio de salud y protección social colombiano, consta de la aplicación de 3 dosis en un esquema 0, 2 y 6 meses. Esto quiere decir que la primera dosis se aplica en cualquier fecha elegida, la segunda dosis 2 meses después y la tercera dosis 6 meses después de la primera [62]. Aunque se puede aplicar a cualquier edad, se ha demostrado que la respuesta inmunológica de la vacuna es mayor en niñas menores de 15 años que en mujeres mayores. Igualmente, no se ha establecido la duración de la protección, pero se ha observado una eficacia protectora sostenida de hasta 8.4 años además de una eficiencia contra el VPH 16 y 18, del 98.2% [62].

Prevención Secundaria

Las estrategias de tamización para la detección temprana del VPH han representado uno de los mayores éxitos en la prevención de CCU. De esta forma, las estrategias de prevención secundaria pueden ser en modelos de cribado o modelos de asistencia.

El modelo de cribado hace referencia a iniciativas de salud pública por medio de las cuales se aplica a personas asintomáticas una prueba de detección del virus. No debe esperarse un diagnóstico, ya que solo se basa en la captación activa del virus en la población. Por otro lado, el modelo de asistencia se basa en ofrecer una garantía de diagnóstico a la persona que solicita una revisión preventiva de salud [9].

En la figura 5.8, se observa el proceso de las estrategias de prevención secundarias junto con las pruebas que idealmente se deberían de realizar en cada paso para llegar a un diagnóstico efectivo del CCU.

Prevención Terciaria

Una vez se ha diagnosticado el cáncer cervicouterino de tipo invasor, las estrategias de tratamiento se basan en cirugía o radioterapia, la quimioterapia puede complementar el tratamiento en etapas más avanzadas [63]. Dentro de estas estrategias, se tienen dos grupos: tratamiento destructivo y tratamientos escisionales. Los tratamientos destructivos producen una destrucción física de la lesión, donde se encuentran técnicas de termo coagulación, electrocoagulación, criocoagulación y vaporización con láser de CO₂. Por otro lado, los tratamientos escisionales extirpan la lesión, donde se encuentran técnicas de conización y la histerectomía [9].

Es importante resaltar que el porcentaje de éxito de los tratamientos actuales está basado en la detección temprana del cáncer, que ha mostrado ser eficaz hasta en un 95%, pero, aun así, el seguimiento postratamiento es necesario. El riesgo de recurrencia es mayor durante los 2 primeros años después del tratamiento, y va aumentando en las dos siguientes décadas [9]. Igualmente, las mujeres tratadas por cualquier lesión ocasionada por CCU presentan un riesgo 5 veces mayor de desarrollar cáncer invasor que el de la población general [9].

5.2.2.2. Tecnologías para la identificación de VPH y el Tamizaje de CCU

Biomarcadores

Los biomarcadores son sustancias detectables que se usan para indicar un estado biológico en un organismo [64]. En el caso del VPH, los biomarcadores se utilizan para detectar la presencia del virus y para determinar su actividad. El biomarcador más comúnmente utilizado para la detección del VPH es el ADN viral. La prueba de detección de ADN se basa en la detección de fragmentos de ADN del virus en células cervicales tomadas mediante citología o colposcopia. Sin embargo, existen distintas tecnologías para la identificación del VPH, como la detección de ADN viral por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y la prueba de hibridación de captura de híbridos, que consiste en la detección de ARNm en genes como lo son el E6 y el E7 [65].

Los biomarcadores son una herramienta importante para la identificación del VPH y la detección temprana del cáncer cervicouterino. Las tecnologías disponibles para la identificación del VPH se basan en la detección de biomarcadores específicos del virus y continúan evolucionando con el desarrollo de nuevas tecnologías [66].

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es esencial en los estudios moleculares y genéticos al permitir la amplificación rápida de pequeños segmentos de ADN [67]. Para amplificar un segmento de ADN con PCR, se calienta la muestra, separándola en dos hebras de ADN mediante desnaturalización [67]. Luego, la enzima "polimerasa Taq" sintetiza dos nuevas hebras utilizando las originales como plantillas, logrando la duplicación del ADN original [67]. Cada nueva molécula resultante contiene una hebra antigua y una nueva de ADN [67], lo que posibilita la amplificación exponencial del segmento original. En la figura 5.9 se muestra en conjunto la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

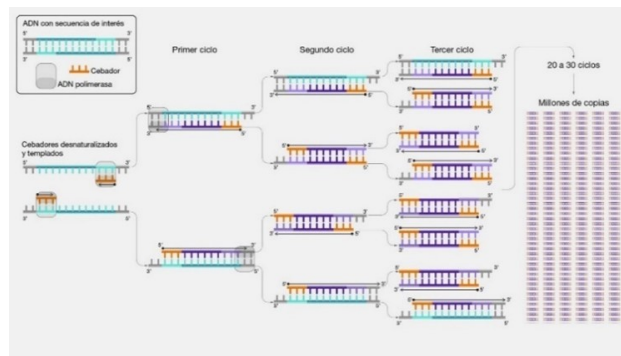


Figura 5.9: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Fuente: [24]).

Prueba de detección ADN-VPH

La detección del ADN de alto riesgo del VPH puede ser realizada mediante una prueba de ADN-VPH. Esta prueba es similar a una de Papanicolaou en cuanto al método utilizado para obtener una muestra cervical, pero se realiza un análisis adicional en las células que permite identificar si existe una infección por VPH de alto riesgo o no [25]. La prueba implica el uso de un pequeño cepillo o espátula para obtener una muestra de células de la superficie del cuello uterino, similar a como se hace rutinariamente en una prueba de Papanicolaou [25]. No hay dolor involucrado ya que solo se extraen células de la superficie.

La prueba de ADN-VPH permite predecir el desarrollo de anomalías cervicales de manera más certera que las pruebas de Papanicolaou, pero se sugiere no suspender esta última y realizar ambas pruebas de manera complementaria [25] (Figura 5.10).

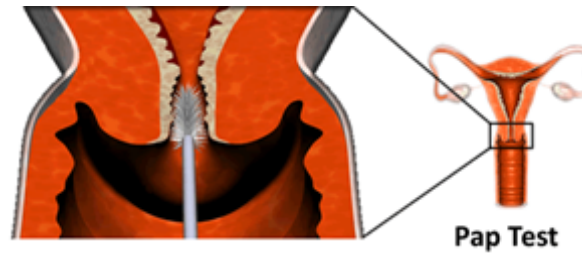


Figura 5.10: Toma de muestra para la detección de ADN de alto riesgo del VPH. La muestra se toma de la misma manera en que se toma para la prueba de Papanicolau haciendo uso de un cepillo para extraer células del cuello uterino (Fuente: [25]).

Hibridación (Captura de híbridos)

La prueba de Captura de Híbridos 2 (CH2) es una técnica antigua utilizada en tamizaje para detectar el VPH de Alto Riesgo (VPH-AR). La prueba ha sido validada en múltiples estudios y permite la detección de VPH-AR mediante el uso de un cóctel de sondas para 13 tipos de VPH de Alto Riesgo (VPH-AR). La técnica se basa en la identificación de híbridos de ADN con sondas de ARN. Fue desarrollada por Digene Corporation y actualmente es propiedad de Qiagen, y desde el año 2000 cuenta con la aprobación de la FDA para su uso rutinario en combinación con la citología para la detección temprana de VPH [68].

En América Latina, la prueba ha sido aprobada en Colombia, Argentina y México. La toma de muestra se realiza mediante un cepillo que se introduce en el canal endocervical y posteriormente se coloca en el tubo que acompaña la prueba de CH2, que contiene el medio para su transporte al laboratorio [68]. Posteriormente, las células cervicales se someten a una solución alcalina desnaturalizante que expone el material genético. Luego, mediante el uso de un cóctel de sondas de ARN, se produce la formación de un híbrido ADN viral-ARN en presencia de cualquiera de los 13 tipos de VPH-AR [68]. La hibridación se identifica mediante anticuerpos específicos y una solución quimio-luminiscente que produce una emisión de luz cuando hay presencia de híbridos. La lectura final de la señal de quimio-luminiscencia permite reportar la prueba como positiva o negativa (Figura 5.11).

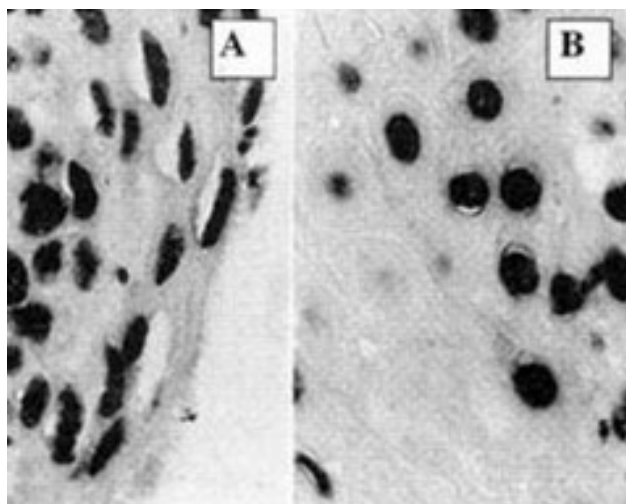


Figura 5.11: Fotografías de epitelio cervical con reacción de hibridación positiva para: A. ADN de VPH tipo 6, B. ADN de VPH tipo 11 (Fuente: [26]).

La prueba de CH2 no permite identificar cuál de los 13 tipos de VPH-AR está presente en la muestra ni si la paciente tiene uno o varios de estos tipos. Tampoco está diseñada para dar un resultado cuantitativo, aunque algunos estudios han utilizado el valor de Unidad Relativa de Luz (RLU) como una evaluación cuantitativa de carga viral [68].

El procesamiento de las pruebas se puede realizar de manera manual, semiautomática o automatizada mediante el uso de un robot. La prueba tiene alta sensibilidad y alto valor predictivo negativo, lo que significa que una paciente con una citología negativa y una determinación de VPH negativa tiene una probabilidad prácticamente nula de tener alguna lesión durante los 5 años siguientes. Sin embargo, la prueba presenta algunas desventajas, como su especificidad limitada y la posibilidad de reacciones cruzadas con sondas de bajo riesgo [68].

Cervista HPV HR y Cervista HPV 16/18

Cervista HPV HR es una prueba *in vitro* utilizada para detectar cualitativamente la presencia de 14 tipos de VPH-AR en muestras cervicouterinas. La prueba ha sido validada tanto analítica como clínicamente, pero no permite la identificación de un tipo específico de VPH. Por otro lado, Cervista HPV 16/18 es capaz de detectar los tipos de VPH 16 y 18 y fue aprobada por la FDA en 2009 para su uso en mujeres mayores de 30 años en conjunto con la citología cervical [68].

La tecnología de amplificación de señal de detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos utilizada por Cervista se basa en la química de Invader, la cual es un método de amplificación de señal para la detección de secuencias de ácido nucleico específicas [69]. El método utiliza dos reacciones isotérmicas simultáneas: una reacción primaria en la secuencia del ADN objetivo y una reacción secundaria que genera una señal fluorescente [68] (Figura 5.12).

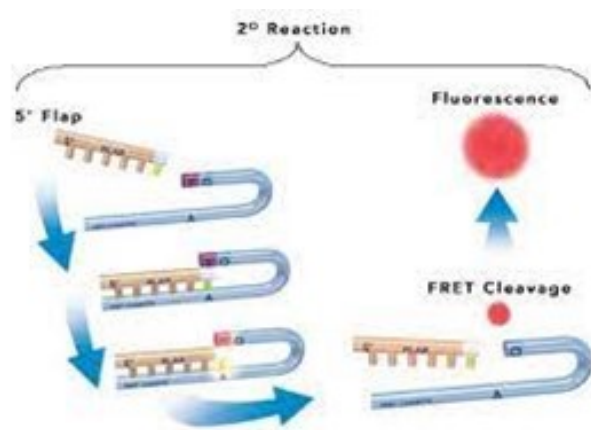


Figura 5.12: Esquema para la reacción de detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos en la técnica Cervista HPV HR y Cervista HPV 16/18 (Fuente: [26]).

Una de las ventajas de Cervista es su alta reproducibilidad y sensibilidad. La genotipificación de Cervista HPV 16/18 utiliza la misma tecnología que la prueba HPV HR, además, el control interno contenido en la prueba ayuda a verificar la calidad de la muestra [68]. Sin embargo, el fabricante señala ciertas limitaciones de la prueba, como la reactividad cruzada con dos tipos de VPH de riesgo desconocido, una positividad para VPH-67 con 5.000 copias/reacción y positividad para VPH 70 con 50.000 copias/reacción, además, en casos de niveles bajos de infección o errores en la toma de muestra, la prueba puede dar falsos negativos [68].

Prueba APTIMA de ARNm E6/ E7

Se ha descubierto que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer cervical, y su expresión en exceso es un indicador de alto riesgo de desarrollar la enfermedad. Como resultado, algunos investigadores han sugerido que detectar la expresión de estos oncogenes podría ser más preciso en la predicción del riesgo de cáncer que las pruebas de ADN del VPH. Actualmente, existen dos métodos que utilizan la detección del ARNm para evaluar el riesgo de cáncer cervical: la prueba de ARNm E6/E7 APTIMA (Gen-Probe), que puede detectar 13 tipos de VPH-AR y el VPH 66, y la prueba HPV-Proofer PreTect (NorChip), que puede detectar el ARNm de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33 y 45 [68].

La prueba Aptima HPV es una técnica cualitativa que se utiliza para detectar la expresión directa del ARNm de las oncoproteínas E6 y E7, que provienen de los 14 tipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) a través de la amplificación en tiempo real [52]. Sin embargo, esta prueba no puede diferenciar entre los 14 tipos de VPH. Con esta prueba se pueden analizar muestras de cuello uterino recogidas en viales para citología ThinPrep con solución PreservCyt. El ensayo incorpora un control interno para supervisar la captura, la amplificación y la detección del ácido nucleico, así como los errores del usuario o del instrumento APTIMA HPV E6/E7. Este ensayo permite realizar hasta 250 pruebas en aproximadamente 5 horas [68] (Figura

5.13).

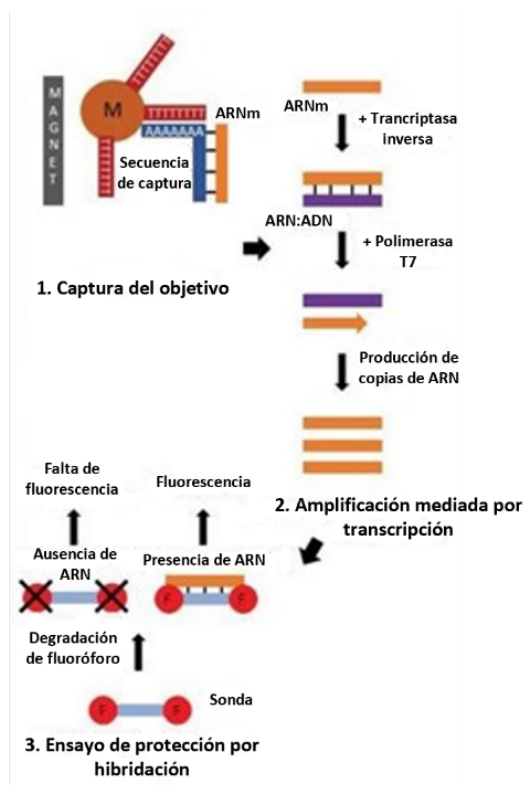


Figura 5.13: Pasos para la detección de VPH con prueba Aptima HPV (Fuente: [27])

En 2011, la FDA aprobó el uso de esta técnica para el tamizaje en mujeres mayores de 30 años, combinada con la citología. Sin embargo, esta técnica presenta algunas limitaciones que deben ser consideradas. Primero, no se ha evaluado en personas vacunadas contra el VPH. Además, la detección del ARNm de VPH de alto riesgo depende del número de copias presentes en la muestra. Por último, según la literatura, es posible que se presenten falsos positivos con VPH de bajo riesgo [68].

Citología

La citología de cuello uterino es un examen sencillo que permite examinar las células del cuello uterino. Se realiza colocando un espéculo en la vagina y tomando una muestra de la parte externa e interna del cuello uterino, que se fija en una placa de vidrio y se envía al laboratorio para su análisis [10]. Este examen es importante para detectar lesiones precancerosas, realizar un diagnóstico temprano de CCU e implementar un tratamiento oportuno. Se recomienda realizar la citología cervicouterina a todas las mujeres que hayan iniciado su vida sexual, especialmente a partir de los 25 años, y repetirlo cada 3 años si los resultados son negativos. Si el resultado es positivo, el profesional de salud debe continuar con una biopsia dirigida por colposcopia. En caso de resultados

negativos, se puede continuar con la toma de la citología cervicouterina cada 3 años o realizar la prueba de ADN-VPH cada 5 años para reducir la incidencia y mortalidad por CCU invasivo [10] (Figura 5.14).

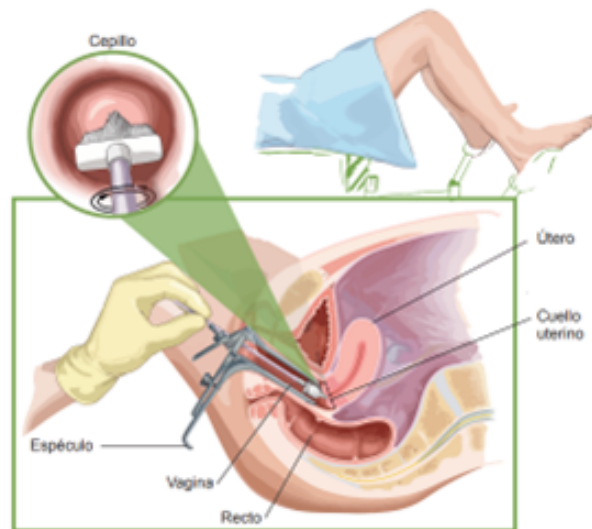


Figura 5.14: Esquema ilustrativo de una citología cervicouterina (Fuente: [10]).

Técnicas de inspección visual

Las técnicas de inspección visual en el VPH son aquellas que se utilizan en la observación directa de los tejidos cervicales y genitales femeninos para detectar posibles lesiones asociadas al VPH [70].

La técnica de inspección visual más comúnmente utilizada es la colposcopia, que implica el uso de un colposcopio para examinar el cérvix. El colposcopio es un instrumento de aumento que permite al médico visualizar el cérvix con mayor detalle, lo que facilita la detección de lesiones y cambios en la textura y coloración del tejido, además de la colposcopia, existen otras técnicas de inspección visual, como la vulvoscopía y la vaginoscopía, que permiten examinar la vulva y la vagina para detectar posibles lesiones asociadas al VPH [70].

La inspección visual no es un método de diagnóstico para el VPH, sino una herramienta de detección que permite identificar lesiones sospechosas que pueden ser causadas por el virus. Si se detectan lesiones sospechosas, se pueden realizar pruebas adicionales, como la biopsia, para confirmar la presencia de células anormales o cancerosas [70] (Figura 5.15).

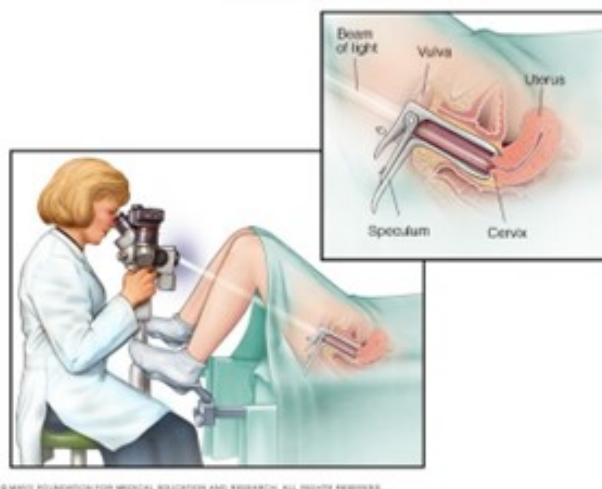


Figura 5.15: Esquema ilustrativo de una colposcopia (Fuente: [28]).

Otro tipo de inspección visual conocido como IVA o inspección visual con ácido acético es una técnica de detección de bajo costo y alta sensibilidad que se utiliza en muchos países en desarrollo como una alternativa a la prueba de Papanicolaou para el cribado del cáncer cervicouterino. La IVA consiste en la aplicación de ácido acético al cuello uterino, lo que hace que las células anormales aparezcan blanquecinas, lo que facilita la identificación de lesiones precancerosas [70] (Figura 5.16).



Figura 5.16: Fotografías de tejido de tinción con ácido acético para inspección visual (Fuente: [28]).

5.2.2.3. Bionanosensores para la detección de VPH

Como se presentó anteriormente, los métodos de detección de VPH y tamizaje de CCU son muy variados, abarcando desde métodos clínicos, citológicos, histopatológicos y pruebas moleculares. Sin embargo, presentan grandes desventajas. Pruebas como la citológica y colposcopia presentan una sensibilidad y especificidad muy baja y requieren ser realizadas en varias ocasiones, lo que provoca que la progresión de la lesión se incremente, además de que no es posible identificar el tipo de virus mediante estas [25]. Por otro lado, las pruebas moleculares tienen mejor especificidad y sensibilidad, además de que pueden determinar el tipo de VPH encontrado; sin embargo, estas son de difícil acceso, de altos costos y de muy poca disponibilidad [71].

Debido a estos factores, el avance tecnológico en los campos de aplicación clínica se ha inclinado al desarrollo de biosensores. Un biosensor es un dispositivo que es capaz de proporcionar información

analítica cuantitativa o semicuantitativa utilizando un elemento de reconocimiento biológico. Gracias a sus características de miniaturización, tiempo de detección, portabilidad y bajo costo, además de su alta sensibilidad y especificidad, han permitido que distintos estudios se hayan encaminado a su uso para una detección confiable, rápida y accesible [29].

Los biosensores estiman los niveles de marcadores biológicos al producir señales relacionadas con la concentración del analito presente y pueden estar formados de manera general de los siguientes elementos, con algunas variaciones: una sonda, un transductor y un detector. De esta forma, la sonda recoge la señal mediante una interacción física o química con el analito y envía esta información al transductor [72] (Figura 5.17).

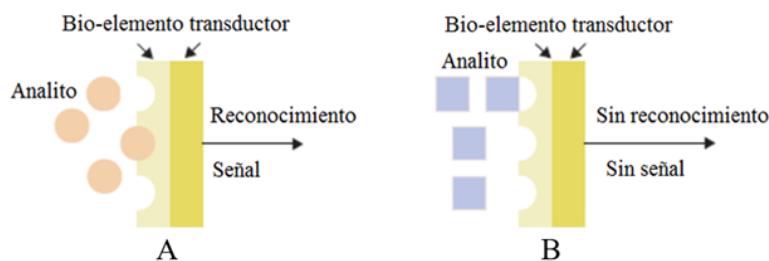


Figura 5.17: Operación y componentes típicos de un biosensor. A) El bioreceptor reconoce el analito y envía la señal de reconocimiento. B) El analito no corresponde al determinado por el bioreceptor, no se reconoce y no se envía señal (Fuente: [29]).

Clasificación de los Biosensores

Los biosensores se pueden clasificar, ya sea por el tipo de mecanismo de señalización biológica que utilizan (bioreceptor) o por el tipo de transducción de señales que utilizan. A su vez, los bioreceptores se pueden dividir en bioanalíticos o bioligandos. Dentro de los primeros se encuentran enzimas aisladas, microorganismos, células completas o tejidos, que llevan a cabo reacciones de catálisis con el analito para generar la detección. El segundo grupo comprende anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos y lectinas, los cuales tienen una reacción de afinidad con el analito, permitiendo así la detección. A su vez, los biosensores se pueden dividir por tipo de transductor, entre los más estudiados se encuentran los electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos y magnéticos [71] (Figura 5.18).

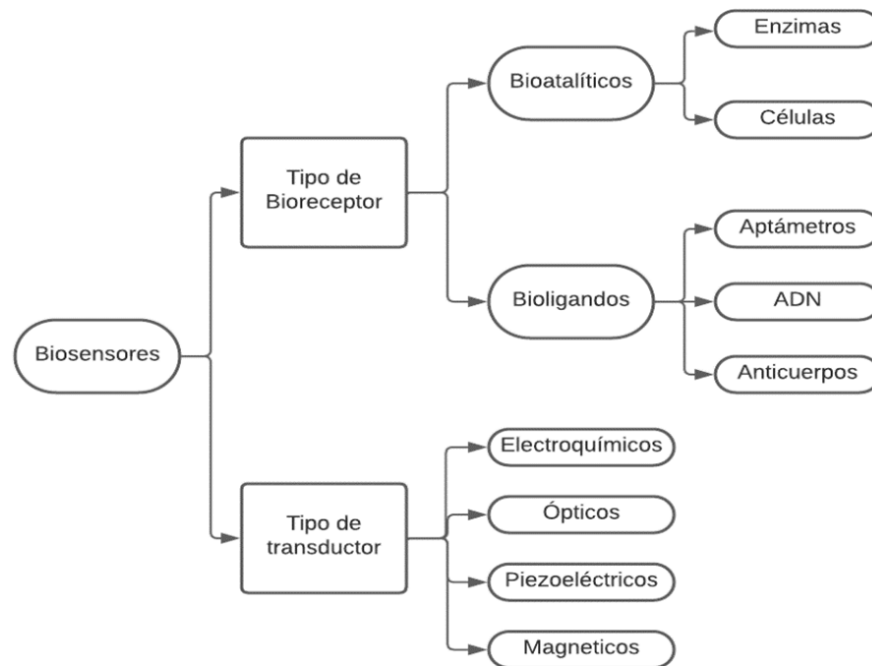


Figura 5.18: Clasificación de Biosensores

Bioreceptores de Antígeno/Anticuerpo

Los anticuerpos (Ab) son glicoproteínas pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas, las cuales son producidas por las células B para ser utilizadas como parte del sistema inmunológico que permiten identificar y neutralizar agentes extraños del cuerpo denominados antígenos (Ag). Un anticuerpo es una molécula en forma de Y que presenta 4 cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), unidas por enlaces disulfuro. Además, las cadenas tienen regiones constantes (C) y variables (V) [30]. La unión Antígeno-Anticuerpo se basa en interacciones no covalentes para formar el complejo Ag-Ab, el cual tiene alta selectividad y sensibilidad. De esta forma, el reconocimiento del antígeno está mediado por los dominios variables ligeros (VL) y pesados (VH), los cuales se conocen como la región Fab (Fragmento de unión al antígeno). En la base del anticuerpo se encuentra la región Fc (fragmento cristalizante), conformada por las 2 cadenas constantes H, el cual asegura que cada anticuerpo genere la respuesta adecuada para cada determinado antígeno [30] (Figura 5.19).

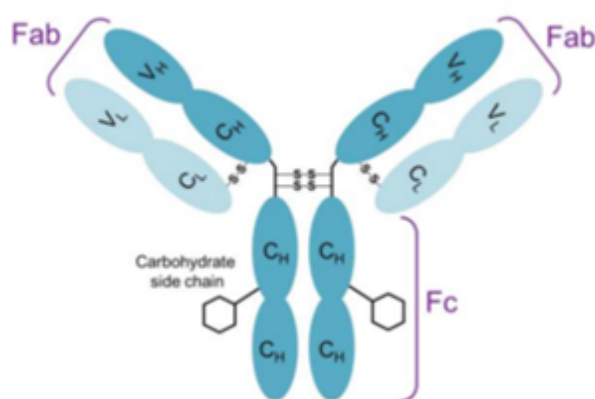


Figura 5.19: Estructura de un Anticuerpo. Estructura en Y: regiones Fab conformadas por cadena VL y VH. Base conformada por cadenas VH. (Fuente: [30]).

Las características de acople selectivo Ag-Ab es utilizada para la obtención de inmunosensores, los cuales son sistemas de detección basados en las interacciones entre Ag y Ab que se acoplan a señales de transducción [68]. Estos pueden ser clasificados de 3 maneras: electroquímico, óptico y piezoeléctrico. Debido a que los complejos formados por la interacción Ag-Ab no son electroactivos y no tienen propiedades redox, a los inmunosensores se les acopla una inmunoetiqueta externa como enzimas, nanomateriales, nanopartículas metálicas, magnéticas o nanopartículas de oro (AuNPs), para permitir que la señal de interacción sea leída [29] (Figura 5.20).

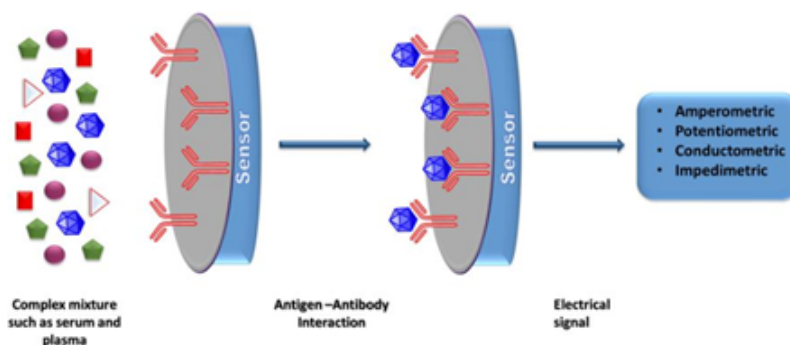


Figura 5.20: Principio detección biosensor con anticuerpo. Biosensor conformado por anticuerpos detectan los antígenos correspondientes, lo que envía la señal de reconocimiento (Fuente: [29]).

Bioreceptores de transductor óptico

Los transductores ópticos detectan la interacción biológica midiendo variaciones de las propiedades ópticas de la luz propagada (intensidad, longitud de onda, índice de refracción o polarización). En estos bioreceptores el producto de la reacción de detección provoca un cambio en la respuesta

del transductor tras ser irradiada por un haz de luz incidente, o la misma reacción emite una señal óptica que puede ser detectada. Existen dos formas de detección: detección por bio-optrodos y detección sin etiquetas o sensores de ondas evanescentes [29].

En los bio-optrodos se conduce la luz a una cámara de evaluación donde la interacción biomolecular produce un cambio en las propiedades de la luz (absorción, fluorescencia, índice de refracción, bioluminiscencia o dispersión). En estos biosensores las moléculas de reconocimiento pueden ser etiquetadas con marcadores fluorescentes, en donde la intensidad de fluorescencia emitida indica la presencia de la molécula blanco y la fuerza de interacción entre el analito y las moléculas de reconocimiento [30].

Por otro lado, en la detección con sensores de ondas evanescentes, no se utilizan etiquetas o alteraciones ópticas, ya que se basa en la posibilidad del confinamiento de las ondas electromagnéticas en ciertos dieléctricos o metales. De este modo, las ondas electromagnéticas penetran en el medio externo generando un campo evanescente que actúa como una sonda para detectar cambios en el índice de refracción causados por la interacción biológica del analito con las moléculas de reconocimiento [30].

Biosensores basados en Nanopartículas de Oro (AuNPs)

De las diferentes nanopartículas de metales usadas en los procesos de biosensores, debido a sus características particulares, las nanopartículas de oro (AuNPs) han recibido bastante interés dentro de los avances tecnológicos. Las AuNPs tienen una alta relación superficie-volumen y una alta energía superficial, lo que proporciona una inmovilización estable de los bioreceptores. Además, tienen la capacidad de transferir electrones de forma rápida y directa en una amplia gama de especies electroactivas y materiales de electrodos. Igualmente, sus propiedades de dispersión de la luz y capacidad de incremento del campo electromagnético permiten que sean utilizadas como etiquetas de amplificación de señal en diversos biosensores [73].

Los biosensores basados en AuNPs pueden ser clasificados en 3 tipos: biosensores ópticos, electroquímicos o piezoeléctricos. El cuadro 5.3, muestra las diferentes características de diferentes biosensores basados en AuNPs.

Cuadro 5.3: Clasificación y características de Biosensores con AuNPs. (Fuente: [73])

Tipo de biosensor	Principio de detección	Función de AuNPs	Propiedades utilizadas	Ventajas del sensor	Ejemplos
Biosensor Óptico	Cambios en propiedades ópticas	Potenciación del cambio de índice de refracción, potenciación de transferencia de electrones	Gran constante dieléctrica, alta densidad, alto peso molecular	Mayor sensibilidad, mejora en la conductividad	Sensor de ADN con AuNPs: respuesta 1000 veces más sensible, tasa de transferencia de electrones con AuNPs: 5000/s, sin AuNPs: 700/s
Biosensor Electroquímico	Cambios en características eléctricas	Plataforma inmobilizadora, reacciones de catálisis	Biocompatibilidad, gran superficie, alta energía superficial, propiedades en la interfaz	Mejora en la sensibilidad y selectividad	Biosensor de glucosa con AuNPs: límite de detección 0.18 μ M, sensor NADH basado en AuNPs: disminución del sobrepotencial de 780mV sin mediador
Biosensor Piezoeléctrico	Cambios en la masa	Inmovilización de biomolécula, amplificación del cambio de masa	Biocompatibilidad, alta densidad, relación superficie-volumen	Mayor sensibilidad	Sensor de ADN con AuNPs como etiquetas: límite de detección de 10^{-16} mol/L

Biosensores ópticos basados en AuNPs

En este tipo de sensores, se da el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie (SPR). En este fenómeno, ondas de luz con una longitud de onda determinada son absorbidas por los electrones de superficie de las AuNPs (electrones de la banda de conducción), lo que induce una oscilación

colectiva [32]. Esta oscilación produce un dipolo oscilante a lo largo de la dirección del campo electromagnético de la luz, y alcanza su amplitud máxima a una frecuencia específica llamada SPR, lo que le da el nombre a esta propiedad [74].

La SPR, se traduce en la absorción de radiación electromagnética por parte de las nanopartículas en una determinada zona del espectro. Esta oscilación es debida a la diferencia neta de carga que se genera sobre los bordes de las partículas que actúa como una fuerza restauradora [32]. La intensidad de la banda de SPR y la longitud de onda dependen de factores como tipo de metal, tamaño de partícula, forma, estructura, composición y constante dieléctrica. En el caso de AuNPs de 20nm, la banda de absorción del SPR se establece alrededor de 520nm en la región visible, lo que provoca una dispersión de la luz visible de manera eficiente, dando como resultado suspensiones de nanopartículas de color rojo característico [32].

En la Figura 5.21, se observa el desplazamiento de la nube de electrones que forma la banda de conducción, producida por el desplazamiento relativo de los electrones respecto al núcleo y las fuerzas de Coulomb que tratan de restablecer el desplazamiento, induciendo el fenómeno de oscilación colectiva [74].

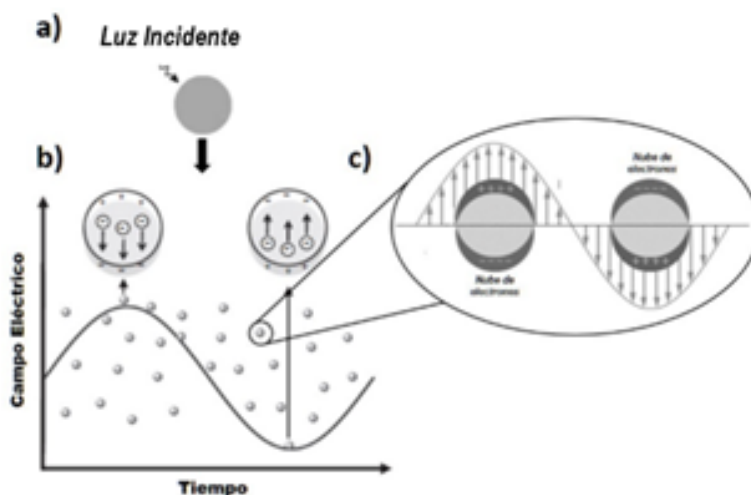


Figura 5.21: Resonancia del Plasmón de Superficie en AuNPs a) Luz incidente en la nanopartícula; b) campo eléctrico en el tiempo; c) nube electrónica en interacción (Fuente: [31]).

Síntesis de AuNPs

Se han descrito diferentes metodologías para la síntesis de nanopartículas de oro [75]. Factores como la forma y el tamaño dependerán del método seleccionado. Dentro de estos, se pueden encontrar tanto métodos físicos o estrategia top-down, como métodos químicos o estrategia bottom-up. Los métodos físicos consisten en la subdivisión de metales para la obtención de las nanopartículas, pero debido a su ineffectividad en la obtención de nanopartículas uniformes y pequeñas, se ha preferido sintetizarlas por métodos químicos [32].

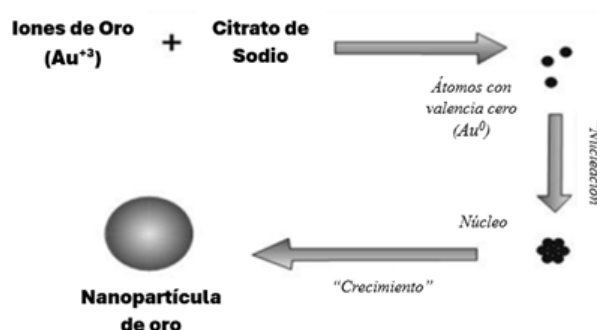


Figura 5.22: Esquema del proceso de síntesis nanopartículas de oro. El citrato de sodio y los iones de sodio entran en una reacción Redox, donde el citrato de sodio recude al oro con valencia +3 a átomos de valencia 0, esto permite la creación de semillas de oro y finalmente la formación de nanopartículas (Fuente: [32]).

Los métodos químicos, parten de la reducción de iones metálicos a sus correspondientes átomos, seguido por la agregación controlada de átomos. De esta forma, la síntesis de nanopartículas en disolución consta de: un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizante [32]. El método químico más usado para la síntesis de AuNPs es el método de Turkevich, el cual se basa en la reducción de cationes de oro III con citrato de sodio en medio acuoso, lo cual permite obtener nanopartículas de escala nanométrica [74].

Este método consiste en calentar a ebullición una disolución acuosa de HAuCl_4 y añadir una solución de citrato de sodio bajo agitación; pasados unos minutos se obtendrá una suspensión coloidal de oro de color rojizo [76]. Dentro de este proceso, el citrato de sodio además de actuar como agente reductor permite la estabilización de las nanopartículas. El mecanismo de formación de AuNPs se da inicialmente a través de la formación de átomos de oro metálico, los cuales se agrupan para formar semillas de alrededor de 1.5nm; este paso es conocido como nucleación. Después de esto, los átomos de oro adicionales se depositan en la superficie de las semillas ya formadas en donde se reducen a oro metálico, haciendo que las semillas crezcan en tamaño para finalmente formar las nanopartículas [31] (Figura 5.22).

5.2.3. Prueba de Flujo Lateral

Las pruebas de flujo lateral están compuestas por una serie de membranas de material poroso que se superponen y se adhieren a una tarjeta de soporte. El proceso de la prueba se inicia con la aplicación de la muestra en la almohadilla de muestra. La muestra se desplaza desde la almohadilla de muestra hacia la almohadilla del conjugado, que contiene el conjugado inmovilizado. Generalmente, esta conjugación se realiza utilizando nanopartículas de oro coloidal, aunque también se pueden emplear partículas de látex coloreadas, paramagnéticas o fluorescentes [33].

El analito interactúa con el conjugado mientras ambos migran hacia la zona de captura de la tira, donde se han inmovilizado componentes biológicos específicos como antígenos o anticuerpos en una disposición precisa para capturarlos [77]. Al encontrar estas moléculas, aparece una banda de

color que indica la presencia del analito. Al mismo tiempo, moléculas de control, como anticuerpos o antígenos se transforman en una banda de color en la línea de control. Esto demuestra que la prueba es válida ya que indica que las moléculas de control han reaccionado correctamente, validando así la funcionalidad del ensayo y la precisión de los resultados [77], [78]. Los reactivos en exceso continúan su recorrido pasando por la zona de captura hasta llegar a la almohadilla absorbente para luego proporcionar resultados visuales que son fáciles de interpretar [72]. La estructura de una prueba de flujo lateral se muestra en la figura 5.23.



Figura 5.23: Esquema estructural de una prueba de flujo lateral (Fuente: [33]).

Las pruebas de flujo lateral son ampliamente conocidas y se utilizan en diversos contextos, como las pruebas de embarazo o, en la actualidad, en la detección rápida de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 [33].

En el caso de la prueba de flujo lateral para la detección rápida de anticuerpos contra el SARS-CoV-2, el conjugado inmovilizado es una proteína que se une específicamente al virus SARS-CoV-2. Si el virus está presente en la muestra, se unirá al conjugado inmovilizado y formará un complejo. Este complejo se desplaza hacia la zona de captura de la tira, donde se han inmovilizado componentes biológicos específicos como anticuerpos en una disposición precisa para capturarlos. Al encontrar estas moléculas, aparece una banda de color que indica la presencia del virus. Al mismo tiempo, las moléculas de control, como anticuerpos específicos, se transforman en una banda de color en la línea de control, lo que demuestra que la prueba es válida ya que indica que las moléculas de control han reaccionado correctamente, validando así la funcionalidad del ensayo y la precisión de los resultados [79], [80], [81].

En el contexto de la detección rápida de anticuerpos contra el SARS-CoV-2, las pruebas de flujo lateral han demostrado ser muy precisas, produciendo resultados en tan solo 30 minutos y siendo más económicas que las pruebas de laboratorio de PCR. Estas pruebas son capaces de detectar anticuerpos contra el virus en la sangre del paciente, lo que indica la presencia de la infección por COVID-19 o la recuperación de esta. Además, estas pruebas son extremadamente rápidas, aportan resultados visuales fáciles de interpretar y son adecuadas para su uso en entornos con recursos limitados, lo que las hizo especialmente útiles en situaciones de emergencia sanitaria, como la pandemia de COVID-19 [79], [80].

Además, en el contexto de la prueba utilizada para detectar un embarazo, esta se basa en la detección de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) en la orina de la mujer, lo que indica un posible embarazo. El proceso de la prueba es similar al de las pruebas de flujo lateral para la detección de anticuerpos contra el SARS-CoV-2, donde la muestra se desplaza a través de la almohadilla del conjugado, interactuando con el conjugado inmovilizado, para posteriormente migrar hacia la zona de captura de la tira. En esta, se produce una banda de color que indica la presencia del analito. En el caso de las pruebas de embarazo, esta banda de color indicaría un

resultado positivo, mientras que en las pruebas de detección de anticuerpos contra el SARS-CoV-2, esta banda de color indicaría la presencia de anticuerpos contra el virus [33], [82].

5.3. Trabajos Relacionados

A continuación, se presentan trabajos relacionados con la problemática planteada:

- **Detección de VPH en muestras de orina de mujeres: ¿Una alternativa eficaz y precisa de las muestras cervicales? [83]**

En la actualidad, las pruebas de detección de VPH se hacen mediante la obtención clínica de células cervicales, con el fin de analizarlas e identificar la presencia del virus en estas. A pesar de la efectividad de estas pruebas, se ha mostrado interés en buscar otros métodos que involucren el auto-muestreo. Una prueba de ADN-VPH en orina podría ofrecer un método de muestreo no invasivo más accesible y aceptable en la prevención primaria y secundaria del cáncer de cuello uterino.

Las capas superficiales de las células de un carcinoma uterino son exfoliadas y se pueden mezclar con las secreciones del útero y cérvix, estas secreciones llegan a la vagina y se acumulan en la apertura de la uretra entre los labios menores. En consecuencia, el flujo inicial de orina, definido como orina de primera evacuación, recoge la mayor parte de estas secreciones, en la cual se puede analizar y detectar la infección de VPH.

Se presenta entonces una buena concordancia en la detección de VPH de alto riesgo entre la orina de primera evacuación y las muestras vaginales y cervicales. Sin embargo, la concentración de ADN-VPH que se encuentra en la muestra de orina aún puede ser limitada, por lo que una extracción y detección de ADN eficiente y sensible sigue siendo fundamental. Igualmente, la detección del VPH depende de la confiabilidad y sensibilidad de la prueba utilizada; actualmente ningún análisis del virus está especificado para la orina, por lo que se requiere más investigación. De esta forma, el presente artículo, permite comprender y explorar otros métodos de detección de VPH no invasivos, como el uso de la orina, los cuales deben de ser considerados en el contexto de diseño e implementación de una prueba auto-muestreo asequible a toda la población colombiana.

- **Consolidación de la tecnología para la fabricación de un biosensor con aplicación en la detección del VPH 16 buscando reducción de costos [84]**

En este trabajo se realizó la comparación y modificación de materiales como vidrio, policarbonato, acrílico poliestireno cristalino y PVC, para el diseño de un anterior prototipo de un microsistema fluido estático para la detección del VPH16. Esto se llevó a cabo mediante la elaboración de un biosensor utilizando nanopartículas de oro. En este estudio se realizaron pruebas de la eficacia y eficiencia del biosensor, en pruebas de campo y comparando su funcionamiento con las pruebas RT-qPCR y HC2.

Este estudio determinó la viabilidad y eficacia de usar acrílico para el diseño del dispositivo. Igualmente, se concluyó que existe una buena detección de VPH16 con el biosensor, así como

la posibilidad de que sea una alternativa dominante respecto a las pruebas estándar debido a que permite obtener grandes beneficios en comparación a las alternativas actuales como lo son la obtención de resultados en un menor tiempo, ventajas sobre el análisis y la posibilidad de realizar hasta 98 pruebas en simultáneo. Sin embargo, se propuso como trabajo futuro implementar la construcción de un transductor para el biosensor con el fin de que este sea manipulado por cualquier individuo y no necesite un especialista en su manipulación. La información y resultados de este estudio permiten tener un panorama base para la realización de una prueba portátil y de bajo costo para la detección del VPH.

- **Un biosensor electroquímico ultrasensible basado en grafeno/nanobarras de oro/politinionina para la detección de ADN del virus del papiloma humano [85]**

En este estudio se desarrolló con éxito un biosensor electroquímico ultrasensible para la detección de VPH mediante espectroscopia de impedancia electroquímica y voltametría de pulso diferencial. Para esto, se construyó un biosensor sin enzimas y sin etiquetas, basado en un electrodo de carbono (GCE) modificado por grafeno/nanobarras de oro/politinionina (G/ Au NR/PT). De esta forma, el grafeno ayuda al incremento de la superficie del electrodo y su conductividad; las nanobarras de Au permiten la inmovilización del ADN; y, por último, la politinionina cuenta con una buena capacidad de transferir electrones, lo que permite mejorar la sensibilidad y reducir el límite de detección del sensor.

Así mismo, se diseñaron dos sondas auxiliares para ensamblar una nanoestructura de ADN a larga distancia; en este caso el ADN objetivo podía conectarse a la sonda de captura en la superficie del electrodo. $[Ru(phen)_3]^{2+}$ se utilizó como indicador electroquímico, el cual se une con el grupo fosfato del ADN por medio de interacciones electrostáticas. Finalmente, se concluyó un excelente rendimiento del biosensor para la detección de ADN-VPH en un rango de 1×10^{-13} a 1×10^{-10} mol/L con un límite de detección de 4.03×10^{-14} mol/L.

- **Biosensor electroquímico de ADN para la detección del virus del VPH16 en muestras reales [86]**

Actualmente, el diagnóstico de CCU se realiza mediante evaluación por citología, sin embargo, estas técnicas tienen limitaciones debido a su inespecificidad. Otras pruebas basadas en técnicas moleculares como HC2 para VPH de alto riesgo, PapilloCheck o COBAS; muestran una excelente sensibilidad al virus, pero no distinguen entre los tipos de VPH y utilizan productos de PCR costosos y de tecnología específica. Debido a esto, este estudio ha desarrollado un biosensor de ADN electroquímico mediante el uso del aminoácido L-Cisteína como modificador de superficie para el proceso de inmovilización de biomoléculas en el electrodo de oro.

Igualmente, se utilizó el método de voltametría de pulso diferencial (DPV) para el análisis de la señal electroquímica. Para esto, se agregó una solución de azul de metileno (MB) al electrodo modificado y se midió su reducción electroquímica por DPV. Finalmente, se pudo concluir una alta sensibilidad a la detección de hibridación, obteniendo selectividad satisfactoria para VPH16.

- **Diseño de un biosensor de tipo flujo lateral para la detección de *Helicobacter pylori* y su factor de virulencia cagA [87]**

El proyecto se enfocó en el diseño de un biosensor de flujo lateral para la detección de *Helicobacter pylori* y su factor de virulencia cagA utilizando nanopartículas de oro como indicador colorimétrico. El proyecto se basa en la inmovilización de anticuerpos específicos para *H. pylori* y cagA en una tira de papel, y la detección de la presencia de estos antígenos en una muestra biológica mediante la aparición de una banda de color rojo en la zona de prueba de la tira de papel. Las nanopartículas de oro se utilizaron como indicador colorimétrico debido a su amplio rango de ligandos biológicos y orgánicos, facilidad de síntesis, modificación, transformación y una amplia banda de absorción en la región visible del espectro electromagnético.

- **Citobot: Desarrollo y validación clínica de un sistema portable para el tamizaje de cáncer de cuello uterino [88]**

Citobot es un dispositivo electrónico desarrollado por la Pontificia Universidad Javeriana Cali, Colombia, que utiliza inteligencia artificial para el tamizaje de cáncer de cuello uterino. El dispositivo reemplaza el espéculo vaginal tradicional y permite una citología cómoda y eficaz, promoviendo una mejor experiencia para las mujeres. Citobot funciona mediante la inspección visual con ácido acético (VIA) y la captura de imágenes de las células del cuello uterino, que son analizadas por un algoritmo de inteligencia artificial para detectar lesiones precancerosas.

- **Ensayo colorimétrico basado en AuNPs para la detección y cuantificación de azúcares [89]**

En este estudio, se presenta el diseño y la caracterización de un ensayo altamente sensible basado en nanopartículas de oro (AuNPs) para medir los niveles de azúcares en fluidos. Las AuNPs se funcionalizaron con ácido 4-mercaptobenzoico (4MBA) para modular la resonancia plasmónica superficial (SPR) y la absorción de energía fluorescente por las AuNPs. Se introdujo una concentración fija de fluoresceína junto con una muestra de fluido que contiene una cantidad determinada de azúcar. El mecanismo impulsor se identificó como una competencia cinética entre la fluoresceína y el sacárido que ocupa los sitios activos carboxílicos de los grupos funcionales en la superficie de la nanopartícula. Esto generó una respuesta colorimétrica en la solución de 4MBA-AuNP, de naranja a verde, visible a simple vista. La agregación de las AuNPs funcionalizadas debido al aumento de la concentración de azúcar se confirmó mediante espectroscopía UV-vis, identificada por un pico espectral de 620–675 nm. El límite de detección (LOD) fue $(55.8 \pm 1.1) \mu\text{M}$, con una curva de calibración altamente repetible en el rango de 0.09 a 2.45mM. La rentabilidad, rapidez y simplicidad del ensayo abren la puerta a múltiples aplicaciones en la detección y cuantificación de azúcares, incluida la ciencia de los alimentos. La plataforma sensorial se probó con éxito en soluciones de azúcares mixtos y se aplicó a muestras liofilizadas de fresas y kiwis, validándose los resultados mediante HPLC con detección de índice de refracción.

- **Inteligencia artificial para la detección de cáncer cervical: Revisión exploratoria 2009-2022 [90]**

Este estudio tuvo como objetivo proporcionar una síntesis integral de la literatura sobre la precisión diagnóstica de la inteligencia artificial en el diagnóstico temprano mediante imágenes del cáncer cervical. Siguiendo las pautas de la extensión para revisiones sistemáticas y metaanálisis de la declaración PRISMA para revisiones exploratorias (PRISMA-ScR), se realizó una búsqueda sistemática en las bases de datos de PubMed, Scopus y Google Scholar. Se identificaron un total de 32 estudios publicados entre 2009 y 2022, que utilizaron varios algoritmos de IA como máquina de soporte vectorial (SVM), clasificador de bosques aleatorios, vecinos más cercanos, perceptrón multicapa, C4.5, Naïve Bayes, AdaBoost, XGboosts, campos aleatorios condicionales, clasificador de Bayes, red neuronal convolucional (CNN), ResNet, YOLO+EfficientNetB0 y grupo de geometría visual (VGG). Notablemente, los métodos SVM y de Deep Learning (CNN, ResNet, VGG) demostraron el mejor rendimiento diagnóstico, alcanzando una precisión superior al 97%. Finalmente, se identificó que el uso de inteligencia artificial para el tamizaje de cáncer cervical tiene un futuro prometedor, pero se requiere de más investigación en esta área.

- **Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas y nanocompuestos que contienen las mimas, para la medición de sacarosa o almidón en células [91]**

El objetivo central de este estudio fue diseñar y desarrollar biosensores altamente precisos y selectivos utilizando nanopartículas metálicas, específicamente nanopartículas de oro funcionalizadas con ligandos poliméricos, para la medición específica de la concentración de sacarosa o almidón en el fluido intracelular. Este enfoque se fundamenta en la síntesis de nanopartículas de oro mediante la reducción química del ácido cloroáurico con citrato, el cual actúa como agente estabilizante. Los aniones de citrato proporcionan una carga negativa en la superficie de las nanopartículas, manteniéndolas dispersas en la solución mediante repulsión electrostática. Adicionalmente, se realiza la funcionalización de las nanopartículas mediante ácido 12-tiol-dodecanoico, el cual permite la identificación del anillo de uracilo de la UDP-glucosa mediante la reactividad química con los átomos de carbono C-5 y C-6 de su estructura. A su vez, este trabajo presenta la aplicación de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), la cual permitió medir con precisión la distancia entre las nanopartículas funcionalizadas, aprovechando las interacciones dipolo-dipolo entre moléculas y cargas opuestas en un rango aproximado de 10 a 100 Angstroms, lo que facilita la determinación exacta de la concentración de los azúcares dentro de las células.

Materiales y Métodos

6.1. Materiales y reactivos

6.1.1. Materiales Generales

- Balón de fondo plano 100 mL (SCHOTT DURAN)
- Beakers (200 mL, 100 mL, 50 mL, 25 mL)
- Condensador
- Cajas Petri
- Pipetas (1000 μ L, 200 μ L, 20 μ L, 2 μ L)
- Pinzas
- Termómetro
- Tubos Falcon 10 mL
- Tubos Falcon 50 mL
- Tubos Eppendorf 1.5 mL
- Tubos Eppendorf 2 mL

6.1.2. Reactivos

- Tri-Sodio Citrato Dihidratado (Merck, USA)
- Ácido Cloroáurico trihidratado (Sigma-Aldrich, USA)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, USA)
- CTAB (Sigma-Aldrich, USA)
- Anticuerpos VPH16-L1 y VPH18-L1 (Abcam, Reino Unido)
- Proteínas recombinantes VPH16-L1, VPH18-L1, VPH16-E6, VPH16-E7, VPH18-E7 (Abcam, Reino Unido)

- Proteína recombinante SARS-CoV-2 Spike RBD (Sino Biological Inc., China)
- BSA (Sigma-Aldrich, USA)
- SDS (Sigma-Aldrich, USA)
- PBS (Sigma-Aldrich, USA)
- Ácido Bórico (Merck, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)
- Sucrosa (Sigma-Aldrich, USA)

6.1.3. Equipos e Instrumentación

- Balanza analítica de precisión (WTC 2000, RADWAG Balances & Scales, USA)
- Plancha de agitación y calentamiento (Thermo Scientific, USA)
- Campana de extracción de gases (JPCEGH120PP-TOPA-A220, JPinglobal, USA)
- Evaporador Centrifugo (Concentrator Plus Vacufuge, Eppendorf, Germany)
- Centrifuga Refrigerada de Mesa (Universal 320R, Hettich Lab Technology, USA)
- Sonicador de ultrasonido (Elmasonic Easy 60H, Elma, Suiza)
- Horno Universal (UN110, Memmert, Alemania)
- Espectrofotometro UV-Vis Varioskan LUX (VL000D0, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Analizador de tamaño de partícula (SZ100, HORIBA Scientific, USA)
- Shaker Incubadora Orbital (2021, JPINGLOBAL, USA)
- Microscopio electrónico de barrido por emisión de campo (FE-SEM) (CLARA, TESCAN, USA)

6.2. Desarrollo Experimental

6.2.1. Síntesis de AuNPs

La síntesis de nanopartículas de oro se llevó a cabo usando el método desarrollado por J. Turkevich [92] para la síntesis de AuNPs. Este involucra la síntesis en solución acuosa de oro metálico partiendo de ácido cloroáurico (HAuCl_4) y citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) como agente reductor y estabilizante. Para esto, 9.378 mL de solución de citrato de sodio trihidratado 2.13 mM fueron calentados a 80°C bajo agitación a 1150rpm por 10 minutos, para posteriormente adicionar una

alícuota de 66.4 μL de solución de ácido cloroáurico a 25.2 mM y dejar en reacción 30 minutos más. De esta forma, se obtiene una suspensión de AuNPs en forma coloidal de color rojizo la cual fue finalmente concentrada usando el evaporador centrifugo Concentrator Plus Vacufuge de Eppendorf, hasta obtener una densidad óptica mayor a 0.35. A continuación, se presenta la ecuación de la reacción química producida para la formación de nanopartículas de oro y en la figura 6.1 se muestra el esquema del proceso de síntesis de AuNPs.

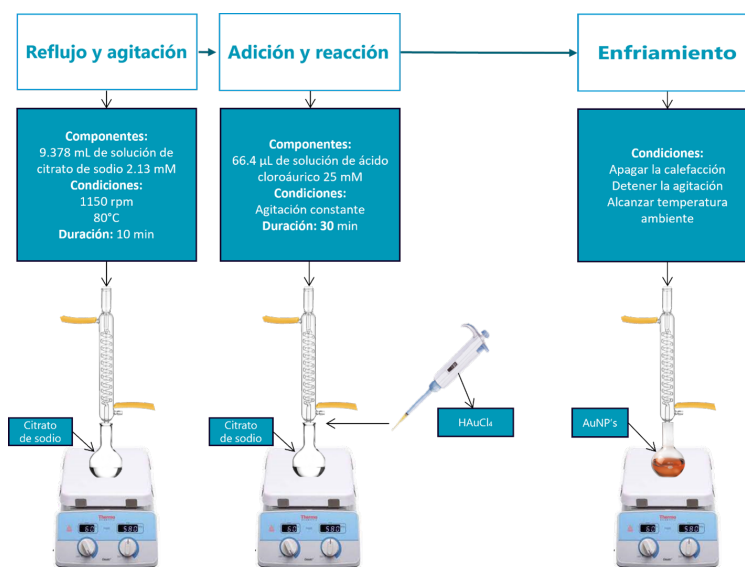
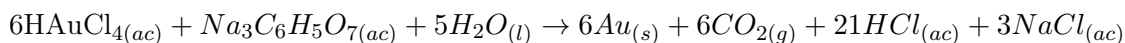


Figura 6.1: Síntesis de AuNPs por método inverso.

6.2.2. Funcionalización AuNPs

La funcionalización de AuNPs se llevó a cabo mediante la incorporación de distintos agentes estabilizantes para prevenir la aglomeración de estas y la efectiva unión del anticuerpo VPH16-L1 o VPH18-L1. Para esto, 18.4 μL de una solución de Tween 80 al 10% se agregaron a 981.6 μL de la suspensión de AuNPs previamente sintetizadas como se describe en la sección 6.2.1. Posteriormente se agitó en vortex por 10 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después la suspensión de AuNPs se centrifugó a 16,000 rpm durante 10 minutos a 20 °C, se retiró el sobrenadante y se suspendieron las AuNPs en 1 mL de agua. A continuación, se agitó en vortex por 10 segundos y se sometió a ultrasonido por 10 minutos. Luego se centrifugó nuevamente la suspensión a 16,000 rpm durante 10 minutos a 20 °C, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de CTAB 1 mM. Posteriormente la suspensión de AuNPs se agitó en vortex por 10 segundos, se sometió a ultrasonido por 10 minutos y se agitó nuevamente en vortex por 10 segundos. Después de incubación por 30 minutos a temperatura ambiente, la suspensión fue centrifugada a 16,000 rpm durante 10

minutos a 20 °C y el sobrenadante descartado. Finalmente, las AuNPs se suspendieron en 1 mL de agua, se agitaron por 10 segundos y se realizó una mezcla de 998.5 μL de la suspensión de AuNPs con 1.5 μL del anticuerpo que se agitó por 10 segundos para obtener AuNPs funcionalizadas con el anticuerpo para VPH16-L1 o VPH18-L1 después de 1 hora de incubación.

6.2.3. Caracterización AuNPs

La caracterización de las AuNPs obtenidas se realizó a través de espectrofotometría en el rango visible (400-800 nm) para la obtención de la absorbancia y la longitud de onda en el pico de máxima absorción usando el espectrofotómetro UV-Vis Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific). El tamaño de partícula, la dispersión (Đ) y la carga superficial o potencial z (ζ), se determinaron con el analizador de tamaño de partícula (HORIBA Scientific SZ100). La morfología y el tamaño de las nanopartículas fue corroborada con microscopía electrónica de barrido usando el microscopio (FE-SEM) TESCAN – modelo CLARA.

6.2.4. Caracterización del Proceso de funcionalización y detección

La caracterización del proceso de funcionalización y detección se llevó a cabo mediante cinco experimentos distintos, siguiendo el protocolo establecido en la sección 6.2.2. En cada experimento, se verificaron los pasos de adición de surfactante Tween 80, CTAB, anticuerpo y proteína, utilizando el espectrofotómetro UV-Vis Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) para medir la absorbancia y la longitud de onda, lo que permitió evaluar la formación y estabilidad de las nanopartículas funcionalizadas. Adicionalmente, el tamaño de las partículas, su índice de dispersión (Đ) y la carga superficial (ζ), se determinaron utilizando el analizador de tamaño de partícula HORIBA Scientific SZ100. Estos métodos combinados permitieron una caracterización precisa del proceso de funcionalización, asegurando la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados obtenidos.

6.2.5. Ensayo Flujo Lateral

Para los ensayos de flujo lateral se usó membrana de nitrocelulosa FF120HP, almohadilla de conjugado Grade 6615, almohadilla de muestra Grade 8964 y almohadilla de absorción Grade 222 proporcionadas dentro del kit Lateral Flow Mini Materials Kit de DCNOVATIONS (USA) para ensayos de flujo lateral. Asimismo, se optó por el método competitivo de LFA, donde en la línea de prueba se inmovilizan las proteínas, VPH18-L1 o VPH16-L1, y en la línea de control se inmoviliza el anticuerpo secundario, en este caso, la Inmunoglobulina G de ratón (IgG). De esta forma, en una prueba positiva, la proteína de VPH presente en la muestra reacciona con las AuNPs funcionalizadas en la almohadilla de conjugado. Así, el complejo AuNPs-Proteína migra hasta la membrana de nitrocelulosa, donde ya no podría unirse con la proteína inmovilizada de la línea de prueba, y en su lugar la muestra se desplaza para interactuar solamente en la banda de control. Por el contrario, en una prueba negativa, donde la muestra no tiene proteína VPH18-L1 o VPH16-L1, esta migrara hasta la membrana de nitrocelulosa, desplazando las AuNPs libres, que diferente a una prueba positiva, si interactúan tanto con la proteína de la línea de prueba, como con el anticuerpo en la

línea de control. De esta forma, como se observa en la figura 6.2, una prueba positiva presenta solo la línea de control, mientras que una prueba negativa presenta las dos líneas, de prueba y control.

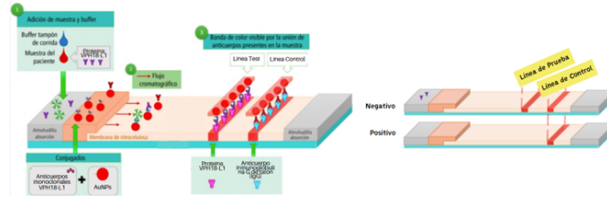


Figura 6.2: Esquema ensayo de flujo lateral por método competitivo.

Para la realización de los ensayos fue necesario realizar una preparación previa de la membrana de conjugado, de la membrana de nitrocelulosa y de la membrana de muestra previo al ensamblaje del dispositivo. Para esto, la membrana de muestra se cortó con dimensiones 10 mm x 5 mm, la almohadilla de conjugado a 15 mm x 5 mm, la membrana de nitrocelulosa a 20 mm x 5 mm, y la almohadilla de absorción a 15 mm x 5 mm. Brevemente, para la membrana de nitrocelulosa se agregó 2 μL de proteína VPH16-L1 o VPH18-L1 a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para formar la línea de prueba y 2 μL de anti-IgG 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para formar la línea de control. Posteriormente, se sumergió la membrana en una solución de BSA al 2% en PBS durante 20 minutos y se lavó 2 veces con un buffer de Na_2HPO_4 5 mM, pH 7.5 con 0.025% de Tween 20 durante 15 minutos bajo agitación orbital a 250 rpm (Figura 26). Para la membrana de conjugado, se evaporó 1 mL de suspensión de AuNPs conjugadas con el anticuerpo en el evaporador centrífugo Concentrator Plus Vacufuge de Eppendorf (Alemania) durante 1 hora y 15 minutos a 60°C en modo V-AQ, para luego suspender las AuNPs nuevamente en 0.5 mL de buffer borato 2 mM a pH 7 con 5% de sacarosa, en donde se sumergió la almohadilla de conjugado por 15 minutos (Figura 6.3). La almohadilla de muestra se sumergió en un buffer borato 1M a pH 9.5 complementado con 1% de BSA y 0.025% de Tween 20 durante 15 minutos. Finalmente, todas las membranas se secaron en una estufa (UN110, Memmert, Alemania) por 2 horas a 37.5°C para su ensamblaje en el dispositivo de flujo lateral.

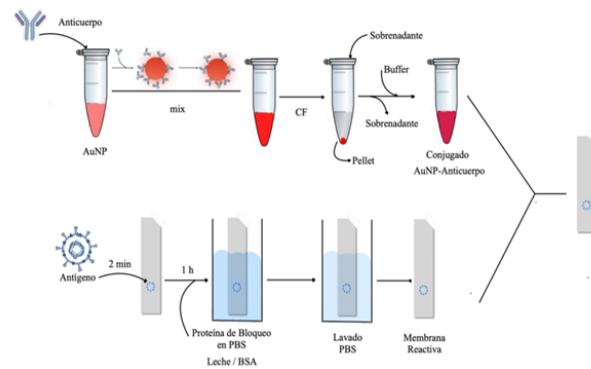


Figura 6.3: Esquema proceso de preparación almohadilla de conjugado y membrana de nitrocelulosa. (Fuente: [34])

6.2.5.1. Determinación de sensibilidad del dispositivo de flujo lateral

Para determinar la sensibilidad del dispositivo de flujo lateral, se realizó el procedimiento de ensamble descrito en la sección 6.2.4. Posteriormente se agregó 50 μL de una muestra simulada al reservorio destinado a la muestra en el dispositivo de flujo lateral. La muestra simulada fue preparada disolviendo la proteína VPH16-L1 o VPH18-L1 en una solución de PBS 1x a concentraciones crecientes comprendidas entre 2 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.2.5.2. Determinación de selectividad del dispositivo de flujo lateral

Para determinar la selectividad del dispositivo de flujo lateral, se realizó el ensamblaje del LFA de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 6.2.4 usando nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo para VPH16-L1 o para VPH18-L1. Posteriormente se agregó 50 μL de muestra simulada usando diferentes proteínas en el compartimiento de muestras del LFA. Las muestras simuladas se prepararon disolviendo las proteínas VPH16-E6, VPH16-E7, VPH16-L1, VPH18-L1, VPH18-E7, BSA o proteína Spike en PBS 1x a una concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.2.6. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico y con el motivo de mantener el tamaño de las AuNPs en 20 nm, se uso un diseño experimental para el que se utilizó el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XIX. Haciendo uso de este software, se llevó a cabo un diseño experimental por medio de la metodología de superficie de respuesta (MSR) en el cual se consideraron 3 factores experimentales y 3 variables respuesta que fueron: tamaño de las AuNPs, el potencial z (ζ , carga superficial) y la dispersión (D). Los experimentos para la caracterización de la funcionalización y detección con nanopartículas de oro fueron realizados 5 veces y el análisis estadístico fue realizado con Origin Pro Version 2024b.

La síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) de 20 nm es fundamental para la fabricación del dispositivo, ya que experimentos preliminares de funcionalización han demostrado que este tamaño es el más adecuado para la detección del analito. Las AuNPs de 20 nm proporcionan una señal más clara y una mayor eficiencia en la conjugación con anticuerpos específicos del analito. Por lo tanto, es esencial garantizar una síntesis reproducible y precisa de AuNPs de 20 nm para asegurar un proceso de fabricación eficiente y fiable del dispositivo.

6.2.7. Proceso general para la elaboración del dispositivo de flujo lateral

Para obtener finalmente el dispositivo de flujo lateral, es esencial seguir los procesos y métodos descritos anteriormente de manera sistemática. Estos pasos se presentan de forma visual y organizada en la Figura 6.4.

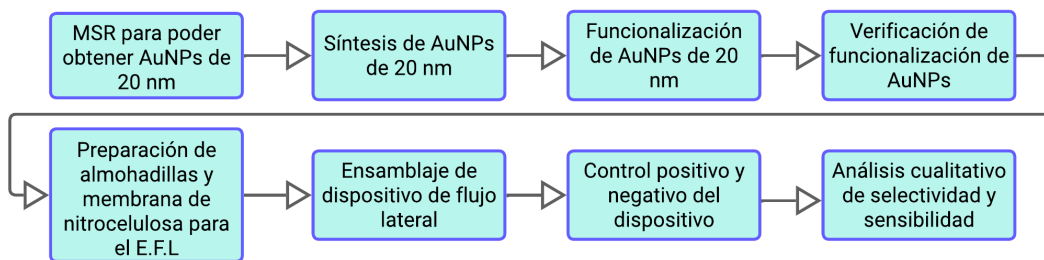


Figura 6.4: Paso a paso para la obtención del dispositivo de flujo lateral

Resultados y Discusión

7.1. Síntesis de AuNPs haciendo uso de la metodología de superficie de respuesta

La síntesis de nanopartículas de oro se llevó a cabo por medio del método Turkevich [92]. Para conocer mejor el sistema de síntesis de AuNPs y controlar el tamaño se hizo uso del diseño experimental, específicamente de la metodología superficie de respuesta a través de un diseño compuesto central (MSR-DCC). Este experimento involucró 3 factores experimentales: Concentración de citrato de sodio, concentración de HAuCl₄ y velocidad de agitación con 3 niveles cada uno. Como variables de respuesta se establecieron el tamaño, la dispersión (\mathfrak{D}) y el potencial Z (ζ). El experimento constó de 19 tratamientos diferentes incluyendo 5 puntos centrales, fue completamente aleatorizado y rotatable. En el cuadro 7.1 se muestran los factores y los niveles usados en el diseño experimental y en el cuadro 7.2 se muestran las respuestas obtenidas luego de ejecutar los tratamientos del diseño.

Cuadro 7.1: Atributos de diseño experimental de superficie de respuesta.

Factores	Nivel bajo	Nivel alto	Unidades	Continuo
Concentración de Citrato de Sodio	1.5	2.5	mM	Sí
Concentración de HAuCl ₄	0.141	0.191	mM	Sí
Velocidad de agitación	900	1400	rpm	Sí

Cuadro 7.2: Tratamientos del diseño experimental de superficie de respuesta.

Tratamiento	Concentración de Citrato de Sodio (mM)	Concentración de HAuCl ₄ (mM)	Velocidad de agitación (rpm)	Tamaño (nm)	Potencial Z (ζ) (mV)	(λ_{SPR}) (nm)	A_{SPR}	Índice de dispersión (\mathfrak{D})
1	2.5	0.191	900	21.3	-76.4	521	0.1992	0.08
2	1.159	0.166	1150	18.4	-81.3	520	0.1897	0.08
3	2	0.1239	1150	26.1	-85.4	525	0.1925	0.12
4	1.5	0.141	1400	23.7	-111.7	523	0.2004	0.09
5	2	0.166	1150	22	-84.2	522	0.2025	0.09
6	1.5	0.191	1400	24	-45.2	523	0.2192	0.09
7	2	0.166	1150	19.7	-78.9	520	0.2138	0.14
8	2.84	0.166	1150	28.9	-61.9	526	0.2238	0.1
9	2	0.166	1150	21.8	-90.3	521	0.2147	0.1
10	2.5	0.141	900	26.5	-44.8	525	0.2001	0.09
11	2	0.166	730	20.5	-78.5	521	0.1931	0.06
12	1.5	0.191	900	18.4	-79.9	520	0.1894	0.05
13	1.5	0.141	900	22.6	-98.2	522	0.2143	0.07

Continúa en la siguiente página

Cuadro 7.2 – Continuación de la parte anterior

Tratamiento	Concentración de Citrato de Sodio (mM)	Concentración de HAuCl_4 (mM)	Velocidad de agitación (rpm)	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)	(λ_{SPR}) (nm)	A_{SPR}	Índice de dispersión (\AA)
14	2	0.166	1500	25	-65.7	525	0.2226	0.08
15	2	0.208	1150	18.9	-69.2	520	0.1942	0.05
16	2.5	0.141	1400	25.4	-67.8	525	0.1994	0.08
17	2	0.166	1150	22.3	-77.5	522	0.1984	0.08
18	2.5	0.191	1400	23.2	-83.7	523	0.2133	0.07
19	2	0.166	1150	20.4	-80.1	520	0.1998	0.13

Al ejecutar todos los tratamientos del diseño experimental y analizar la variable respuesta tamaño, se observó el cumplimiento de todos los supuestos del diseño: Prueba de normalidad válida, varianza constante de términos de error e independencia de experimentos [21]. El supuesto de normalidad se pudo corroborar con la prueba estadística de W de Shapiro-Wilk en donde el valor de p obtenido fue de 0.760219, además, la gráfica de probabilidad normal de residuos mostrada en la figura 7.1 muestra la tendencia normal de los datos alrededor de la recta. El supuesto de independencia se cumple debido a que el software utilizado para el diseño experimental arroja una aleatorización y los experimentos son corridos de acuerdo con esta [21]. Esta afirmación es corroborada por la gráfica de Residuos vs Orden de Ejecución mostrada en la figura 7.2.

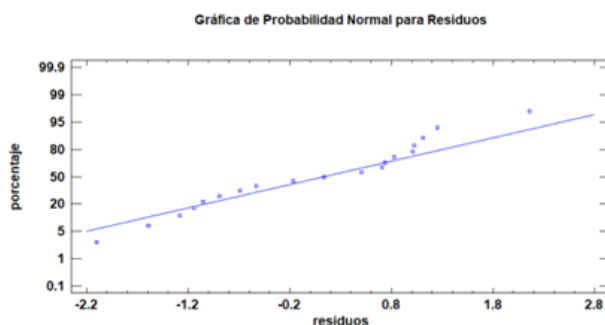


Figura 7.1: Gráfica de probabilidad normal de residuos para tamaño.

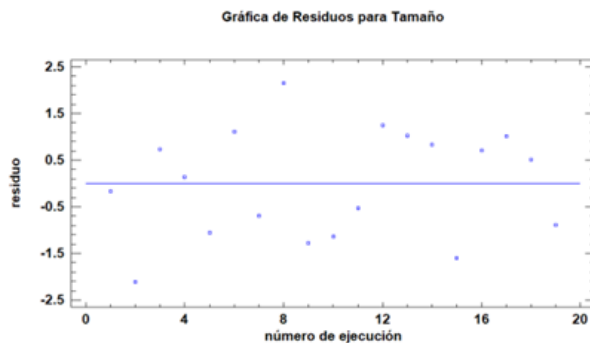


Figura 7.2: Gráfica de Residuos vs Orden de Ejecución para tamaño.

7.1. Síntesis de AuNPs haciendo uso de la metodología de superficie de respuesta 53

La prueba de falta de ajuste tuvo un valor de 0.1556 y el valor de R cuadrado para la variable tamaño fue de 84.3109, lo que indica que el diseño experimental permite predecir el comportamiento del sistema y proporcionar predicciones acertadas. El análisis de varianza se muestra en el cuadro 7.3.

Cuadro 7.3: Análisis de varianza para variable de salida.

Fuente	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración de Citrato de Sodio	47.1096	1	47.1096	37.01	0.0037
B: Concentración de HAuCl4	40.0934	1	40.0934	31.5	0.005
C: Velocidad de agitación	17.7826	1	17.7826	13.97	0.0202
AA	9.39368	1	9.39368	7.38	0.0532
AB	1.53125	1	1.53125	1.2	0.3343
AC	4.35125	1	4.35125	3.42	0.1382
BB	2.4122	1	2.4122	1.89	0.2407
BC	7.03125	1	7.03125	5.52	0.0785
CC	4.08645	1	4.08645	3.21	0.1477
Falta de ajuste	19.0198	5	3.80397	2.99	0.1556
Error puro	5.092	4	1.273		
Total (corr.)	153.685	18			

El análisis de varianza permitió identificar los factores que influyen en la síntesis de AuNPs. Los factores con un valor P menor a 0.05 indican significancia estadística y por lo tanto tienen influencia en el proceso. En el diagrama de Pareto de la figura 7.3, se observa de manera gráfica el análisis de varianza y permite interpretar el comportamiento del sistema. Para la concentración de citrato de sodio se puede observar que esta ejerce un efecto positivo en el proceso de síntesis indicando que un incremento en la concentración ocasiona un incremento de tamaño de las nanopartículas en suspensión, mientras que un incremento en la concentración del HAuCl4 ocasiona una disminución de tamaño de las nanopartículas. La velocidad de agitación por otro lado produce un aumento en el tamaño de las nanopartículas cuando se incrementa, sin embargo, su efecto a pesar de ser considerable no es igual de fuerte que el de la concentración de citrato de sodio. También es importante señalar que las interacciones entre los factores no tienen un impacto significativo en la síntesis de AuNPs, esto implica que al variar dos factores simultáneamente, no se va a observar un cambio notable en el tamaño de las AuNPs.

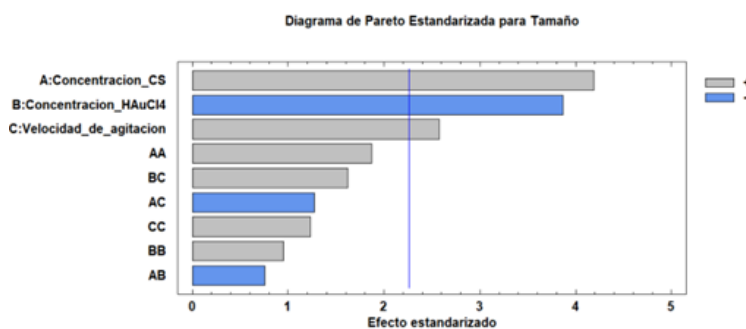


Figura 7.3: Diagrama de pareto para variable de salida.

Haciendo uso del modelo matemático obtenido por medio de la MSR para la variable tamaño (Ecuación 1) se procedió a realizar la optimización de la variable tamaño en búsqueda de las condiciones que permitieran obtener un tamaño aproximado de 20 nm. En el cuadro 7.4 se observan las condiciones óptimas para síntesis de nanopartículas de oro de 20 nm predichas por el modelo obtenido con la MSR.

$$\begin{aligned} \text{Tamaño} = & 67.9011 + 3.09459 \cdot \text{Concentracion}_{\text{CS}} - 393.156 \cdot \text{Concentracion}_{\text{HAuCl}_4} - 0.0310315 \cdot \\ & \text{VelocidadAgitacion} + 3.30393 \cdot \text{Concentracion}_{\text{CS}}^2 - 35.0 \cdot \text{Concentracion}_{\text{CS}} \cdot \text{Concentracion}_{\text{HAuCl}_4} - 0.0059 \cdot \\ & \text{Concentracion}_{\text{CS}} \cdot \text{VelocidadAgitacion} + 669.044 \cdot \text{Concentracion}_{\text{HAuCl}_4}^2 + 0.15 \cdot \text{Concentracion}_{\text{HAuCl}_4} \cdot \\ & \text{VelocidadAgitacion} + 0.00000987176 \cdot \text{VelocidadAgitacion}^2 \end{aligned}$$

Ecuación 1: Modelo matemático para el tamaño de las AuNPs según la MSR.

Cuadro 7.4: Factores y condiciones del experimento

Factor	Bajo	Alto	Óptimo	Condiciones usadas en el laboratorio
Concentración de Citrato de Sodio	1.159 mM	2.840 mM	1.77408 mM	1.774 mM
Concentración de HAuCl ₄	0.124 mM	0.208 mM	0.175038 mM	0.175 mM
Velocidad de agitación	730 rpm	1500 rpm	1132.370 rpm	1130 rpm

Al realizar la síntesis por triplicado de acuerdo con las condiciones predichas por la MSR, se observó un tamaño promedio de 21.6 nm (cuadro 7.5) indicando una diferencia con respecto al valor objetivo del 8%. Esta diferencia radica en que no es posible replicar al 100% las condiciones arrojadas por la MSR, ya que hay limitaciones instrumentales además del error aleatorio y la propagación de incertidumbre generada por el uso del instrumental durante los procesos implicados en la síntesis de las nanopartículas como la preparación de soluciones y el pesaje de los reactivos. Aun así, la predicción obtenida es acertada ya que la diferencia con respecto al valor obtenido luego de replicar las condiciones es baja y permite obtener un tamaño muy cercano al tamaño fijado como objetivo. En El cuadro 7.5 se muestran los resultados obtenidos para las síntesis de AuNPs por triplicado usando las condiciones de valor óptimo provenientes de la MSR.

Cuadro 7.5: Triplicado de síntesis de AuNPs con condiciones según diseño experimental en el software STATGRAPHICS Centurion XIX.

Réplica	Tamaño (nm)	A _{SPR}	λ _{SPR} (nm)	Potencial Z (ζ) (mV)	Índice de dispersión (Đ)
1	21.7	0.1992	521	-77.3	0.08
2	21.7	0.2148	521	-89.2	0.09
3	21.5	0.1998	521	-80.8	0.07
Promedio	21.6	0.2046	521	-79.4	0.08

En cuanto a dispersión de las nanopartículas, ésta mostro ser baja con valores menores a 0.15 como se observa para los resultados obtenidos para la síntesis del valor óptimo en el cuadro 7.4 y en los resultados del diseño experimental mostrados en el cuadro 7.3 indicando que el tamaño de las nanopartículas sintéticas es uniforme [93].

7.1. Síntesis de AuNPs haciendo uso de la metodología de superficie de respuesta 55

Con respecto a la carga superficial, no se observó una distribución normal de los datos indicando que el modelo generado a través de la MSR no predice el comportamiento del sistema para la variable respuesta carga. Sin embargo, en todos los casos se observó una magnitud de la carga obtenida mayor, en valor absoluto, de 50 mV indicando que las AuNPs son estables y que su mecanismo de estabilización se da principalmente por repulsiones electrostáticas [94, 95]. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el diseño experimental a través de la MSR y haciendo unas pequeñas variaciones en la concentración de citrato de sodio y ácido cloroáurico se establecieron las condiciones que permitieron establecer el protocolo de síntesis de AuNPs con un tamaño de 20 nm tal y como se describió en la sección 6.2.1, en el cuadro 7.6 se muestran los resultados obtenidos al realizar diferentes síntesis usando el protocolo establecido. Finalmente, la morfología de las nanopartículas sintetizadas fue corroborada usando el microscopio electrónico de barrido (Figura 7.5) con el cual se observaron nanopartículas con un tamaño promedio de 20.62 nm lo que concuerda con los resultados obtenidos por DLS (cuadro 7.6).

Cuadro 7.6: Síntesis de AuNPs con protocolo establecido.

# de Síntesis	λ_{SPR} (nm)	A_{SPR}	Tamaño (nm)	Índice de dispersión (Đ)	Potencial Z (ζ) (mV)
1	519.33	0.21	19.80	0.16	-86.00
2	519.33	0.22	19.90	0.11	-76.90
3	520.33	0.22	23.40	0.08	-82.80
4	520.33	0.20	21.30	0.08	-69.20
5	519.67	0.20	18.70	0.10	-79.90
6	519.67	0.19	22.90	0.10	-86.50
7	521.00	0.23	20.50	0.09	-94.60
8	520.00	0.19	20.70	0.05	-95.40
9	519.67	0.20	20.41	0.10	-85.23
Promedio	519.95	0.20	20.84	0.09	-84.05

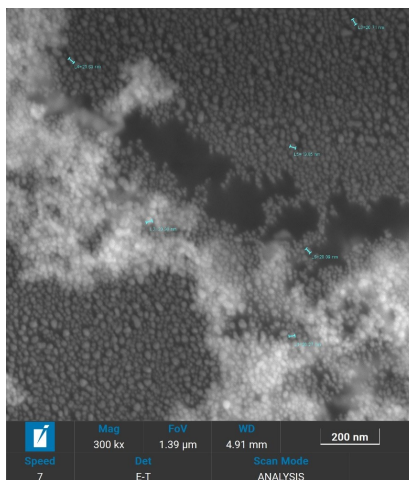


Figura 7.5: Caracterización de AuNPs por microscopía electrónica de barrido (SEM) (CLARA, TESCAN).

7.2. Funcionalización de AuNPs – Nanobiosensor colorimétrico

Los resultados obtenidos en la funcionalización de AuNPs siguiendo el protocolo establecido por el Instituto iÓMICAS fueron exitosos al utilizarse las AuNPs sintetizadas con un tamaño aproximado de 20 nm las cuales fueron estabilizadas previamente. Esta estabilización se llevó a cabo con el surfactante no iónico Tween 80, el cual permitió obtener nanopartículas funcionalizadas con los anticuerpos que fueron estables durante y después del proceso de funcionalización. El efecto estabilizante del Tween 80 sobre las AuNPs radica en su capacidad para formar una capa monomolecular alrededor de estas, proporcionando estabilidad ya que evita la agregación de las partículas debido a su naturaleza anfifílica y su capacidad para interactuar tanto con el agua como con la superficie de las nanopartículas [96], [97].

Al implementar el protocolo de funcionalización descrito en la sección 6.2.2, se pudo observar que efectivamente este permitió detectar las proteínas VPH16-L1 y VPH18-L1, ya que se obtuvo un cambio de color en la suspensión de las nanopartículas al entrar en contacto con la proteína objetivo. Las AuNPs funcionalizadas con el anticuerpo poseen un color rojo característico en suspensión y al entrar en contacto con la proteína la suspensión se torna de color violeta (Figura 7.6). Esto es corroborado al tomar el espectro de absorbancia antes y después de adicionar la proteína objetivo a la suspensión de nanopartículas. En la figura 7.7 se observan los espectros de la prueba de detección para la proteína VPH16-L1. Inicialmente se observa las AuNPs funcionalizadas con el anticuerpo Anti-VPH16-L1 en donde el pico de máxima absorción se establece alrededor de 520 nm en la región visible, cuando las AuNPs funcionalizadas entran en contacto con la proteína el tamaño de estas cambia y se da el fenómeno de desplazamiento a hacia el rojo o “redshift”, por lo que se observa un pico de máxima absorción a 580 nm, lo que ocasiona que estas transmitan el color violeta observado en la figura 7.6 [32].

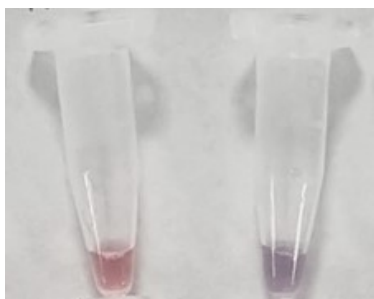


Figura 7.6: Nanopartículas funcionalizadas vs nanopartículas en presencia de proteína.

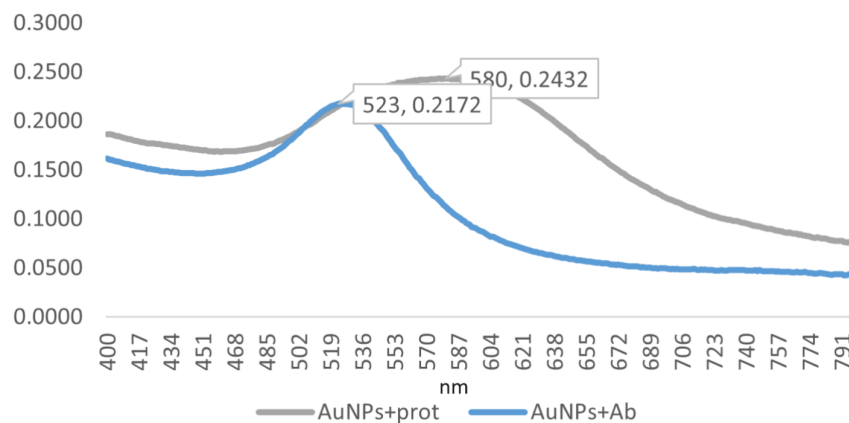


Figura 7.7: Gráfica de absorción y longitud de onda para AuNPs funcionalizadas con Anti-VPH16-L1 y prueba de detección para proteína VPH16-L1.

Con el fin de conocer las características de la modificación estructural de las AuNPs durante todo el proceso de funcionalización y detección, se desarrolló la caracterización de cada uno de los pasos antes, durante y después de la funcionalización y posterior detección usando el anticuerpo y la proteína para VPH16-L1. Para esto se realizó la medición de tamaño, carga superficial, índice de dispersión, longitud de onda de máxima absorción y la absorbancia asociada.

Inicialmente, uno de los aspectos más relevantes dentro del protocolo de funcionalización, es el cambio del tamaño de las AuNPs durante los distintos pasos. En la figura 7.8 y en El cuadro 7.7, se puede observar cómo al modificar las AuNPs con los agentes estabilizantes Tween 80 y CTAB estas incrementan su tamaño pasando de 21.6 nm con las AuNPs a 25.14 nm con Tween 80 y a 30.68 nm con CTAB. Esto indica que efectivamente hay una modificación superficial de las AuNPs y que las moléculas estabilizantes se acoplan a la superficie de estas incrementando su diámetro y por lo tanto su tamaño [34]. Al funcionalizar las nanopartículas con el anticuerpo Anti-VPH16-L1, el tamaño de estas cambia a 27.46 nm y es incrementando de manera significativa al detectar la proteína VPH16-L1 pasando a ser de 500.48 nm en promedio. Este cambio en el tamaño en la interacción con la proteína, probablemente se deba a que las proteínas en suspensión generan agregados, los cuales interaccionan con las AuNPs, formando partículas de mayor tamaño. Esto corrobora que efectivamente el cambio de color de la suspensión de nanopartículas es debido a un incremento en el tamaño de las AuNPs al formar un complejo entre las nanopartículas funcionalizadas y la proteína.

Cuadro 7.7: Caracterización del tamaño de las AuNPs durante la funcionalización y detección con VPH16-L1.

# Exp.	AuNPs	S.D	Tween 80	S.D	CTAB	S.D	Anticuerpo	S.D	Proteína	S.D
1	21.5	0.2	24.6	0.2	29.5	0.4	31.8	1.4	486.1	65.6
2	21.2	0.1	25.0	0.2	29.7	0.8	26.0	0.4	295.5	51.3
3	21.7	0.2	25.3	0.2	31.8	0.3	26.4	0.5	827.0	100.7
4	21.5	0.4	25.4	0.4	30.8	0.1	26.7	0.2	427.5	80.2
5	22.1	0.2	25.4	0.1	31.6	0.4	26.4	0.3	466.3	105.89
Promedio	21.6	0.22	25.14	0.22	30.68	0.4	27.46	0.56	500.48	80.738

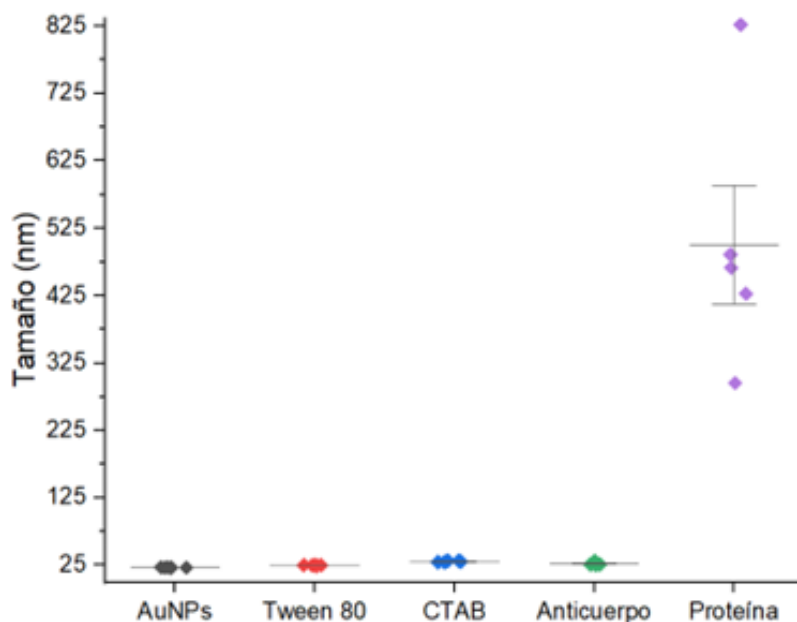


Figura 7.8: Caracterización del tamaño de las AuNPs durante la funcionalización y detección con la proteína VPH16-L1.

Con respecto a la carga superficial, inicialmente, las AuNPs presentaron una carga promedio de -57.6 mV (cuadro 7.8), este resultado es importante debido a que el potencial Z es útil para evaluar la estabilidad de la suspensión de las nanopartículas. Valores próximos a cero indican que la superficie posee poca carga eléctrica por lo que las partículas podrían eventualmente ser inestables y agregarse, por lo tanto, si el potencial Z en valor absoluto es mayor a 30 mV podría inferirse que el principal mecanismo de estabilización es dado por repulsiones electrostáticas [98].

En la figura 7.9 y en El cuadro 7.8, se evidencian los cambios que presenta la carga de las AuNPs una vez se han adicionados los surfactantes, el anticuerpo y finalmente la proteína. El Tween 80 aumento a un rango más positivo la carga de las AuNPs, obteniéndose un promedio de -19.4 mV. Esto puede ser explicado ya que el Tween 80 es un polímero no iónico, mientras más se adsorba, más gruesa será la capa externa de las AuNPs y más positiva será su carga [99]. Algo similar sucede al momento de agregar el CTAB, donde la carga aumenta significativamente pasando a un valor promedio de 138 mV. Este resultados es de esperarse ya que el CTAB es un surfactante catiónico, que al interactuar con la superficie de las AuNPs generan en esta una carga neta positiva. Así mismo, se observa el cambio a valores de carga menos positivos cuando se agregó el anticuerpo y la proteína, pasando a un promedio de 108.8 mV con anticuerpo y finalmente a 34.614 mV con la proteína, lo cual puede ser comprendido por las interacciones entre anticuerpo y proteína en la capa superficial de las AuNPs.

Los surfactantes usados, Tween 80 y CTAB, tienden a formar micelas donde su cabeza polar utiliza las interacciones electrostáticas (como enlaces de hidrógeno e interacciones dipolares) para

desarrollar fuertes asociaciones con las moléculas de agua en la interfaz, mientras que el núcleo hidrofóbico se adhiere a la superficie de las AuNPs [100]. En esta adsorción, los surfactantes permiten reducir la alta tendencia a la agregación de las nanopartículas al disminuir la energía superficial de estas al formar una capa protectora alrededor de ellas, y por lo tanto cambia la carga superficial de las mismas [100]. Los resultados antes descritos muestran como efectivamente la carga de las AuNPs varía en función del proceso y que su comportamiento es regido por la naturaleza química de las moléculas usadas en cada paso. Además, demuestra que efectivamente cada componente participante del proceso toma su lugar en la superficie de las nanopartículas por interacción directa con estas y brinda estabilización a la suspensión de AuNPs.

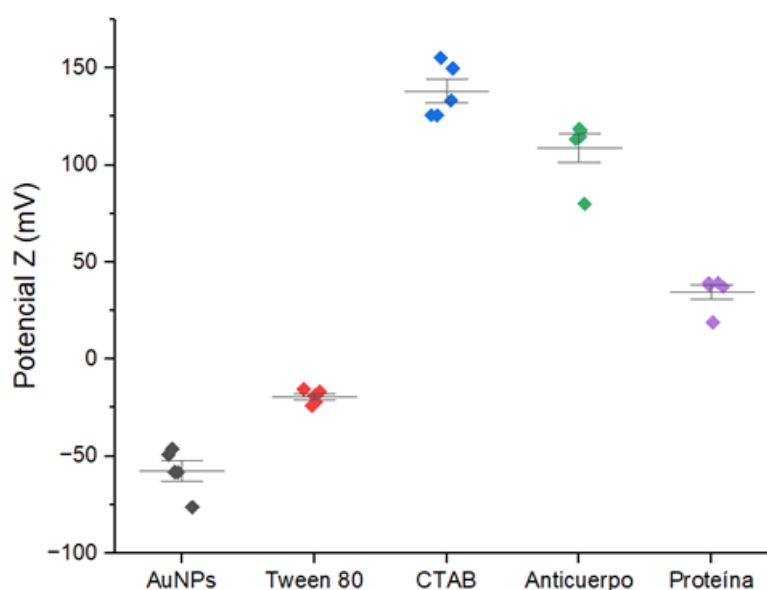


Figura 7.9: Caracterización de la carga de las AuNPs durante la funcionalización y detección con la proteína VPH16-L1.

Cuadro 7.8: Caracterización de la carga de las AuNPs durante la funcionalización y detección con la proteína VPH16-L1.

# de Exp.	AuNPs	S.D	Tween 80	S.D	CTAB	S.D	Anticuerpo	S.D	Proteína	S.D
1	-46.2	11.2	-22.1	11.5	125.7	2.0	118.6	2.6	39.4	7.7
2	-58.3	10.6	-24.0	3.0	125.7	2.0	117.7	3.8	19.0	2.4
3	-58.1	13.9	-15.4	10.5	133.4	2.6	114.5	3.1	39.3	5.6
4	-76.2	3.0	-18.8	3.1	149.9	2.7	80.0	6.1	37.3	4.1
5	-49.2	4.5	-16.7	7.0	155.3	2.5	113.2	5.1	38.07	0.8
Promedio	-57.6	8.64	-19.4	7.02	138.0	2.36	108.8	4.14	34.614	4.12

En cuanto al índice de dispersión, se observa como inicialmente las AuNPs mantienen un valor por debajo de 0.1 (figura 7.10) y a medida que se van realizando los distintos pasos del protocolo de

funcionalización este incrementa. Inicialmente, las AuNPs tienen un índice de dispersión de 0.0838, el cual aumenta a 0.094 cuando se agrega Tween 80. Los mismo ocurre cuando se adiciona el CTAB, anticuerpo y proteína, aumentando de 0.1772 a 0.202 y finalmente a 0.2704 respectivamente (Figura 7.10 y cuadro 7.9). Sin embargo, este valor siempre se mantiene por debajo de 0.3, lo cual indica que el tamaño de las nanopartículas es uniforme y se mantiene uniforme durante el proceso de funcionalización hasta la detección, indicando homogeneidad en el sistema [101].

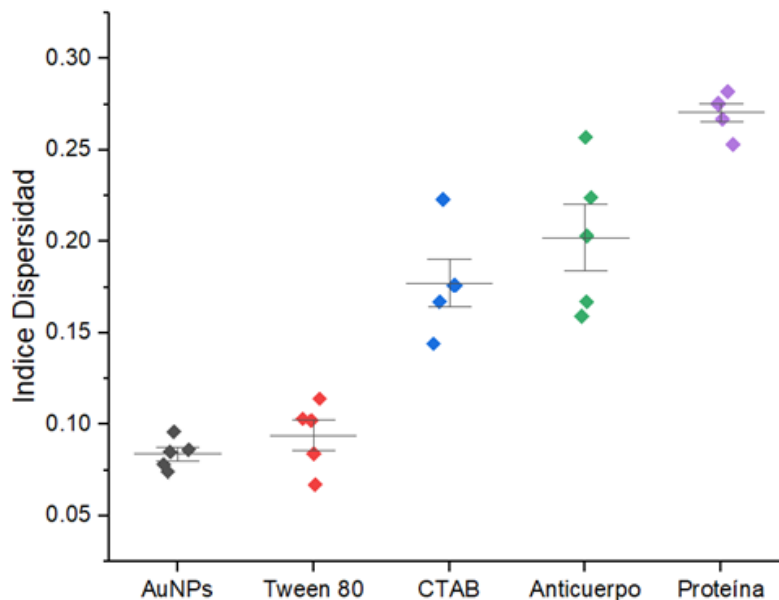


Figura 7.10: Caracterización del índice de dispersión de las AuNPs durante la funcionalización y detección con la proteína VPH16-L1.

Cuadro 7.9: Caracterización del índice de dispersión de las AuNPs durante la funcionalización y detección con la proteína VPH16-L1.

# Exp.	AuNPs	S.D	Tween 80	S.D	CTAB	S.D	Anticuerpo	S.D	Proteína	S.D
1	0.074	0.009	0.067	0.053	0.167	0.034	0.257	0.005	0.275	0.013
2	0.096	0.018	0.102	0.021	0.144	0.036	0.203	0.040	0.267	0.003
3	0.085	0.007	0.103	0.009	0.176	0.009	0.167	0.046	0.282	0.051
4	0.086	0.031	0.084	0.021	0.176	0.020	0.224	0.011	0.253	0.032
5	0.078	0.015	0.114	0.013	0.223	0.016	0.159	0.005	0.2757	0.0456
Promedio	0.0838	0.016	0.094	0.023	0.1772	0.023	0.202	0.021	0.2705	0.028

Por último, se observa las curvas de absorbancia de las AuNPs en cada uno de los pasos de la funcionalización con su respectiva longitud de onda y absorbancia máxima (figura 7.11). Se evidencia entonces, como se mantiene una longitud de onda aproximadamente de 524 nm durante todo el proceso con una absorbancia de 0.2 aproximadamente, característica importante que nos

permite visualizar la suspensión de AuNPs de color rojo fundamental para las pruebas de detección.

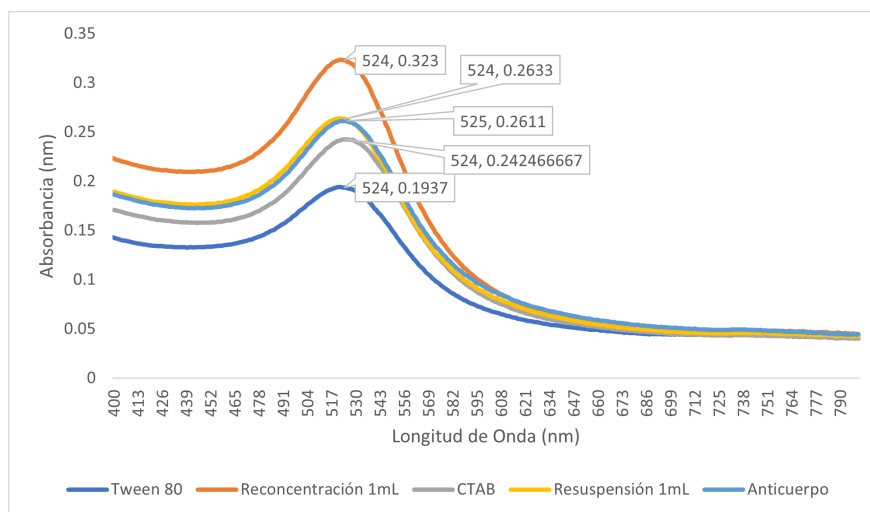


Figura 7.11: Grafica de absorbanza y longitud de onda en los distintos pasos de la funcionalización con proteína VPH16-L1.

Adicionalmente, las nanopartículas de oro funcionalizadas se sometieron a pruebas de detección utilizando diferentes concentraciones de AuNPs. Se observó que la concentración de las AuNPs fue un factor crucial para obtener el cambio de color deseado en las pruebas de detección. Cuando la absorbanza SPR alcanzó 0.2, se detectó un cambio de color tenue. La idea principal es que el cambio de color sea inmediato y perceptible fácilmente al ojo humano, es por esto por lo que se iniciaron experimentos de reconcentración y funcionalización para mejorar la percepción de cambio de color de la prueba.

En estos experimentos, se incluyeron AuNPs funcionalizadas sin reconcentrar y reconcentradas al 30 % y 50 % (figura 7.12). Se observó que las AuNPs funcionalizadas y reconcentradas al 50 % mostraron una mejor coloración al detectar la proteína, lo que sugiere un cambio de color más visible al ojo humano al ser positiva la prueba. Además, se incluyó un experimento de reconcentración al 50 % y estabilización con tween 80 15 horas antes de la funcionalización, en este se evidenció que la estabilización de las AuNPs con tween 80 desde el día anterior afecta la detección, produciendo un color morado más tenue.

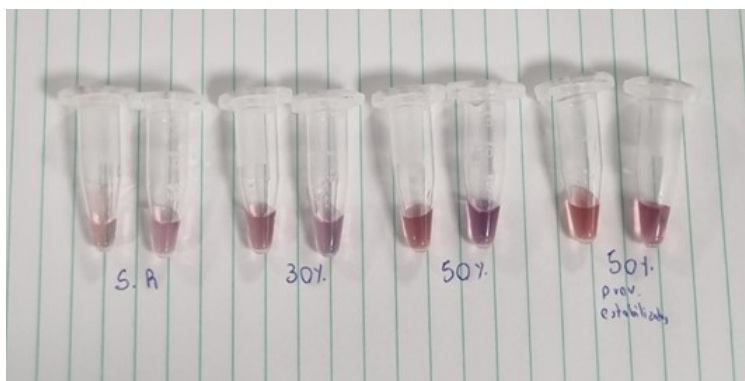


Figura 7.12: Experimentos de reconcentración AuNPs para mejorar la percepción cambio de color de la prueba con proteína VPH16-L1.

Asimismo, se llevó a cabo la funcionalización con el anticuerpo HPV18-L1 siguiendo el mismo procedimiento establecido. Los resultados obtenidos fueron similares a los observados con el anticuerpo HPV16-L1, lo que indica la robustez y la reproducibilidad del método utilizado. En conjunto, estos hallazgos demuestran la efectividad del protocolo de funcionalización de AuNPs desarrollado, así como la importancia de la concentración y la estabilización en la detección de proteínas específicas, lo que sugiere su potencial aplicación en la detección temprana de enfermedades mediante biosensores basados en nanopartículas.

7.3. Ensayos Flujo Lateral

Inicialmente, se aplicó el protocolo de preparación de las membranas de muestra, conjugado y nitrocelulosa tal y como se describe en la sección 6.2.5, obteniendo como resultado final el dispositivo presentado en la figura 7.13, en donde se usó el anticuerpo Anti-VPH18-L1.

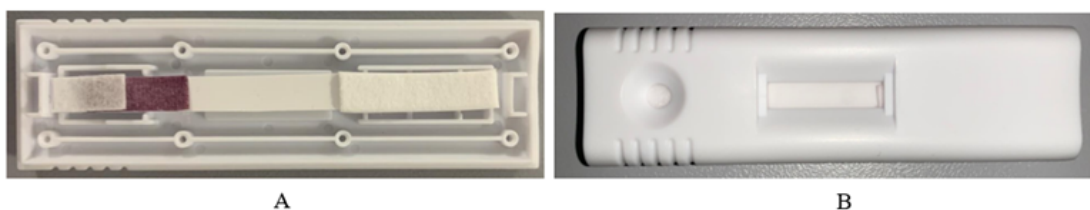


Figura 7.13: A) Ensamblaje dispositivo de flujo lateral. De izquierda a derecha: Almohadilla de muestra, almohadilla de conjugado, membrana de nitrocelulosa y almohadilla de absorción B) Carcasa dispositivo final

Para probar el funcionamiento del dispositivo ensamblado, se realizaron ensayos de control negativo del dispositivo de flujo lateral usando una muestra simulada que consistió en una solución de Tween 20 al 1% en PBS 1x. En la figura 7.14 A se observa el resultado inicial de una prueba

de control negativo, donde se observa claramente la señal indicadora de la línea de prueba y de la línea de control las cuales se observan como manchas a la izquierda y a la derecha respectivamente. En la figura 7.14 B, se evidencia la correcta migración de la muestra junto con el conjugado a lo largo de toda las membranas del dispositivo. Igualmente, se evidencia la correcta inmovilización de la proteína en la línea de prueba y del anticuerpo secundario IgG en la línea de control, ya que se pudo observar la formación de dos manchas al momento en que se da la migración de la muestra. Esto es debido a que las AuNPs funcionalizadas de la almohadilla de conjugado interactúan con las proteínas de la línea de prueba y con el anticuerpo de la línea de control, dando como resultado la señal esperada para una muestra negativa [102].



Figura 7.14: Dispositivo inicial de flujo lateral para la detección de la proteína VPH18-L1. A) Control negativo del dispositivo de flujo lateral, con señal en línea de prueba (izquierda) y de control (derecha). B) Control negativo del ensayo de flujo lateral con carcasa abierta.

De acuerdo con las pruebas iniciales de control negativo, se realizó el procedimiento explicado en la sección 6.2.5 para obtener un resultado final como se observa en la figura 7.15, donde se identifica la línea de control y de prueba de forma mucho más clara.

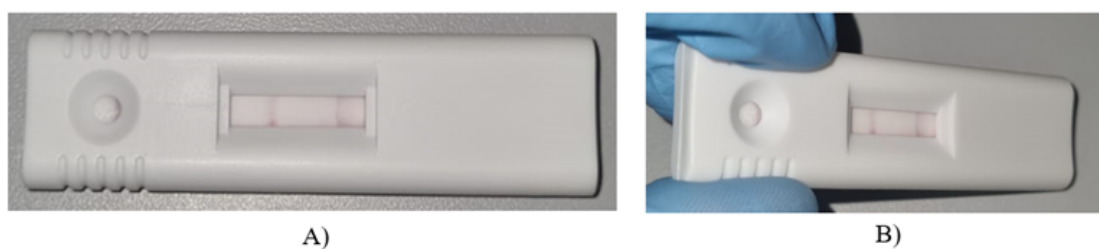


Figura 7.15: Control negativo dispositivo de flujo lateral. A) Vista frontal. B) Vista lateral.

Después de comprobar el funcionamiento del dispositivo con una muestra negativa, se procedió a realizar los ensayos de control positivo, utilizando proteína VPH16-L1 y VPH18-L1 en la muestra, la cual se preparó disolviendo la proteína en una concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS. En la figura 7.16, se evidencia el resultado esperado de una prueba positiva, tanto para VPH18-L1 como para VPH16-L1, donde solo se visualiza la línea de control, que se forma debido a la interacción del anticuerpo secundario IgG con las AuNPs libres gracias a la interacción electrostática de este con el citrato adherido a las AuNPs [103]. Teniendo esto en cuenta, se identificó correctamente el principio de competencia de antígenos, donde en este caso, las proteínas contenidas en la muestra se unieron a

los anticuerpos conjugados con las AuNPs funcionalizadas presentes en la membrana de conjugado. Estos impidieron la unión de los conjugados con las proteínas inmovilizadas en la línea de prueba, resultando en la ausencia de una señal visible y por lo tanto la formación de una sola señal para ambos casos [87].



Figura 7.16: Control positivo prueba flujo lateral. A) Control positivo para VPH16-L1 B) Control positivo para VPH18-L1.

7.3.1. Determinación de sensibilidad del dispositivo de flujo lateral

Para determinar la sensibilidad del dispositivo de flujo lateral se agregó muestra simulada a diferentes concentraciones de la proteína VPH16-L1 o VPH18-L1 tal y como se describe en la sección 6.2.5.1 por duplicado. En la figura 7.17 y en el cuadro 7.10 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad del LFA para la detección de HPV16-L1 y en la figura 7.18 y en el cuadro 7.11 los resultados de sensibilidad del LFA para la detección de HPV18-L1. Tanto en las pruebas de sensibilidad para VPH16-L1 como en la de VPH18-L1, se observó como a bajas concentraciones de proteína en la muestra, el dispositivo presentó un resultado negativo. Inicialmente, se visualizaron las dos líneas, de control y prueba, evidenciando como a concentraciones bajas, no hay suficiente proteína en la muestra para interactuar con las AuNPs conjugadas, lo que permite que las AuNPs libres interactúen con las proteínas inmovilizadas en la línea de prueba, arrojando un resultado negativo [87]. Sin embargo, se identificó como en la prueba de detección para VPH16-L1 solamente cuando la concentración de la proteína aumentó a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se deja de visualizar la línea de prueba y solo aparece la línea de control, indicando un resultado positivo. Por otro lado, en la prueba de detección de VPH18-L1, a partir de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se deja de visualizar la línea de prueba, indicando un resultado positivo. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que el LFA para la proteína HPV18-L1 presenta mayor sensibilidad que el LFA para la proteína HPV6-L1 y que los límites de detección corresponden a un valor de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

Cuadro 7.10: Determinación de sensibilidad de prueba de flujo lateral con proteína VPH16-L1.

Concentración de proteína VPH16-L1	Primer experimento	Segundo experimento
0 µg/mL	Negativo	Negativo
2 µg/mL	Negativo	Negativo
3 µg/mL	Negativo	Negativo
4 µg/mL	Negativo	Negativo
5 µg/mL	Negativo	Negativo
8 µg/mL	Positivo	Positivo

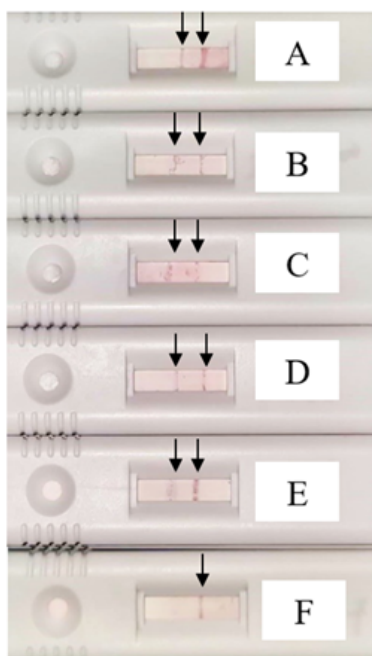


Figura 7.17: Prueba de sensibilidad VPH16-L1. A) Muestra sin proteína. B) Muestra a 2 µg/mL. C) Muestra a 3 µg/mL. D) Muestra a 4 µg/mL. E) Muestra a 5 µg/mL. F) Muestra a 8 µg/mL.

Cuadro 7.11: Determinación de sensibilidad de prueba de flujo lateral con proteína VPH18-L1.

Concentración de proteína VPH18-L1	Primer experimento	Segundo experimento
0 µg/mL	Negativo	Negativo
2 µg/mL	Negativo	Negativo
3 µg/mL	Negativo	Negativo
4 µg/mL	Negativo	Positivo
5 µg/mL	Positivo	Positivo
8 µg/mL	Positivo	Positivo

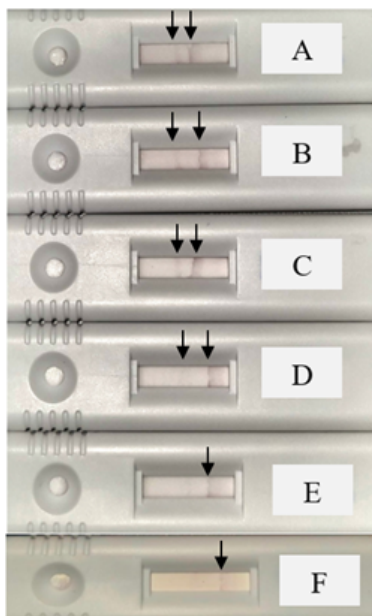


Figura 7.18: Prueba de sensibilidad VPH18-L1. A) Muestra sin proteína. B) Muestra a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. C) Muestra a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. D) Muestra a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. E) Muestra a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. F) Muestra a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

7.3.2. Determinación de selectividad del dispositivo de flujo lateral

Para demostrar la selectividad de los LFA se ensamblaron dispositivos para detección de VPH16-L1 y VPH18-L1 y se realizó la detección de muestras con diferentes proteínas a una concentración de $8\mu\text{g}/\text{mL}$ tal y como se describe en la sección 6.2.5.2. Los resultados de las pruebas realizadas se pueden observar en las figuras 7.19 y 7.20 y en los cuadros 7.12 y 7.13. Los dispositivos mostraron ser selectivos a cada una de las proteínas objetivo, es decir, se pudo detectar la proteína VPH16-L1 y VPH18-L1 para los LFA fabricados con conjugados específicos a estas variantes (Figura 7.19 A y 7.20 A). Adicionalmente, cuando se realizaron las pruebas de los LFA para detección de VPH16-L1 y VPH18-L1 con las proteínas VPH16-E6, VPH16-E7, VPH18-E7, BSA y SARS-CoV-2 SPIKE, se detectó señal visible en la línea de prueba, indicando que los conjugados de cada dispositivo no reaccionaron con estos antígenos corroborando su selectividad (Figura 7.19B, 7.19C, 7.19D, 7.19E, 7.19F, y 7.20B, 7.20C, 7.20D, 7.20E, 7.20F). Por otro lado, el LFA para detección de VPH16-L1 mostró un resultado positivo al realizar la prueba con muestra simulada preparada con la proteína HPV18-L1 (Figura 7.19G) indicando falta de selectividad del LFA para VPH16-L1 con su proteína análoga. Esto posiblemente debido a homología estructural en el epítipo o sitio de unión de la proteína VPH16-L1 con la proteína VPH18-L1 que son identificados por el parátropo del anticuerpo Anti-VPH16-L1 [104]. Por el contrario, el LFA para detección de VPH18-L1 mostró un resultado negativo (dos líneas) cuando se realizó la prueba con muestra simulada preparada con proteína VPH16-L1 (Figura 7.20G), esto puede ser posible debido a la alta especificidad del anticuerpo VPH18-L1, contrario a la posible afinidad cruzada presentada en el anticuerpo VPH16-L1 [105].

Cuadro 7.12: Pruebas de selectividad para dispositivo de flujo lateral de detección VPH16-L1.

Proteína objetivo a 8 µg/mL	Resultado
VPH16-L1	Positivo
VPH18-L1	Positivo
VPH16-E6	Negativo
VPH16-E7	Negativo
VPH18-E7	Negativo
SARS-CoV-2 SPIKE	Negativo
BSA	Negativo

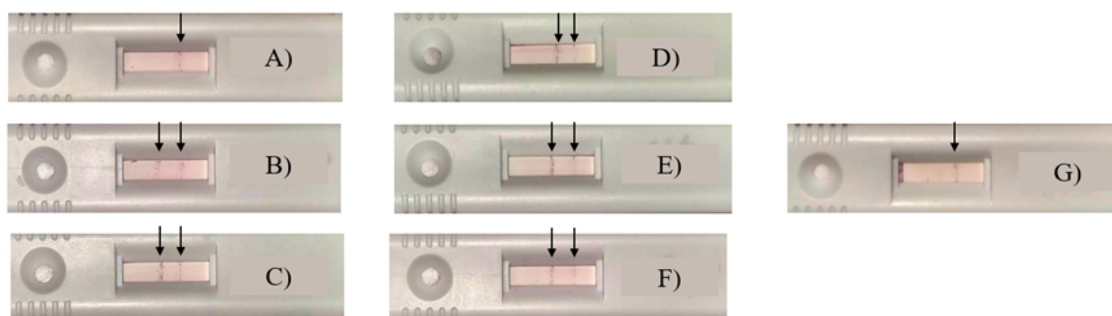


Figura 7.19: Pruebas de selectividad para dispositivo de flujo lateral de detección VPH16-L1. A) Proteína VPH16-L1. B) Proteína VPH16-E6. C) Proteína VPH16-E7, D) VPH18-E7. E) BSA. F) SARS-CoV-2 SPIKE. G) Proteína VPH18-L1

Cuadro 7.13: Pruebas de selectividad para dispositivo de flujo lateral de detección VPH18-L1.

Proteína objetivo a 8 µg/mL	Resultado
VPH16-L1	Negativo
VPH18-L1	Positivo
VPH16-E6	Negativo
VPH16-E7	Negativo
VPH18-E7	Negativo
SARS-CoV-2 SPIKE	Negativo
BSA	Negativo

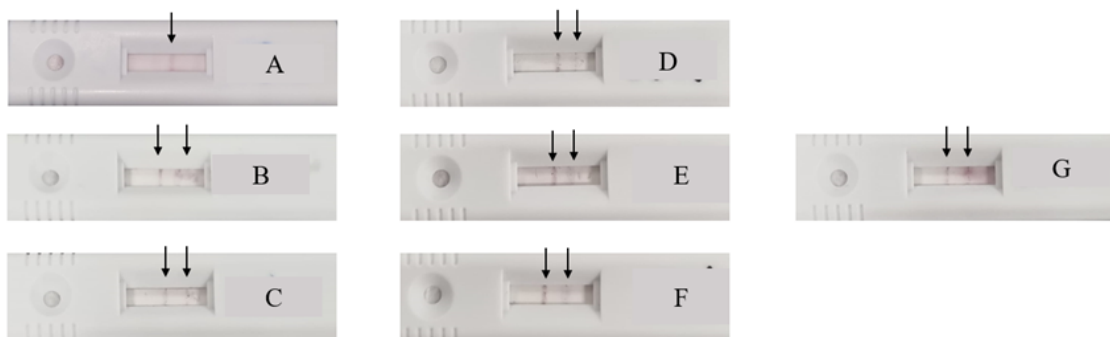


Figura 7.20: Pruebas de selectividad para dispositivo de flujo lateral de detección VPH18-L1. A) Proteína VPH18-L1. B) Proteína VPH16-E6. C) Proteína VPH16-E7, D) VPH18-E7. E) BSA. F) SARS-CoV-2 SPIKE. G) Proteína VPH16-L1

Conclusiones

A través del desarrollo de este trabajo se logró establecer un protocolo de síntesis de AuNPs reproducible, el cual permitió obtener nanopartículas esféricas de 20 nm en promedio usando la metodología de superficie de respuesta. Esta metodología permitió además conocer el comportamiento del proceso de síntesis y controlar las condiciones que permiten obtener AuNPs de diferentes tamaños.

Se pudo comprobar la efectividad y funcionamiento del protocolo de funcionalización de las AuNPs con los anticuerpos VPH16-L1 y VPH-18-L1 a través de la caracterización de cada uno de los pasos de obtención del nanosensor en suspensión, desde la síntesis, pasando por la estabilización y siguiendo con la funcionalización para finalmente llegar a la detección. Esta caracterización, permitió además observar los cambios y explicar el comportamiento del proceso de funcionalización y detección con respecto a sus características de tamaño, carga, absorción y transmisión de la luz.

Se logró obtener un prototipo de dispositivo de flujo lateral (LFA) para la detección de las proteínas VPH16-L1 y VPH18-L1 haciendo uso del método competitivo. Este dispositivo permite detectar las proteínas asociadas a estas variantes de alto riesgo de VPH. Además, el prototipo de LFA mostró ser sensible, selectivo y reproducible mostrando un gran potencial para su escalamiento y uso en la detección del virus del papiloma humano.

La portabilidad de esta prueba es especialmente relevante para poblaciones remotas que carecen de acceso a exámenes de detección de VPH típicos, como el Papanicolaou o la detección de ADN de VPH, debido a limitaciones de accesibilidad y culturales. La disponibilidad de esta prueba en estas áreas puede contribuir significativamente al tratamiento preventivo del cáncer de cuello uterino, ya que las variantes de alto riesgo del VPH tienen una alta probabilidad de causar esta enfermedad.

Trabajos futuros

Derivado de los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda como trabajos futuros lo siguiente:

- Utilización de dispensadora de flujo lateral para el protocolo de fabricación del dispositivo de flujo lateral el cual requiere de concentraciones de solución de anticuerpo relativamente altas.
- Exploración de otras variantes del VPH tanto de alto como de bajo riesgo para la proteína L1 y usando otras proteínas asociadas a estas como la E6 y la E7.
- Realización de estudios clínicos, donde se utilicen muestras reales de pacientes con y sin VPH, para validar la eficacia y precisión de la prueba en un entorno clínico real.
- Exploración de detección en muestras de orina. Desarrollar y validar el uso de la orina como la muestra principal para la detección por medio del dispositivo de flujo lateral para garantizar una prueba mínimamente invasiva para VPH.
- Cuantificación de resultados de las pruebas de flujo lateral empleando equipos que permitan medir la intensidad de las líneas visualizadas en la prueba de flujo lateral. Esto permitirá determinar tanto la sensibilidad como la selectividad analíticas de la prueba.

Bibliografía

- [1] Genome, “Ácido desoxirribonucleico (adn),” Consultado: el 6 de noviembre de 2023. [Online]. Available: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/%C3%81cido-desoxirribonucleico>
- [2] K. M. Koczula and A. Gallotta, “Lateral flow assays,” *Essays in Biochemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 111–120, Jun. 2016.
- [3] Antiteck, “Lateral flow antiteck,” Consultado: el 6 de noviembre de 2023. [Online]. Available: <https://lateralflow.antiteck.com/es/Mecanismo-de-acciÃn-del-ensayo-de-flujo-lateral-paso-a-paso/>
- [4] COMINTEC, “Identificaci3n de analitos | comintec,” Consultado: el 6 de noviembre de 2023. [Online]. Available: <https://comintec.com.mx/infomail/mailling82.php>
- [5] Instituto Nacional del C3ncer, “Ant3geno.” [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/antigeno>
- [6] I. N. del C3ncer, “Aparato reproductor femenino,” Consultado: el 18 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/aparato-reproductor>
- [7] NIH, “Arn (3cido ribonucleico).”
- [8] Genome, “3cido ribonucleico (arn),” Consultado: el 18 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ARN>
- [9] A. M. Doc3n, “Infecci3n por el virus del papiloma humano en mujeres con lesi3n intraepitelial cervical: aspectos virol3gicos y clinicopatol3gicos,” Master’s thesis, Universidad de Murcia, Murcia, 2014.
- [10] Ministerio de Salud y Protecci3n Social, *Gu3a de Pr3ctica Cl3nica para la detecci3n y manejo de lesiones precancerosas de cuello uterino. Gu3a para pacientes y cuidadores*, 2014.
- [11] Bvsalud, B. Alves, y Opas, “Ep3topos,” Consultado: el 19 de noviembre de 2023. [Online]. Available: <https://decs.bvsalud.org/es/ths/resource/?id=947>
- [12] I. N. del C3ncer, “Gen p53,” Consultado: el 19 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/gen-p53>
- [13] Instituto Nacional del C3ncer, “Infecci3n de transmisi3n sexual,” Consultado: el 18 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/infeccion-de-transmision-sexual>

- [14] I. N. del Cáncer, “Neoplasia,” Consultado: el 18 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/neoplasia>
- [15] Meaning88, “Definition of oncogene,” Consultado: el 18 de abril de 2023. [Online]. Available: <http://meaning88.com/dictionary/oncogene>
- [16] Meaning88, “Oncoproteína,” Consultado: el 18 de abril de 2023. [Online]. Available: <http://meaning88.com/medical/oncoprotein>
- [17] Plannedparenthood, “¿qué es el examen del papiloma humano?” Consultado: el 19 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.plannedparenthood.org/es/temas-de-salud/cancer/cancer-cervical/que-es-la-prueba-del-vph>
- [18] Genome, “Virus,” Consultado: el 18 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Virus>
- [19] Clínica Universidad de Navarra, “Virión,” Consultado: el 18 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/virion>
- [20] E. A. Medina-Villaseñor, P. A. Oliver-Parrab, E. Neyra-Ortizb, J. A. Pérez-Castroc, J. R. Sánchez-Orozco, and N. Contreras-González, “Neoplasia intraepitelial cervical, análisis de las características clínico-patológicas,” *Gac. Mex. Oncol.*, 2014.
- [21] H. S. de la V. R. Gutierrez Pulido, *Análisis y Diseño de experimentos*, 2nd ed. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, 2008.
- [22] A. Nogueira-Rodrigues, “Hpv vaccination in latin america: Global challenges and feasible solutions,” *Vaccine*, vol. 37, no. 46, pp. 7037–7040, 2019.
- [23] M. M. Martínez, “Expresión heteróloga de la proteína mayor de la cápsida (11) del virus del papiloma humano tipo 18: Purificación y caracterización de las proteínas recombinantes y partículas similares al virus (vlp),” Madrid, 2009.
- [24] Genome, “Reacción en cadena de la polimerasa (pcr),” consultado: el 20 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>
- [25] CancerQuest, “Prueba de adn para el vph,” consultado: el 20 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.cancerquest.org/es/para-los-pacientes/deteccion-y-diagnosis/examen-de-hpv-por-dna>
- [26] A. Barrón, C. Aranda, S. Valenzuela, Y. Paredes, and H. Villegas, “Infección cervical por virus del papiloma humano: Genotipificación por hibridación in situ y análisis ultraestructural por microscopia electrónica de transmisión,” *Instituto Nacional de Perinatología*, 2004.
- [27] K. Sitarz and S. Szostek, “Food and drug administration - approved molecular methods for detecting human papillomavirus infection,” *Ginekol Pol*, vol. 90, pp. 104–108, May 2019.

- [28] Mayo Clinic, "Colposcopia," consultado: el 20 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/colposcopy/about/pac-20385036>
- [29] L. JRE, "Biosensores electroquímicos de adn para la detección del virus del papiloma humano (vph) basados en las metodologías: Frecuencia característica y corriente de relajación," Zacatecas, 2016.
- [30] K. R. Medel, "Estudio de la respuesta de un biosensor mediante la simulación de interacciones proteína-proteína usando resonancia de plasmones superficiales," Puebla, 2022.
- [31] F. ET, "Síntesis de nanopartículas de au semillas y análisis de su proceso de maduración," Baja California, 2020.
- [32] Z. KH and S. ZL, "Propuesta de síntesis de nanopartículas de oro a partir de au sólido, hauc4 y desechos electrónicos por vía química," Ciudad de México, 2010.
- [33] BIOLAN HEALTH, "Pruebas de flujo lateral (lateral flow)," 2023, consultado: el 6 de noviembre de 2023. [Online]. Available: <https://biolanhealth.com/es/pruebas-de-flujo-lateral-lateral-flow/>
- [34] C. F. Hernandez, "Estudio de un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de sars-cov-2 utilizando nanopartículas de oro como reporteros visuales," 2023.
- [35] Pan American Health Organization, "Cáncer cervicouterino - ops/oms | organización panamericana de la salud," Consultado: el 9 de enero de 2024. [Online]. Available: <https://www.paho.org/es/temas/cancer-cervicouterino>
- [36] Liga Colombiana contra el Cáncer, "Cancer de cuello uterino - liga colombiana contra el cáncer," Consultado: el 9 de enero de 2024. [Online]. Available: <https://www.ligacancercolombia.org/cancer-de-cuello-uterino/>
- [37] MedlinePlus - Health Information from the National Library of Medicine, "Cáncer de cuello uterino: Medlineplus en español," Consultado: el 27 de febrero de 2023. [Online]. Available: <https://medlineplus.gov/spanish/cervicalcancer.html>
- [38] Q. C. et al., "Rapid and simultaneous visual typing of high-risk hpv-16/18 with use of integrated lateral flow strip platform," *Microchimica Acta*, vol. 189, no. 9, p. 350, sep 2022.
- [39] World Health Organization (WHO), "Cáncer cervicouterino." [Online]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer#:~:text=El%20cáncer%20de%20cuello%20uterino,342%20000%20muertes%20en%202020>
- [40] Fondo Colombiano de Cuentas de Alto Costo, "Día mundial de la prevención del cáncer de cuello uterino 2023," 2023, consultado: el 13 de octubre de 2023. [Online]. Available: <https://cuentadealtocosto.org/cancer/dia-mundial-de-la-prevencion-del-cancer-de-cuello-uterino/>

- [41] M. de S. y. P. S. de Colombia, “Cáncer de cuello uterino,” consultado: el 27 de febrero de 2023. [Online]. Available: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/ssr/Paginas/Cancer-de-cuello-uterino.aspx>
- [42] C. Pardo, E. de Vries, L. Buitrago, and O. Gamboa, *Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia*, cuarta ed. Bogotá D. C.: Instituto Nacional de Cancerología, 2017.
- [43] Instituto Nacional de Cancerología, “Recomendaciones para la tamización de neoplasias del cuello uterino en mujeres sin antecedentes de patología cervical (preinvasora o invasora) en colombia,” Bogotá, dic. 2007.
- [44] Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, y Centers For Disease Control and Prevention, “Incorporación de la prueba del virus del papiloma humano en programas de prevención de cáncer cervicouterino,” Washington, D.C, 2016.
- [45] A. L. Jareño, “Nanopartículas de oro para biosensado colorimétrico de Ácidos nucleicos. sistemas, aplicaciones y perspectivas de futuro,” Valencia, 2020.
- [46] Observatorio Nacional de Salud, “Indicadores básicos de salud - colombia 2020,” 2020.
- [47] World Health Organization (WHO), “Cáncer cervicouterino,” consultado: el 13 de marzo de 2023. [Online]. Available: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/plan-nacional-prevencion-deteccion-atencion-cancer.pdf>
- [48] Ministerio de Salud y Protección Social Gobierno de Colombia, *Plan Nacional de Prevención, Detección Temprana y Atención del Cáncer*, Bogotá, 2021, consultado: el 13 de marzo de 2023.
- [49] E. Leandro, “Eterminantes sociales y su asociación con la no toma de citología cérvico vaginal en la población rural de colombia,” Bogotá, 2020.
- [50] H. E. G. Ghaleh, A. Shahriary, M. Izadi, and M. Farzanehpour, “Advances in early diagnosis of cervical cancer based on biosensors.” *Biotechnol Bioeng*, vol. 119, no. 9, p. 2305–2312, sep 2022.
- [51] R. J. C., “Efecto fotocatalítico del tio₂-au sobre células de cáncer de cuello uterino,” *Ingeniería y Competitividad*, vol. 14, p. 191–198, 2012. [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=291325042015>
- [52] I. G. S. P. Morones, “Aplicación de diseño de experimentos para el análisis de secado de un producto (experiment design application for analysis of the drying a product),” *Innovaciones de Negocios*, vol. 10, no. 19, p. 145–158, 2013.
- [53] E. Martnez, M. Estrems, M. Valentin, A. Garrido, and J. A. Guillen, “Aplicación de la metodología de superficie de respuesta para la optimización de parámetros de soldadura en función de la distribución térmica resultante,” *XIII CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA DE PROYECTOS*, jul 2009.

- [54] G. F. Preciado, “Optimizaci3n de una superficie de respuesta utilizando jmp in,” Sonora, 2003.
- [55] D. D. la Fuente-Villarreal, S. Guzmán-L3pez, O. Barboza-Quintana, and R. A. Gonz3lez-Ram3rez, “Biolog3a del virus del papiloma humano y t3cnicas de diagn3stico,” *Revista Mexicana de Patolog3a Cl3nica*, vol. 57, no. 2, pp. 84–91, 2010.
- [56] G. Z. L. de Larrea et al., “C3ncer c3rvicouterino y virus del papiloma humano,” *Rev. Chil. Obstet. Ginecol*, vol. 77, no. 4, pp. 297–303, 2012.
- [57] J. Verssimo and T. A. A. de Medeiros Fernandes, “Human papillomavirus: Biology and pathogenesis,” in *Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - A Clinical Perspective*. InTech, 2012.
- [58] V. A. Vanegas, A. I. Rubio, A. M. Bedoya, and G. I. S3nchez, “Estructura molecular y antig3nica de la vacuna contra el virus del papiloma humano 16 (vph 16),” *Acta Biologica Colombiana*, vol. 13, no. 3, pp. 37–47, 2008.
- [59] J. F. Beltr3n-Lissabet, “Aspectos generales sobre la estructura y funci3n de las prote3nas codificadas por el virus del papiloma humano,” *CENIC Ciencias Biol3gicas*, vol. 45, pp. 108–118, 2014.
- [60] A. A. Castro and M. F. P3rez, “Virus del papiloma humano,” *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA*, vol. LXX, pp. 211–217, 2013.
- [61] World Health Organization (WHO), “C3ncer cervicouterino,” consultado: el 20 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>
- [62] Ministerio de Salud y Protecci3n Social, Instituto Nacional de Salud, y Instituto Nacional de Cancerolog3a, *LINEAMIENTOS T3CNICOS Y OPERATIVOS PARA LA VACUNACI3N CONTRA EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)*, Bogot3, 2012.
- [63] N. De, O. De, L. A. Ops, and Oms, *Prevenci3n y control integrales del c3ncer cervicouterino: un futuro m3s saludable para ni3as y mujeres*. Paho, 2013.
- [64] Top Doctors, “Biomarcadores: qu3 es, s3ntomas y tratamiento | top doctors,” consultado: el 13 de noviembre de 2023. [Online]. Available: <https://www.topdoctors.es/diccionario-medico/biomarcadores>
- [65] M. Para, G. De, and P. D. Salud, *MANUAL PARA GERENTES DE PROGRAMAS DE SALUD*, consultado: el 20 de abril de 2023. [Online]. Available: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&alias=36609-incorporacion-prueba-virus-papiloma-humano-programas-prevencion-cancer-cervicouterino-manual-gerentes-programas-salud-609&category_slug=guias-manuales-3444&Itemid=270&lang=en

- [66] Cancer, “Prueba de vph,” consultado: el 20 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/pruebas-de-deteccion/prueba-de-vph.html>
- [67] Genome, “Reacción en cadena de la polimerasa (rcp),” consultado: el 20 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>
- [68] Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de Salud, Centers For Disease Control and Prevention, “Sección 2: Resumen de las pruebas de vph disponibles,” in *INCORPORACIÓN DE LA PRUEBA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN PROGRAMAS DE PREVENCIÓN DE CÁNCER CERVICOUTERINO*, 2016, pp. 14–15.
- [69] Inc. Hologic, “Cervista hpv hr,” 2016.
- [70] World Health Organization (WHO), *WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention*, 2023, consultado: el 20 de abril de 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030824>
- [71] R. JAA, “Caracterización de transistores de efecto de campo de compuerta extendida sobre superficies de au para la detección electroquímica del vph serotipo 16 por voltamperometría de pulso diferencial,” Zacatecas, 2016.
- [72] B. Maji, B. Barik, and P. Dash, “Methods for design and fabrication of nanosensors,” in *Nanosensors for Smart Manufacturing*. Elsevier, 2021, pp. 3–18.
- [73] Y. Li, H. J. Schluesener, and S. Xu, “Gold nanoparticle-based biosensors,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, pp. 1935–1942, 2010.
- [74] M. RM, “Sistema multivalente para terapia de linfomas no-hodking basado en anti-cd20 conjugado a nanopartículas de oro,” Guanaajuato, 2014.
- [75] S. Hasan, “A review on nanoparticles: Their synthesis and types,” *Research Journal of Recent Sciences*, vol. 4, no. ISC-2014, pp. 1–3, Feb. 2015.
- [76] N. IC, “Obtención y caracterización de partículas coloidales a partir de proteínas vegetales hidrofóbicas ricas en prolina,” Oviedo, 2016.
- [77] Lateral Flow AntiTeck, “¿qué hace que los anticuerpos permanezcan en el ensayo de flujo lateral de membrana de nitrocelulosa?” 2023, consultado: el 13 de noviembre de 2023. [Online]. Available: <https://lateralflow.antiteck.com/es/what-makes-antibodies-stay-on-nitrocellulose-membrane-lateral-flow-assay/>
- [78] ÉNHMED • Tecnología para la vida, “Ensayos de flujo lateral,” 2023, consultado: el 13 de noviembre de 2023. [Online]. Available: <https://www.enhmed.com/index.php/lab-live/17-ensayos-de-flujo-lateral>

- [79] Labmedica, “Pruebas de flujo lateral detectan la covid-19 con una exactitud similar a las pruebas de laboratorio de pcr cuando se usan al comienzo de los síntomas,” 2023, consultado: el 13 de noviembre de 2023. [Online]. Available: <https://www.labmedica.es/covid-19/articulos/294789022/pruebas-de-flujo-lateral-detectan-la-covid-19-con-una-exactitud-similar-a-las-pruebas-de-laboratorio-de-pcr-cuando-se-usan-al-comienzo-de-los-sintomas>
- [80] Labclinics, “Lab supplies for research and clinical diag. [internet]. tipos de tests para detectar el covid-19,” 2023, consultado: el 13 de noviembre de 2023. [Online]. Available: <https://www.labclinics.com/2020/04/22/tipos-de-tests-para-detectar-el-covid-19/>
- [81] Labmedica, “Las pruebas de flujo lateral para covid-19 son más precisas de lo que se había informado anteriormente, pero no se pueden comparar con las pruebas de pcr,” 2023, consultado: el 13 de noviembre de 2023. [Online]. Available: <https://www.labmedica.es/covid-19/articulos/294790192/las-pruebas-de-flujo-lateral-para-covid-19-son-mas-precisas-de-lo-que-se-habia-informado-anteriormente-pero-no-se-pueden-comparar-con-las-pruebas-de-pcr>
- [82] Quidel - Immunoassays & Molecular Diagnostics Healthcare Solutions, “Sofia hcg fia,” Consultado: el 13 de noviembre de 2023. [Online]. Available: <https://www.quidel.com/sites/default/files/product/documents/EF1256421ES00.pdf>
- [83] J. Pattyn, S. V. Keer, L. Téblick, P. V. Damme, and A. Vorsters, “Hpv dna detection in urine samples of women: ‘an efficacious and accurate alternative to cervical samples?’,” *Journal of Clinical Virology*, vol. 120, pp. 104–108, 2019.
- [84] D. I. L. Vargas and K. A. R. Méndez, “Consolidación de la tecnología para la fabricación de un biosensor con aplicación en la detección del vph 16 buscando reducción de costos,” 2023.
- [85] H. Huang, W. Bai, C. Dong, R. Guo, and Z. Liu, “An ultrasensitive electrochemical dna biosensor based on graphene/au nanorod/polythionine for human papillomavirus dna detection,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 68, pp. 442–446, Jun. 2015.
- [86] C.-F. DS, N. GA, S. EVM, S.-M. MA, A. MS, and Z. DML, “Electrochemical dna biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 794, pp. 10–18, 2013.
- [87] J. Moreno B, C. Jaramillo H, J. E, and D. P, “Diseño de un biosensor de tipo flujo lateral para la detección de helicobacter pylori y su factor de virulencia caga,” Bogotá, 2013.
- [88] A. M, B. PC, G.-C. JP, and B. J, “Innovative prototypes for cervical cancer prevention in low-income primary care settings: A human-centered design approach,” *PLOS ONE*, vol. 15, no. 7, p. e0235205, 2020.
- [89] M. J. Jimenez, A. Jaramillo-Botero, and A. Avila, “Au-np-based colorimetric assay for sugar detection and quantification,” *Sensors and Actuators Reports*, vol. 6, p. 100171, Dec. 2023.

- [90] H. D. V. et al., “Artificial intelligence for cervical cancer screening: Scoping review, 2009–2022,” *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, Oct. 2023.
- [91] A. J. Botero, D. P. H. Ramirez, and P. Hernandez, “Synthesis of functionalised gold nanoparticles and nanocompounds containing same for measuring sucrose or starch in cells,” Patent 11,413,683, aug 16, 2022.
- [92] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, and D. G. Fernig, “Determination of size and concentration of gold nanoparticles from uv-vis spectra,” *Analytical Chemistry*, vol. 79, no. 11, pp. 4215–4221, Jun. 2007.
- [93] S. B., “Comparación del tamaño de nanopartículas de oro empleando diferentes técnicas y protocolos de medición,” *INNOTEC*, pp. 10–24, 2021. [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=606164861001>
- [94] I. D. Rodriguez, “Estabilidad de nanopartículas en suspensión,” 2021, consultado: el 1 de junio de 2024. [Online]. Available: <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/24597>
- [95] N. E. Garcia, “Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro,” País Vasco, 2015.
- [96] J. Zakaria, S. R. A. Shukor, and K. A. Razak, “Intermolecular interaction of tween 80, water and butanol in micelles formation via molecular dynamics simulation,” *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 778, no. 1, p. 012091, Apr. 2020.
- [97] Y. Bide, M. A. Fashapoyeh, and S. Shokrollahzadeh, “Structural investigation and application of tween 80-choline chloride self-assemblies as osmotic agent for water desalination,” *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, p. 17068, Aug. 2021.
- [98] D. H. Robalino, “Caracterización de suspensiones de nanopartículas de oro en presencia del copolímero poli (n-isopropilacrilamida)-co-poli (3-acrilamidopropil trimetilamonio): Influencia de la fuerza iónica y la temperatura,” *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, vol. 13, no. 2, p. 18, Nov. 2021.
- [99] M. A. A. Shafie, “Formulation and evaluation of betamethasone sodium phosphate loaded nanoparticles for ophthalmic delivery,” *Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 04, no. 02, 2013.
- [100] J. Najeeb *et al.*, “Surfactant stabilized gold nanomaterials for environmental sensing applications – a review,” *Environmental Research*, vol. 208, p. 112644, May 2022.
- [101] R. C. Murdock, L. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, J. J. Schlager, and S. M. Hussain, “Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique,” *Toxicological Sciences*, vol. 101, no. 2, pp. 239–253, Feb. 2008.
- [102] K. M. Koczula and A. Gallotta, “Lateral flow assays,” *Essays in Biochemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 111–120, Jun. 2016.

-
- [103] R. Hassan, “Interactions between gold nanoparticles and immunoglobulin isotypes,” Orlando, 2021.
- [104] E. Pimienta-Rodriguez, G. Aldama-Paz, Y. Serrano-Rivero, S. Rodriguez-Salgueiro, and A. Otero-Blanca, “Expresión del gen 11 del virus del papiloma humano tipo 18, aislado de una biopsia de una paciente cubana, en cepas de escherichia coli,” *Revista CENIC*, vol. 49, no. 3, pp. 001–017, 2018.
- [105] B. A. de Noya, C. Colmenares, and O. Noya, “Comunidad antigénica y reactividad cruzada: su repercusión en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades parasitarias. especial referencia a esquistosomiasis,” *AVFT*, vol. 20, no. 2, pp. 163–171, 2001.