



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Cali

**Facultad de Ingeniería
y Ciencias**

Ingeniería Biomédica

INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO

Desarrollo de un nanosensor de grafeno inducido por
láser (LIG) para detección de las variantes 16 y 18 del
virus del papiloma humano (VPH)

Isabella Orozco Sarria

Director

Dr. Carlos Enrique Navarro Chica

10 de junio de 2026

Agradecimientos

A mis padres, cuya guía, amor y apoyo incondicional han sido el pilar de cada paso en este camino. Gracias por sostenerme en los momentos más difíciles, por confiar siempre en mis decisiones y por celebrar conmigo cada logro como si fuera suyo. Este logro es tan mío como de ustedes.

A mi director, el Dr. Carlos Enrique Navarro Chica, por su valiosa orientación, por transmitirme conocimientos y herramientas que trascienden más allá de la investigación, y por su dedicación en cada etapa de este proyecto. También al Dr. Andrés Jaramillo, por darme la oportunidad de formar parte del Instituto IÓMICAS y por su respaldo durante este proceso.

A mis compañeros de laboratorio, por su disposición, sus enseñanzas y la calidez con la que han acompañado mi trabajo. Un agradecimiento especial a Ana Zuluaga y Gloria Crespo, por su gran apoyo y por haberme enseñado tanto; su generosidad al compartir su conocimiento fue fundamental en mi aprendizaje.

Extiendo también mi gratitud a todas las personas que, de manera directa o indirecta, contribuyeron a que este proyecto pudiera llevarse a cabo y a que hoy pueda culminar esta etapa de la mejor manera posible.

Glosario

Símbolos

θ_C	Ángulo de contacto
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
nm	Nanómetro
M	Molar
mM	Milimolar
g	Gramo
mg	Miligramo
μg	Microgramo

Acrónimos y Abreviaturas

<i>Ant</i>	Antígeno
<i>CCU</i>	Cancer de Cuello Uterino
<i>EDC</i>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
<i>FTIR</i>	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
<i>NHS</i>	N-hidroxisuccinimida
<i>LIG</i>	Grafeno Inducido por Láser
<i>mAb</i>	Anticuerpo Monoclonal
<i>NIC</i>	Neoplasia Intraepitelial Cervical
<i>POCT</i>	Pruebas de laboratorio en el lugar de asistencia
<i>PBS</i>	Tampón fosfato salino
<i>PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>VPH</i>	Virus del Papiloma Humano
<i>WE</i>	Electrodo de trabajo
<i>CE</i>	Electrodo auxiliar
<i>RE</i>	Electrodo de referencia

Términos

<i>Anticuerpo Monoclonal</i>	Tipo de proteína producida en laboratorio que se acopla a determinados objetivos corporales, como los antígenos presentes en la superficie de las células malignas [1].
<i>Antígeno</i>	Estructuras ajenas al cuerpo que el sistema inmunológico detecta como amenaza, desencadenando la producción de anticuerpos [2].

<i>Biosensor</i>	Dispositivo analítico que combina un elemento biológico (como anticuerpos o enzimas) con un transductor físico o químico para detectar una sustancia específica [3].
<i>Biomarcador</i>	Molécula, gen o característica que se puede medir de forma objetiva y que indica un proceso biológico normal o patológico, o la respuesta a un tratamiento [4].
<i>Carga viral</i>	Cantidad de virus presente en una muestra biológica, importante para evaluar la severidad de una infección o la eficacia de una prueba de detección [5].
<i>Curva de calibración</i>	Método gráfico que permite determinar la concentración de un compuesto desconocido comparando su señal analítica con la de muestras estándar [6].
<i>Detección precoz</i>	Conjunto de procedimientos y pruebas médicas destinadas a identificar enfermedades en etapas tempranas [7].
<i>Dispositivo POCT</i>	Herramienta diagnóstica que permite realizar pruebas cerca del paciente y obtener resultados inmediatos, sin necesidad de un laboratorio centralizado [8].
<i>EDC/NHS</i>	Agentes de acoplamiento químico que permiten unir covalentemente grupos carboxilo y amino, facilitando la inmovilización de biomoléculas como anticuerpos sobre superficies sólidas [9].
<i>Epítopo</i>	Porción específica de un antígeno que es reconocida por un anticuerpo o receptor inmune [10].
<i>Especificidad clínica</i>	Capacidad del sensor para identificar correctamente las muestras negativas, es decir, las que no contienen el virus. Un valor alto de especificidad indica que el sensor genera pocos falsos positivos [11].
<i>Estabilidad del sensor</i>	Habilidad de un sensor para mantener resultados precisos y consistentes a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones [12].
<i>Falsos negativos</i>	Resultados incorrectamente negativos en una prueba diagnóstica, cuando el paciente realmente tiene la enfermedad [13].
<i>Grafeno</i>	Nanomaterial bidimensional compuesto por una sola capa de átomos de carbono en estructura hexagonal. Presenta propiedades eléctricas, térmicas y mecánicas excepcionales [14].
<i>Grafeno funcionalizado</i>	Grafeno modificado químicamente para adquirir nuevas propiedades, como mayor afinidad por moléculas específicas o mayor estabilidad en medios acuosos [15, 16].
<i>Inmovilización covalente</i>	Técnica mediante la cual una biomolécula (como una enzima) se une permanentemente a una superficie sólida a través de enlaces covalentes [17].
<i>LIG</i>	Material poroso tridimensional basado en grafeno, producido por irradiación láser directa sobre precursores de carbono [18].

<i>Lesiones precancerosas</i>	Alteraciones celulares que, sin ser cáncer, pueden convertirse en malignas con el tiempo si no se tratan [19].
<i>Límite de detección</i>	Cantidad mínima de analito que puede ser detectada con confianza por un sistema de medición, pero no necesariamente cuantificada [20].
<i>Límite de cuantificación</i>	Concentración más baja de un analito que puede ser determinada cuantitativamente por un método con una precisión y exactitud aceptables, de forma confiable y demostrable, bajo condiciones operativas definidas [21].
<i>Validación analítica</i>	Proceso sistemático y documentado mediante el cual se evalúan parámetros como la exactitud, precisión, linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, robustez y especificidad, con el objetivo de demostrar que un método analítico es adecuado, confiable y reproducible para su uso previsto [22].
<i>Nanosensor</i>	Dispositivo que detecta estímulos físicos, químicos o biológicos a nivel nanométrico, con alta sensibilidad y especificidad [23].
<i>Neoplasia</i>	Proliferación celular anormal que puede ser benigna (no cancerosa) o maligna (cancerosa) [24].
<i>NIC</i>	Lesión precancerosa que se categoriza en grado 1, 2 y 3 según su severidad [25].
<i>Oncogén</i>	Gen que, al mutar o activarse de forma anormal, puede inducir el desarrollo de cáncer [26].
<i>Orina simulada</i>	Mezcla química que imita la composición de la orina humana, utilizada para investigación sin riesgos biológicos [27].
<i>PCR</i>	Técnica molecular que permite amplificar pequeñas cantidades de ADN, utilizada ampliamente para la detección de infecciones virales [28].
<i>Reproducibilidad</i>	Capacidad de un experimento o prueba para obtener resultados consistentes cuando se repite bajo las mismas condiciones [29].
<i>Sensibilidad analítica</i>	Capacidad del sensor para detectar correctamente las muestras positivas, es decir, aquellas en las que el virus está presente [30].
<i>Tamizaje</i>	Estrategia de detección temprana que consiste en aplicar pruebas diagnósticas a un conjunto de individuos saludables, con factores de riesgo compartidos para la aparición de una enfermedad [31].
<i>Test de Papanicolau</i>	También llamado citología, es un examen ginecológico para detectar células anormales en el cuello uterino que puedan indicar lesiones precancerosas o cáncer [32].
<i>Virus</i>	Microorganismo infeccioso que necesita invadir células vivas para replicarse. Está compuesto por ácidos nucleicos (ADN o ARN) y proteínas [33].

Resumen

El cáncer cervicouterino representa una de las principales causas de mortalidad por cáncer en mujeres en Colombia y América Latina, siendo el virus del papiloma humano (VPH), particularmente las variantes de alto riesgo VPH 16 y VPH 18, el principal agente etiológico. Las limitaciones de acceso, costo y complejidad de los métodos de detección convencionales evidencian la necesidad de tecnologías de diagnóstico innovadoras, portátiles y asequibles. En el presente estudio se reporta el desarrollo y la validación de un biosensor electroquímico basado en LIG para la cuantificación simultánea de proteínas L1 (VPH 16 y 18). Se describen los ensayos preliminares que demuestran la viabilidad del prototipo, estableciendo el marco de referencia para el futuro escalamiento y optimización de este sistema de diagnóstico multiplexado.

Se evaluaron tres tratamientos de modificación superficial del LIG: hidratación previa, exposición a aire y plasma de aire. Los resultados indicaron que el tratamiento con plasma fue el más efectivo para conferir hidrofiliidad al material mediante la introducción de grupos oxigenados en la superficie. Sin embargo, compromete la estabilidad de la red del grafeno al introducir defectos que afectan su conductividad. Por el contrario, la impresión directa demostró ser una alternativa superior para la posterior etapa de inmovilización, ya que garantiza un soporte más homogéneo y con menor alteración de sus propiedades intrínsecas.

La validación analítica del sensor incluyó la evaluación de linealidad, sensibilidad, selectividad y robustez. El biosensor presentó un comportamiento lineal entre 6.25 y 200 ng/mL, con un límite de detección de 2.87 ng/mL y un límite de cuantificación de 8.71 ng/mL, representando una mejora de aproximadamente 62 veces en sensibilidad respecto a un nanosensor colorimétrico previamente desarrollado para la misma aplicación. El proceso de obtención del biosensor demostró ser robusto ante variaciones en el tiempo de incubación del anticuerpo durante el proceso de funcionalización. Se identificó una limitación en la selectividad entre VPH 16 L1 y VPH 18 L1, atribuible a la similitud estructural entre ambas proteínas. La prueba de concepto del dispositivo multiplexado con dos electrodos de trabajo demostró la detección simultánea de ambas proteínas en orina artificial sin interferencia significativa de la matriz urinaria, constituyendo un prototipo con potencial para su aplicación en el diagnóstico no invasivo del VPH.

Palabras Clave: Cáncer cervicouterino, virus del papiloma humano (VPH), VPH 16, VPH 18, grafeno inducido por láser (LIG), biosensor electroquímico, voltametría de onda cuadrada, tecnologías de detección, diagnóstico no invasivo, orina.

Abstract

Cervical cancer remains one of the leading causes of cancer mortality among women in Colombia and Latin America, with human papillomavirus (HPV), particularly high-risk variants HPV 16 and HPV 18, as its primary etiological agent. The limitations in accessibility, cost, and complexity of conventional detection methods highlight the need for innovative, portable, and affordable diagnostic technologies. This study reports the development and validation of an electrochemical biosensor based on laser-induced graphene (LIG) for the simultaneous quantification of L1 proteins (HPV 16 and HPV 18). Preliminary assays demonstrating the viability of the prototype are described, establishing the framework for future scaling and optimization of this multiplexed diagnostic system.

Three surface modification treatments of the LIG were evaluated: substrate hydration, air exposure, and air plasma treatment. Results indicated that plasma treatment was the most effective in conferring hydrophilicity to the material through the introduction of oxygen-containing groups on the surface. However, it compromises the stability of the graphene network by introducing defects that affect its conductivity. In contrast, direct printing proved to be a superior alternative for the subsequent immobilization step, as it provides a more homogeneous support with minimal alteration of its intrinsic properties.

Analytical validation of the sensor included evaluation of linearity, sensitivity, selectivity, and robustness. The biosensor exhibited a linear response between 6.25 and 200 ng/mL, with a limit of detection of 2.87 ng/mL and a limit of quantification of 8.71 ng/mL, representing an approximately 62-fold improvement in sensitivity compared to a previously developed colorimetric nanosensor for the same application. The biosensor fabrication process demonstrated robustness to variations in antibody incubation time during the functionalization protocol. A limitation in selectivity between HPV 16 L1 and HPV 18 L1 was identified, attributed to the structural similarity between both proteins. The proof-of-concept of the multiplexed device with two working electrodes demonstrated simultaneous detection of both proteins in artificial urine without significant interference from the urinary matrix, establishing a prototype with potential for non-invasive HPV diagnostics.

Keywords: Cervical cancer, human papillomavirus (HPV), HPV 16, HPV 18, laser-induced graphene (LIG), electrochemical biosensor, square wave voltammetry, detection technologies, non-invasive diagnostics, urine.

Índice general

1. Introducción	1
2. Planteamiento del Problema	3
3. Justificación	5
4. Objetivos	7
4.1. Objetivo general	7
4.2. Objetivos específicos	7
5. Marco de Referencia	9
5.1. Áreas Temáticas	9
5.2. Marco Teórico	9
5.2.1. VPH	9
5.2.2. Estrategias de prevención del CCU	16
5.2.3. Tecnologías para la detección del VPH y el tamizaje del CCU	19
5.2.4. Biosensores para la detección en salud	21
5.2.5. Clasificación de biosensores	22
5.2.6. Métodos de funcionalización	32
5.3. Trabajos relacionados	34
6. Materiales y Métodos	39
6.1. Materiales y reactivos	39
6.2. Equipos e instrumentación	39
6.3. Software y procesamiento de datos	40
6.4. Desarrollo experimental	40
6.4.1. Fabricación de electrodos de LIG	40
6.4.2. Tratamientos superficiales para la modificación de la hidrofili- cidad	41
6.4.3. Caracterización del material	42
6.4.4. Funcionalización del sensor	43
6.4.5. Validación analítica del biosensor	44
7. Resultados y Discusión	49
7.1. Modificación y caracterización del LIG	49
7.1.1. Caracterización estructural por espectroscopía Raman	49
7.1.2. Caracterización química mediante espectroscopía FTIR	51
7.1.3. Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)	52

7.1.4. Medición del ángulo de contacto	54
7.2. Inmovilización covalente de anticuerpos en la superficie del nanosensor	55
7.2.1. Funcionalización covalente directa	55
7.2.2. Funcionalización mixta mediante 1-PBA	56
7.3. Validación analítica del biosensor	57
7.3.1. Determinación de selectividad	57
7.3.2. Determinación de Linealidad	58
7.3.3. Determinación de la sensibilidad analítica	59
7.3.4. Determinación de robustez	60
7.3.5. Prueba de concepto del sensor multiplexado	61
8. Conclusiones	63
9. Trabajos futuros	65
Bibliografía	67

Índice de figuras

5.1.	Estructura del genoma viral de la variante 16 del VPH. Se muestra la organización de las regiones de expresión temprana (E1–E7), expresión tardía (L1 y L2), y la región larga de control (LCR), así como la función de cada una de las proteínas codificadas por estos genes. (Adaptado de: [34])	10
5.2.	Estructura del VPH.(A) Esquema en corte transversal del virión que muestra su organización interna. La cápside está compuesta por proteínas L1 (proteína de cápside mayor) y L2 (proteína de cápside menor), que protegen el núcleo interno del virus. En el interior se observa el ADN genómico viral, asociado a histonas celulares que estabilizan y compactan el material genético. (B) Representación tridimensional de la cápside externa del VPH, formada por 72 pentámeros de la proteína L1 organizados con simetría icosaédrica. La notación $T = 7d$ indica el número de triangulación de la cápside, un parámetro geométrico que describe el grado de subdivisión de cada cara triangular del icosaedro y, por tanto, la complejidad del ensamblaje viral. (Adaptado de: [35, 36])	11
5.3.	Estructuras de la proteína L1 del VPH-16. Izquierda: Pentámero de L1 visualizado en vista superior para mostrar su organización radial característica en la cápside. Derecha: Monómero de L1 con bucles inmunodominantes BC, DE, FG y HI resaltados en amarillo, en complejo con el anticuerpo Fab F5-196. (Adaptado de: [37, 38]) . . .	12
5.4.	Diagramas de cintas del pentámero de L1 del VPH16 en la conformación presente en partículas similares al virus (VLPs) pequeñas. (A) Tres subunidades están coloreadas en verde, azul y rojo; los brazos C-terminales aparecen en gris para indicar que estas regiones se reordenan durante el ensamblaje en viriones o cápsides completas. (B) Subunidad individual (orientada como la azul en (A)). Se indican los elementos estructurales secundarios: láminas β (B–I), hélices α (h1–h5), y las asas entre láminas (por ejemplo, B–C, C–D). Las terminaciones están marcadas como N (20) (primer residuo ordenado) y C (extremo carboxilo visible). Las cisteínas responsables de los enlaces disulfuro interpentámero se muestran en amarillo (residuos 175 y 428).(Fuente: [39])	13
5.5.	Ciclo de vida del VPH y progresión al cáncer. (a) El VPH accede a las células basales del epitelio a través de abrasiones. Tras su reconocimiento, el virión es endocitado y transportado por la vía endosomal hasta el núcleo, donde inicia la transcripción temprana y puede entrar en fase de latencia. (b) A medida que las células basales se diferencian y migran hacia la superficie, se expresan proteínas estructurales que permiten el ensamblaje y liberación del virión durante la descamación. (c) La persistencia viral en células basales puede llevar a la integración del genoma del VPH, favoreciendo la progresión hacia el cáncer (Fuente: [40])	15

5.6. Algoritmo de cribado basado en el genotipado parcial. Este esquema muestra la ruta clínica ante un resultado positivo en la prueba de detección de VPH. Las pacientes con genotipos 16/18 son remitidas directamente a colposcopia. En casos positivos para otros genotipos de alto riesgo, se realiza citología para clasificar la lesión. Si esta es atípica (ASCUS), se indica colposcopia; si es normal (NLM), se realiza seguimiento a 12 meses (Fuente: [41]).	17
5.7. Representación esquemática de los ciclos de amplificación de la PCR. (Fuente: [42]).	19
5.8. Representación gráfica de la química Invader utilizada en Cervista HPV HR. (Fuente: [43])	20
5.9. Representación esquemática del procedimiento de toma de muestras para una citología cervicouterina (Fuente: [44])	21
5.10. Mecanismo principal de un biosensor (Fuente [45])	22
5.11. Configuraciones de inmunosensores amperométricos. Se representan varios métodos de detección: sin etiquetas, tipo sándwich con etiquetas enzimáticas y no enzimáticas. El antígeno (Ant) se muestra en color rojo, el anticuerpo primario (Ab) de color azul y el anticuerpo secundario (Ab2) de color naranja. Los indicadores del Ab2 se ilustran en tonos violeta, verde o gris, según el tipo de trazador (enzimático, electroactivo o catalítico) (Adaptado de: [46]).	24
5.12. Estructura de un anticuerpo en forma de Y. Las regiones Fab (fragmento de unión al antígeno) están conformadas por los dominios variables V_H (región variable de la cadena pesada) y V_L (región variable de la cadena ligera), responsables del reconocimiento específico del antígeno. Las regiones constantes C_H (cadena pesada) y C_L (cadena ligera) estabilizan la estructura. La región Fc (fragmento cristalizante), formada por los dominios constantes de las cadenas pesadas, media las funciones efectoras del sistema inmunológico. Las cadenas se unen entre sí mediante enlaces disulfuro (S-S). (Fuente: [47]).	25
5.13. Biosensores conformacionales que utilizan FRET o BRET identifican la conexión del ligando a través de modificaciones en la distancia o dirección entre los donantes y los receptores de energía luminosa (Fuente: [48])	26
5.14. Principio de funcionamiento de un biosensor celular. El analito externo se une a una proteína reguladora intracelular, modificando su conformación y activando un promotor asociado al gen regulador. Esta activación desencadena la transcripción del gen reportero en ARNm y su posterior traducción en una proteína reportera, cuya expresión genera una señal cuantificable (lectura), proporcional a la concentración del analito detectado. (Adaptado de: [49])	27

5.15. Ilustración esquemática de diseños de sensores fluorescentes basados en (A) DNAsimas y (B) aptámeros con fluoróforos y supresores marcados covalentemente. (A) En ausencia del analito, el fluoróforo y el supresor permanecen próximos en la cadena sustrato, inhibiendo la señal; al unirse el analito como cofactor, la DNAsima escinde la cadena sustrato en el sitio de corte, separando el fluoróforo del supresor y activando la emisión fluorescente. (B) De manera análoga, la unión del analito al aptámero induce un cambio conformacional que aleja el supresor del fluoróforo, incrementando la señal fluorescente detectada. Adaptado de [50].	28
5.16. Esquema comparativo entre una celda electroquímica convencional y un electrodo serigrafiado (SPE). Los dos sistemas poseen tres electrodos: el electrodo de trabajo (WE), el electrodo de referencia (RE) y el electrodo auxiliar o contraelectrodo (CE), que están conectados a un potenciostato para cuantificar la señal electroquímica producida durante la identificación del analito. Los electrodos serigrafiados (SPE) combinan tres electrodos en un único sustrato, lo que permite su miniaturización y portabilidad. (Fuente: [51]).	29
5.17. Esquema del proceso de fabricación del LIG a partir de poliimida (PI) (A) Representación esquemática de la estructura del LIG. (B) Proceso de escritura por láser sobre un sustrato de polímero, donde el láser convierte selectivamente el polímero en grafeno inducido por láser (LIG). (C) Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) donde se observan los defectos comunes en la estructura LIG en forma de anillos pentagonales y heptagonales. (D) Estructura química de la unidad repetitiva de la poliimida (PI), material precursor del LIG, conformada por grupos imida cíclicos unidos a anillos aromáticos a través de un puente éter. (Fuente: [52])	30
5.18. Representación esquemática de la modificación superficial del grafeno mediante interacciones físicas con polímeros y moléculas pequeñas (Adaptado de: [53]).	32
5.19. Mecanismo de funcionalización covalente del grafeno con quitosano mediado por EDC y NHS. (Adaptado de: [54, 52]).	33
6.1. Dimensiones y formas de los sensores usados durante el desarrollo experimental. (a) Sensor empleado durante las pruebas de validación con un electrodo de trabajo. (b) Sensor multiplexado con dos electrodos de trabajo.	40
6.2. Fotografías de los sensores LIG finalizados con máscara aplicada. (a) Sensor de un único electrodo de trabajo (WE), electrodo de referencia (RE) y contraelectrodo (CE) integrados, empleado en las pruebas de validación. (b) Sensor multiplexado con dos electrodos de trabajo independientes (WE1 y WE2) y RE y CE compartidos, empleado en el ensayo final.	41
6.3. Esquema comparativo de los tratamientos aplicados al grafeno.	42
7.1. Espectro Raman del grupo control.	49

7.2.	Distribución de las relaciones espectrales Raman para cada tratamiento de superficie del LIG. (a) Relación I_G/I_D y (b) relación I_{2D}/I_G . Los datos se presentan como media $\pm$ DE sobre cinco réplicas por tratamiento. El análisis estadístico corresponde a ANOVA de una vía con prueba post-hoc de Tukey ($\alpha = 0.05$). Para I_G/I_D : Hidratación vs Control ($p < 0.001$, ***), Plasma vs Control ($p < 0.0001$, ****), Aire vs Control ($p = 0.866$, n/s). Para I_{2D}/I_G : Aire vs Control ($p < 0.0001$, ****), Plasma vs Control ($p < 0.001$, ***), Hidratación vs Control ($p = 0.622$, n/s).	50
7.3.	Espectros FTIR de los cuatro tratamientos de modificación superficial del LIG. . . .	51
7.4.	Micrografías FE-SEM de los cuatro tratamientos de modificación superficial del LIG. Fila superior (502x): de izquierda a derecha, (a) control, (b) hidratación previa, (c) aire y (d) plasma. Fila inferior (16,0 kx): los mismos tratamientos en el mismo orden, (e)–(h).	53
7.5.	Análisis del ángulo de contacto de los electrodos LIG sometidos a distintos tratamientos de superficie. Los paneles (a) – (d) muestran una fotografía representativa de una de las cinco réplicas realizadas por tratamiento: (a) Control, con un ángulo de contacto de 82.0° ; (b) Hidratación previa del sustrato, con un ángulo de 43.2° ; (c) Aire, con un ángulo de 33.0° ; y (d) Plasma, con un ángulo de 0° . El panel (e) muestra la distribución de los ángulos de contacto por tratamiento. El análisis estadístico corresponde a ANOVA de una vía con prueba post-hoc de Tukey ($\alpha = 0.05$): Control vs Hidratación ($p = 0.004$, **), Control vs Aire ($p = 0.002$, **), Control vs Plasma ($p < 0.001$, ***). Sin diferencias significativas entre los tratamientos entre sí (n/s). . . .	54
7.6.	Evaluación de la funcionalización covalente directa. (a) Gráfica de dispersión de corriente de pico (media $\pm$ DE, $n = 3$). (b) Voltagramas SWV promedio. No se observó una disminución significativa de la señal tras la incubación del analito ($p = 0.279$). . . .	56
7.7.	Resultados de la funcionalización mixta para la detección de VPH 18 L1 (200 ng/mL). (a) Gráfica de dispersión (media $\pm$ DE, $n = 5$) con diferencia significativa confirmada mediante una prueba t ($p < 0.0001$). (b) Voltagramas SWV promedio que muestran la caída de señal esperada.	56
7.8.	Evaluación de la selectividad del biosensor frente a trece analitos a 200 ng/mL. Los datos se expresan como media $\pm$ DE ($n = 5$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, comparando cada grupo frente al control (sin proteína VPH 18 L1). Se identificaron diferencias estadísticamente significativas únicamente para VPH 18 L1 ($p < 0.0001$, ****), VPH 16 L1 ($p < 0.0001$, ****) y VPH 18 E7 ($p = 0.0168$, *). Los demás grupos no presentaron diferencias significativas respecto al control.	58
7.9.	Curva de calibración del biosensor para VPH 18 L1. Los puntos representan la media de la corriente de pico medida por SWV (μ A) frente a la concentración de proteína (ng/mL), con barras de error correspondientes al error estándar (SE) ($n = 5$). La línea roja indica el ajuste lineal ponderado ($R^2 = 0.90$).	59

- 7.10. Curva de calibración del biosensor en el rango de concentraciones de 1.5, 3.1 y 6.25 ng/mL de VPH 18 L1, empleada para la determinación de los parámetros de sensibilidad analítica ($n = 5$ réplicas por punto). El ajuste lineal obtenido corresponde a $y = 173.08 - 8.363x$, con $R^2 = 0.999$ 60
- 7.11. Evaluación del efecto del tiempo de incubación del anticuerpo (60, 90 y 120 min) sobre la señal de corriente del biosensor frente a VPH 18 L1 (200 ng/mL). Los datos se presentan como media $\pm$ DE ($n = 5$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. **** indica $p < 0.0001$ respecto al grupo control; n/s indica ausencia de diferencia estadísticamente significativa entre los tiempos de incubación evaluados ($p > 0.05$). 61
- 7.12. Comparación de la respuesta entre el grupo control y cuatro grupos experimentales correspondientes a las proteínas VPH 16 L1 y VPH 18 L1 (200 ng/mL) diluidas en PBS 1X y orina artificial. Los datos se presentan como media $\pm$ DE ($n = 5$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. Valores de p respecto al control: VPH 16 L1 en PBS 1X, $p = 1.03 \times 10^{-4}$ (***); VPH 18 L1 en PBS 1X, $p = 5.64 \times 10^{-4}$ (***); VPH 16 L1 en orina, $p = 0.014$ (*); VPH 18 L1 en orina, $p = 0.029$ (*). n/s indica ausencia de diferencia estadísticamente significativa entre los demás grupos comparados ($p > 0.05$). 62

Índice de tablas

5.1. Clasificación de los VPH de acuerdo con el riesgo oncogénico y las enfermedades asociadas. (Fuente: [55])	14
5.2. Niveles de prevención aplicados al cáncer cervicouterino, según la Estrategia Mundial de la OMS. (Adaptado de: [56])	17
5.3. Clasificación de Biosensores. (Fuente: Adaptado de [57])	23
5.4. Comparativo de tipos de biosensores según mecanismo de transducción: ventajas y desventajas. (Fuente: [58])	31
5.5. Comparación entre la funcionalización covalente y no covalente del grafeno inducido por láser (LIG) (Fuente: [59, 60])	34
6.1. Componentes utilizados en la preparación de la orina artificial, adaptados de [27]. . .	46

Introducción

El cáncer de cuello uterino (CCU) constituye uno de los problemas de salud pública más relevantes para las mujeres en Colombia y América Latina. Según el Centro de Información ICO/IARC sobre VPH y Cáncer, en Colombia se diagnostican anualmente 4,742 nuevos casos y se registran 2,490 muertes por esta enfermedad, posicionándola como el tercer cáncer más frecuente en mujeres de todas las edades y el segundo en el grupo de 15 a 44 años [61]. El principal agente etiológico del CCU es el virus del papiloma humano (VPH), del cual las variantes de alto riesgo 16 y 18 son responsables del 62.1 % de los casos de cáncer cervical invasivo en el país [61]. Estudios realizados en Colombia en 2023 reportan una prevalencia de VPH de alto riesgo del 26.4 % en mujeres, con mayor concentración en el grupo de 30 a 39 años [62], lo que evidencia la magnitud del problema y la necesidad urgente de estrategias de detección eficaces y accesibles.

A pesar de la disponibilidad de pruebas de tamizaje como la citología cérvico-uterina y las pruebas moleculares de ADN viral, estas presentan limitaciones importantes: baja sensibilidad, necesidad de personal especializado, alto costo y escasa cobertura en zonas rurales y de bajos recursos [63, 64]. A esto se suman barreras culturales y estructurales que persisten en América Latina y que continúan obstaculizando el acceso al diagnóstico oportuno [65]. Adicionalmente, las pruebas convencionales requieren muestras cervicales obtenidas mediante procedimientos invasivos, lo que representa una barrera adicional para muchas mujeres. En este contexto, el desarrollo de tecnologías de detección portátiles, sensibles, no invasivas y de bajo costo se convierte en una necesidad estratégica para mejorar la cobertura del tamizaje y la detección temprana del VPH.

Los biosensores electroquímicos han emergido como una alternativa tecnológica con gran potencial para abordar estas limitaciones, gracias a su elevada sensibilidad analítica, miniaturización, portabilidad y compatibilidad con formatos de punto de atención. Como antecedente directo de este trabajo, Navarro-Chica et al. desarrollaron un sensor colorimétrico con nanopartículas de oro conjugadas con anticuerpos monoclonales para la detección selectiva de las variantes de alto riesgo VPH 16 y VPH 18 [66]. Si bien el sensor es funcional, la toma de muestra cervical representa un obstáculo para el tamizaje masivo debido a su carácter invasivo y a las limitaciones en sensibilidad de la técnica colorimétrica. El desarrollo de una plataforma con mayor sensibilidad capaz de analizar muestras de orina resulta fundamental; esto permitiría una mejor acogida por parte de la población en distintos marcos socioculturales, transformando el dispositivo en una herramienta de diagnóstico inclusiva, de bajo costo y con alta aceptabilidad en sectores de medianos y bajos recursos. Este trabajo surge como una evolución de ese esfuerzo, buscando desarrollar un biosensor electroquímico basado en grafeno inducido por láser (LIG) que permita la detección simultánea de VPH 16 y VPH 18 en orina, una muestra de obtención no invasiva, aprovechando las propiedades electrónicas superiores del grafeno y la técnica electroquímica para alcanzar una sensibilidad mayor

a la del dispositivo previo.

Este trabajo presenta la investigación realizada para el desarrollo y validación de un prototipo de biosensor electroquímico multiplexado basado en LIG, comenzando con el planteamiento del problema, su justificación y los objetivos propuestos. Se abordará un marco teórico que destaca las características del VPH y su relación con el CCU, las tecnologías disponibles para su detección, los fundamentos de los biosensores electroquímicos, las propiedades del grafeno inducido por láser y los métodos de funcionalización de superficies. A partir de esta base, se presentarán los resultados obtenidos en la modificación y caracterización del LIG, la optimización del protocolo de funcionalización con los anticuerpos Anti-VPH 16 L1 y Anti-VPH 18 L1, y la validación analítica del dispositivo incluyendo su prueba de concepto en orina artificial. Finalmente, se expondrán las conclusiones derivadas del estudio y se señalarán posibles líneas de investigación para el futuro.

Planteamiento del Problema

El cáncer de cuello uterino (CCU) no solo es una enfermedad prevenible [67], sino también un reflejo de las profundas desigualdades en salud que afectan a millones de mujeres en el mundo. Estas desigualdades se manifiestan en las barreras estructurales, económicas y geográficas que dificultan el acceso oportuno a servicios de salud, especialmente en contextos donde la detección se realiza de manera no organizada, es decir, únicamente cuando las mujeres acceden al sistema sanitario por otras razones [64, 65]. En muchos países de América Latina, las mujeres solo acceden al tamizaje cuando tienen la “oportunidad”, lo que genera procesos ineficientes y marcados por inequidades persistentes [68]. A pesar de los avances científicos y la disponibilidad de estrategias de detección temprana, miles de vidas se pierden cada año, especialmente en países de ingresos medianos y bajos. A nivel mundial, el cáncer de cuello uterino es el cuarto tipo de cáncer más común entre las mujeres, con una incidencia estimada de 600, 000 nuevos casos en 2022. Ese mismo año, más del 94 % de las 350, 000 muertes causadas por esta enfermedad ocurrieron en países de ingresos medianos y bajos, reflejando la marcada desigualdad en el acceso a la prevención y al tratamiento oportuno [67]. En Colombia, de acuerdo con Globocan 2022, el CCU fue el tercer tipo de cáncer más frecuente en mujeres de todas las edades, consolidándose como un problema de salud pública prioritario [69]. A diferencia de otros tipos de cáncer, el CCU cuenta con un agente causal claro en la mayoría de los casos: el VPH. Este virus, que se transmite principalmente a través del contacto directo de piel con piel durante relaciones sexuales vaginales, anales u orales, está presente en más de 200 variantes [70], de las cuales las cepas 16 y 18 son responsables de aproximadamente el 70 % de los casos de CCU y de las lesiones precancerosas del cuello uterino [71].

Aunque la mayoría de las infecciones por VPH son transitorias y eliminadas por el sistema inmunológico en uno o dos años [72], las variantes de alto riesgo pueden persistir, inducir alteraciones epiteliales y evolucionar en lesiones precursoras llamadas neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) [73]. Estas lesiones, especialmente las de grado 3 (NIC3) constituyen la fase más avanzada de la lesión premaligna, presentando un riesgo considerablemente alto de evolucionar a cáncer cervicouterino invasivo si no se detectan y tratan oportunamente [74]. Las pruebas de detección temprana, como la citología cérvico-uterina (Pap) y las pruebas moleculares para la identificación del VPH, desempeñan un papel crucial en la prevención del CCU. Sin embargo, estas técnicas aún presentan limitaciones importantes para erradicar completamente la infección por VPH. Entre los desafíos más comunes se encuentran la baja sensibilidad, la especificidad limitada, la escasa reproducibilidad, la necesidad de personal altamente calificado para su interpretación y el alto costo de las instalaciones necesarias para su aplicación [75].

Adicionalmente, el acceso a estas pruebas continúa siendo limitado para una gran proporción de mujeres en Colombia, particularmente en regiones rurales y de bajos recursos, donde la cobertura

del sistema de salud es insuficiente, los servicios especializados escasos y las barreras socioculturales o económicas impiden la realización del tamizaje regular [76]. Esto ha llevado a que la mayoría de los casos de CCU se detecten en estadios avanzados, cuando las opciones terapéuticas son más costosas, complejas y con menor probabilidad de éxito [77]. La detección oportuna permite tratar las lesiones precancerosas antes de que progresen a cáncer, lo que mejora considerablemente el pronóstico de las pacientes. Asimismo, cuando ya se ha desarrollado la enfermedad, las pruebas de tamizaje permiten su identificación en etapas iniciales, en las cuales los tratamientos son más efectivos y las tasas de supervivencia más altas [78]. Uno de los aspectos más preocupantes en el contexto colombiano es la detección tardía del cáncer de cuello uterino. Ante esta situación, se hace urgente implementar estrategias más efectivas, accesibles y adaptadas a las condiciones sociales y geográficas del país, que garanticen un diagnóstico oportuno y la reducción de la mortalidad por CCU [79]. En respuesta a estas limitaciones, los biosensores electroquímicos han emergido como una alternativa tecnológica con gran potencial para mejorar la detección del VPH y del CCU en estadios tempranos. Estos dispositivos se caracterizan por su sensibilidad analítica, elevada especificidad, bajo costo de producción, facilidad de miniaturización y portabilidad, lo que los convierte en herramientas adecuadas para ser utilizadas incluso en entornos con recursos limitados [80]. Su capacidad para detectar biomarcadores en concentraciones ultra-bajas es especialmente valiosa en etapas iniciales de la enfermedad, donde la intervención temprana es crítica. Además, al poder utilizarse como dispositivos point-of-care, ofrecen la posibilidad de ser implementados tanto en consultorios médicos como en el hogar, lo que amplía su cobertura y facilita su integración en estrategias de salud pública [75, 81, 82].

Justificación

El CCU continúa siendo un problema de salud pública relevante, especialmente en países de ingresos medios y bajos como Colombia, donde persisten múltiples barreras para su prevención y detección temprana. Los genotipos 16 y 18 del VPH son responsables de aproximadamente el 70 % de los casos de CCU, lo que hace que la detección oportuna de estos sea una prioridad clínica y epidemiológica con el fin de reducir la progresión hacia lesiones de alto grado o cáncer invasivo [67]. El diagnóstico tradicional mediante citología cervicovaginal, aunque ampliamente utilizado, presenta limitaciones importantes, como su sensibilidad, ya que suele generar falsos negativos, especialmente en fases tempranas cuando aún no hay alteraciones visibles en las células [83, 84]. Esta técnica también depende de personal capacitado, infraestructura clínica y logística que no siempre están disponibles en regiones rurales o apartadas. Métodos moleculares como la PCR han mejorado la sensibilidad diagnóstica, pero su alto costo, la necesidad de equipos especializados y la posibilidad de errores en casos con carga viral baja, limitan su aplicación masiva [75]. Ante estas limitaciones, los biosensores electroquímicos emergen como una alternativa innovadora y prometedora. Estos dispositivos permiten la detección de biomarcadores mediante la conversión de interacciones moleculares en señales eléctricas cuantificables, ofreciendo alta especificidad, sensibilidad y límites de detección extremadamente bajos [85]. En particular, los biosensores que emplean anticuerpos específicos contra las oncoproteínas del VPH (como E6 y E7) logran una detección precisa, incluso en condiciones fisiológicas complejas, gracias a la alta afinidad de estos bioreceptores [70]. El presente proyecto propone el desarrollo de un biosensor electroquímico basado en grafeno inducido por láser (LIG) por sus siglas en inglés, un material con propiedades excepcionales para aplicaciones biomédicas. El LIG destaca por su alta movilidad electrónica, excelente conductividad, gran área superficial y capacidad para inmovilizar biomoléculas mediante interacciones π - π o enlaces covalentes, lo cual optimiza la detección específica de analitos [86]. Su fabricación es económica, rápida y directa sobre polímeros comerciales, lo que permite obtener superficies porosas con alta densidad de sitios activos para una funcionalización eficiente [77]. A diferencia de otros métodos que requieren muestras clínicas invasivas, este sensor será diseñado para detectar las moléculas de interés en orina. Diversas investigaciones han demostrado que la orina es una muestra viable para la detección del VPH, con resultados comparables al hisopado cervical en sensibilidad (83.3 %) y especificidad (81.8 %) [87]. Usar esta matriz simplifica la recolección, reduce los costos operativos y elimina la necesidad de personal clínico, lo cual facilita su aplicación en contextos donde el acceso al sistema de salud es limitado. En Colombia, muchas comunidades enfrentan barreras estructurales que restringen el acceso a servicios de salud, tales como la pobreza, aislamiento geográfico, discriminación y sistemas poco adaptados culturalmente [88, 89]. Un ejemplo de estas comunidades son las mujeres indígenas, en quienes estas barreras se agravan aún más por dinámicas sociales específicas como la alta

movilidad, el bajo seguimiento en los controles médicos y una baja adherencia a los programas de tamizaje. Esto hace que, incluso cuando se detecta una infección por VPH, sea difícil hacer un seguimiento efectivo para determinar si la infección se vuelve persistente [90]. Un dispositivo portátil, económico y fácil de usar puede marcar la diferencia en estos escenarios. La posibilidad de realizar pruebas rápidas y no invasivas le da a las mujeres mayor autonomía sobre su salud, mejora el acceso al diagnóstico temprano y contribuye a reducir la carga del cáncer cervicouterino en poblaciones tradicionalmente desatendidas. La combinación de tecnología accesible, enfoque preventivo y adaptabilidad a distintos contextos posiciona este proyecto como una propuesta pertinente y con alto potencial de impacto. Más allá de una solución tecnológica, responde a una necesidad urgente de equidad en salud. Su desarrollo puede fortalecer estrategias de diagnóstico oportuno, optimizar recursos del sistema sanitario y avanzar hacia una cobertura más justa y efectiva en la prevención del cáncer en Colombia y América Latina.

Objetivos

4.1. Objetivo general

Desarrollar un biosensor electroquímico basado en LIG, funcionalizado con anticuerpos específicos, para la detección simultánea de las variantes de alto riesgo 16 y 18 del virus del papiloma humano (VPH) en orina simulada.

4.2. Objetivos específicos

- Modificar el LIG para garantizar su hidrofiliidad de manera reproducible.
- Optimizar la inmovilización covalente de anticuerpos en la superficie del nanosensor para permitir la detección simultánea de las variantes de alto riesgo VPH 16 y VPH 18.
- Validar analíticamente el sensor basado en LIG para la detección simultánea de las variantes de alto riesgo del VPH 16 y 18.

Marco de Referencia

5.1. Áreas Temáticas

- Ingeniería en medicina y biología - Ingeniería biomédica - Biotecnología.
- Ingeniería en medicina y biología - Ingeniería biomédica - Atención sanitaria electrónica.
- Ingeniería en medicina y biología - Ingeniería biomédica - Punto de atención.
- Ingeniería en medicina y biología - Biología - Nanobiociencia - Nanobiotecnología.
- Ciencia - general - Biosensores
- Ciencia - general - Electroquímica
- Ingeniería en medicina y biología - Biología - Bioquímica - Proteínas.
- Ingeniería en medicina y biología - Biología - Procesos biológicos - Biología molecular.
- Nanotecnología - Bionanotecnología - Nanosensores.

5.2. Marco Teórico

5.2.1. VPH

Características generales del VPH

El virus del papiloma humano (VPH) es una infección de transmisión sexual causada por el virus del papiloma humano que consta de ADN de doble cadena y forma parte de la familia Papillomaviridae. En este grupo, se encuentran diversos géneros, aunque los más relevantes en términos de su posible origen oncogénico son los géneros Alfa (α), Beta (β), Gamma (γ), Mu (μ) y Nu (ν) [91]. El VPH es un virus desnudo, lo que implica que no posee una membrana lipídica externa. Esta característica complica la identificación inmunológica del virus, dado que la falta de una envoltura lipídica contribuye a su bajo nivel de inmunogenicidad, lo que reduce la activación de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas eficaces [92]. Su diámetro varía entre 45 y 55 nanómetros, y su genoma se compone de alrededor de 8.000 pares de bases. Este se divide en áreas codificantes (que generan proteínas) y una zona no codificante denominada región larga de control (LCR). Aunque la

LCR no produce proteínas directamente, desempeña roles fundamentales en el control de la transcripción, replicación genómica y ensamblaje de nuevas partículas virales [93]. El genoma del VPH está organizado en genes de expresión temprana (E) y expresión tardía (L), como se muestra en la Figura 5.1.

Los genes E1, E2 y E4 regulan la replicación del ADN viral y la modulación del ciclo celular. Los genes E5, E6 y E7 codifican proteínas oncogénicas del mismo nombre, las cuales interfieren con funciones clave de la célula huésped. Durante la infección, el ADN viral puede integrarse en el genoma de la célula huésped. En este proceso, los genes E6 y E7 se sobreexpresan de manera persistente, lo que resulta fundamental en la alteración del ciclo celular.

La proteína E6 se une a la proteína asociada E6AP, formando un complejo que dirige la degradación de la proteína supresora de tumores p53 [94]. De igual modo, E6 interactúa con dominios PDZ de proteínas involucradas en la polaridad y adhesión celular, procesos importantes para la conservación de la estructura celular y del epitelio. Al interferir con estos procesos, E6 contribuye a la pérdida de control tisular, facilitando la progresión tumoral [95, 96, 97]. Además, E6 puede activar la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT), cuya expresión es más prevalente en tejidos tumorales, promoviendo así la inmortalización celular [98]. De esta forma, E6 desempeña un papel importante en la modulación de la progresión hacia la malignidad [99]. Por su parte, E7 degrada la proteína del retinoblastoma (pRB), lo que desregula el ciclo celular y favorece la proliferación descontrolada de las células infectadas [100]. En cuanto a los genes tardíos L1 y L2, estos codifican las proteínas estructurales que constituyen la cápside viral [101].

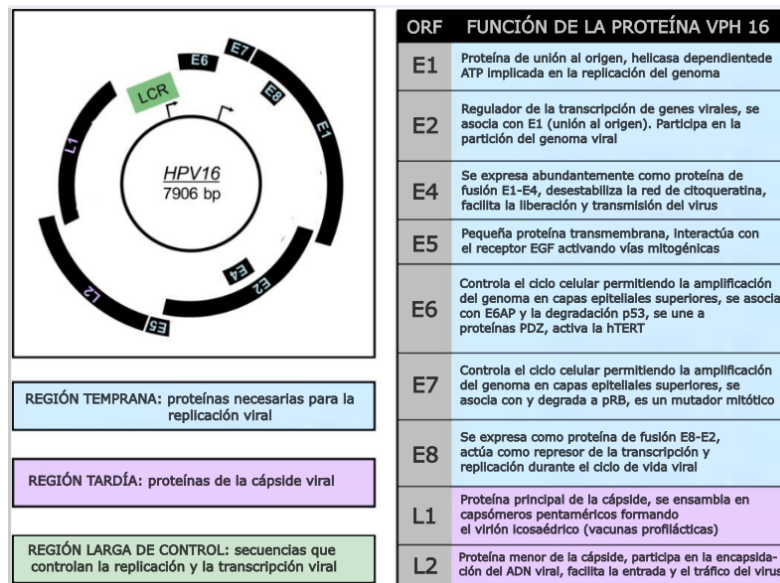


Figura 5.1: Estructura del genoma viral de la variante 16 del VPH. Se muestra la organización de las regiones de expresión temprana (E1–E7), expresión tardía (L1 y L2), y la región larga de control (LCR), así como la función de cada una de las proteínas codificadas por estos genes. (Adaptado de: [34])

Estructura del VPH y la cápside viral

La cápside del VPH está compuesta principalmente por la proteína L1, que se organiza siguiendo una simetría icosaédrica con patrón de triangulación $T=7$. Este patrón geométrico describe cómo se ensamblan los pentámeros proteicos para formar una estructura casi esférica, altamente simétrica y estable. Lo que posibilita una disposición cuasi-equivalente de 360 réplicas de la proteína L1 distribuidas en 72 pentámeros. Esta estructura no solo otorga estabilidad estructural al virión, sino que también participa en la identificación de receptores celulares y el comienzo del proceso infeccioso mediante su interacción con la proteína L2 [102].

Durante la entrada a la célula, el virión experimenta una acidificación endosomal que provoca cambios en la estructura de la cápside, permitiendo que L1 se separe parcialmente del complejo L2/ADN viral. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que una fracción de L1 permanece asociada al genoma durante el transporte intracelular, posiblemente en forma de capsómeros. Esta asociación residual podría desempeñar un papel clave en la estabilización del complejo subviral y en la protección del ADN viral durante el tránsito hacia el núcleo celular, contribuyendo así a una infección eficiente [103, 104].

Por su parte, la proteína L2, aunque menos abundante, es crucial en el envasado del ADN viral y desempeña un papel mediador en el proceso de liberación del genoma hacia el núcleo de la célula huésped tras la entrada del virus. Esta proteína facilita la evasión del sistema endosomal y guía el complejo ADN-L2 hacia el núcleo para la posterior expresión del material genético viral [105], como se ilustra en la Figura 5.2.

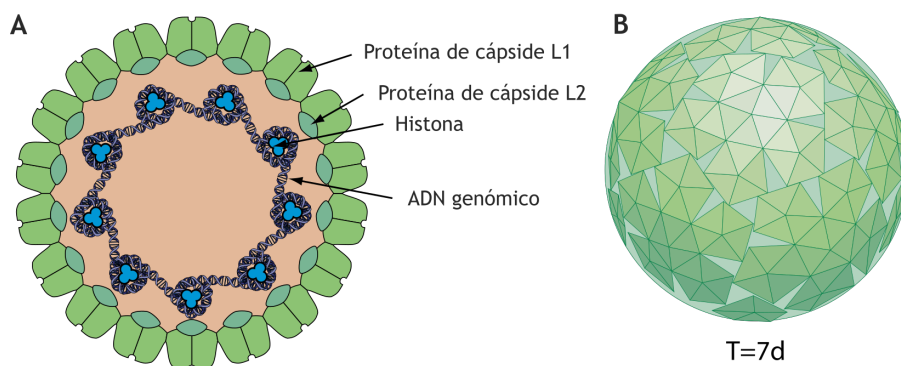


Figura 5.2: Estructura del VPH. (A) Esquema en corte transversal del virión que muestra su organización interna. La cápside está compuesta por proteínas L1 (proteína de cápside mayor) y L2 (proteína de cápside menor), que protegen el núcleo interno del virus. En el interior se observa el ADN genómico viral, asociado a histonas celulares que estabilizan y compactan el material genético. (B) Representación tridimensional de la cápside externa del VPH, formada por 72 pentámeros de la proteína L1 organizados con simetría icosaédrica. La notación $T = 7d$ indica el número de triangulación de la cápside, un parámetro geométrico que describe el grado de subdivisión de cada cara triangular del icosaedro y, por tanto, la complejidad del ensamblaje viral. (Adaptado de: [35, 36])

Organización estructural de la proteína L1

La proteína L1 desempeña un rol crucial en la estabilidad estructural de la cápside viral, pues establece interacciones tanto internas como externas entre los capsómeros, garantizando así la integridad del virión [106]. Además, las regiones de superficie de la proteína L1 del virus del papilo-ma humano, en particular los bucles estructurales BC, DE, FG y HI, han sido distinguidas como los epítomos inmunodominantes encargados de ser reconocidos por anticuerpos neutralizantes tipo-específicos [107]. Esto las sitúa como objetivos esenciales tanto para la creación de vacunas como para biosensores diagnósticos [107, 108]. Estas cadenas conformacionales se diferencian de la cápside viral y representan los puntos de interacción inicial con anticuerpos monoclonales, como se observa en la Figura 5.3

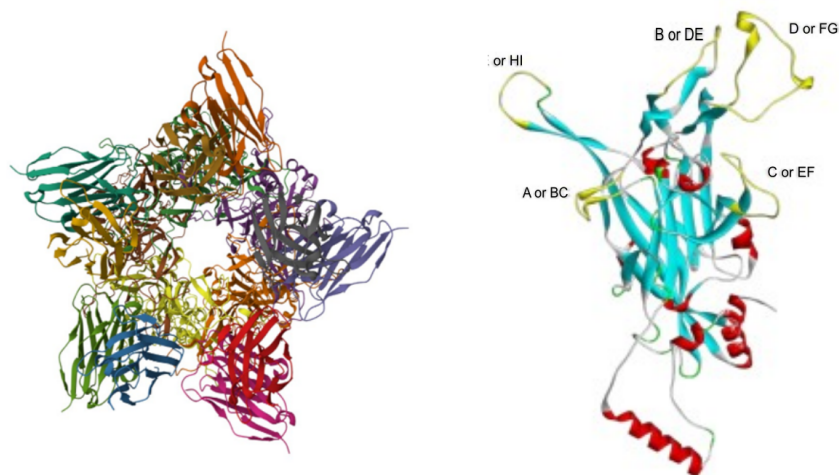


Figura 5.3: Estructuras de la proteína L1 del VPH-16. **Izquierda:** Pentámero de L1 visualizado en vista superior para mostrar su organización radial característica en la cápside. **Derecha:** Monómero de L1 con bucles inmunodominantes BC, DE, FG y HI resaltados en amarillo, en complejo con el anticuerpo Fab F5-196. (Adaptado de: [37, 38])

Se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos contra estos epítomos presentan alta eficacia en sistemas de detección basados en nanomateriales, como biosensores funcionalizados con grafeno, dado que estas regiones garantizan una exposición accesible y específica del antígeno [109]. L1 está compuesta por 504 aminoácidos, tiene un peso molecular cercano a 55 kDa y constituye cerca del 80 % de la proteína total del virus [110].

La configuración tridimensional de L1 se divide en tres zonas esenciales: el núcleo central, la región amino (N-terminal) y la región carboxilo (C-terminal). El N-terminal incluye los primeros 19 aminoácidos, que se mantienen altamente conservados entre los distintos tipos de VPH, lo que resalta su papel fundamental en la formación del virión. La región central (aminoácidos 20-382) está compuesta por 11 láminas β , que se conectan entre sí mediante ciclos ubicados en la superficie de

los capsómeros. Estas conexiones estructurales permiten mantener la forma del virión y destacan áreas clave para el reconocimiento inmunológico [111].

La región C-terminal (aminoácidos 383-504) se estructura en cinco hélices α (h1-h5). Estos componentes cumplen roles fundamentales en la estabilidad de la cápside viral. Las hélices h2, h3 y h4 tienen una interacción directa con los monómeros vecinos, promoviendo la creación de capsómeros pentaméricos [112]. La hélice h1 se acopla a las láminas β internas (β -E y β -F) del núcleo proteico, fortaleciendo la estructura del virión, mientras que las hélices h4 y h5 están asociadas con la lámina β -J, la cual funciona como una bisagra flexible al vincular el brazo C-terminal con el núcleo, facilitando los reajustes conformacionales requeridos para estabilizar la cápside [113], como se representa en la Figura 5.4

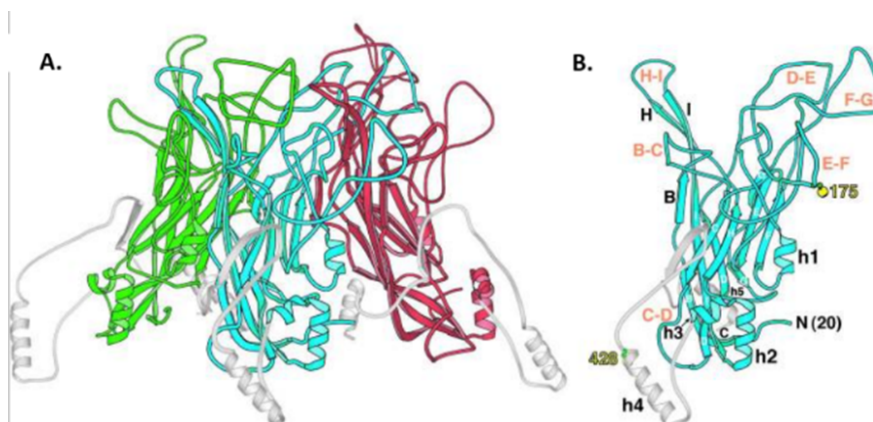


Figura 5.4: Diagramas de cintas del pentámero de L1 del VPH16 en la conformación presente en partículas similares al virus (VLPs) pequeñas. **(A)** Tres subunidades están coloreadas en verde, azul y rojo; los brazos C-terminales aparecen en gris para indicar que estas regiones se reordenan durante el ensamblaje en viriones o cápsides completas. **(B)** Subunidad individual (orientada como la azul en **(A)**). Se indican los elementos estructurales secundarios: láminas β (B-I), hélices α (h1-h5), y las asas entre láminas (por ejemplo, B-C, C-D). Las terminaciones están marcadas como **N** (20) (primer residuo ordenado) y **C** (extremo carboxilo visible). Las cisteínas responsables de los enlaces disulfuro interpentámero se muestran en amarillo (residuos 175 y 428). (Fuente: [39])

Clasificación Clínico-patológica del VPH

El VPH pertenece a un grupo de virus epiteliotrófos que infectan principalmente la piel y las membranas mucosas. Su acción genera proliferaciones benignas, como los papilomas, que bajo ciertas condiciones pueden sufrir transformaciones malignas. El VPH es reconocido como el agente etiológico principal del carcinoma cervicouterino, por lo que entender su biología es crucial para tratar de manera apropiada los procesos de carcinogénesis cervical [114].

Actualmente, más de 200 tipos de VPH han sido identificados, cuyas manifestaciones clínicas abarcan un extenso espectro de lesiones proliferativas en la piel, las mucosas bucales, laríngeas y

el tracto anogenital [115]. Al menos 20 de estos tipos presentan preferencia por infectar el epitelio de la región anogenital, siendo los principales agentes etiológicos de las neoplasias asociadas a este virus. En el sistema reproductivo femenino, algunos tipos se relacionan con varias afecciones, tales como los condilomas acuminados (verrugas genitales), la papulosis bowenoide (lesiones papulares de tonalidad rojo-violácea), las neoplasias intraepiteliales cervicales, vaginales y vulvares, además del surgimiento de cáncer invasivo [116]. Desde el punto de vista clínico y epidemiológico, los tipos de VPH se clasifican en dos grandes categorías según su potencial oncogénico: bajo riesgo y alto riesgo, como se resume en la Tabla 5.1

Tabla 5.1: Clasificación de los VPH de acuerdo con el riesgo oncogénico y las enfermedades asociadas. (Fuente: [55])

Clasificación de 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.

Los genotipos de VPH de bajo riesgo, tales como los genotipos 6 y 11, son los causantes de la mayoría de las verrugas genitales y no tienen una relación directa con la aparición de cáncer. Otros genotipos de bajo riesgo incluyen los tipos 40, 42, 43, 44, 54, 61 y 70, que también pueden ser identificados mediante pruebas moleculares basadas en detección de ADN. Por otro lado, los VPH de alto riesgo incluyen un mínimo de 17 genotipos, incluyendo VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 [117]. En este conjunto, los tipos 16 y 18, se vinculan a lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL) y neoplasias intraepiteliales cervicales (CIN II/III), consideradas precursoras del cáncer cervicouterino. La clasificación histológica empleada en el contexto clínico distingue entre CIN I (bajo grado), asociada a infecciones transitorias, y CIN II/III (alto grado), que implican un mayor riesgo de progresión maligna NIH [118]. La implicación del VPH no se limita al cuello uterino. Diversos estudios han demostrado su participación en cánceres de pene, ano, orofaringe y laringe, especialmente en individuos inmunocomprometidos o con infecciones persistentes por tipos oncogénicos [119].

Oncogénesis Viral

La infección por el VPH requiere contacto directo con epitelios, generalmente a través de microabrasiones que ocurren durante el contacto sexual, las cuales permiten el acceso del virus a las células basales del epitelio de la mucosa genital. Una vez allí, el VPH aprovecha mecanismos de endocitosis mediada por clatrina para ingresar a la célula huésped, donde libera su material genético y comienza su ciclo de replicación [40], como se muestra en la Figura 5.5

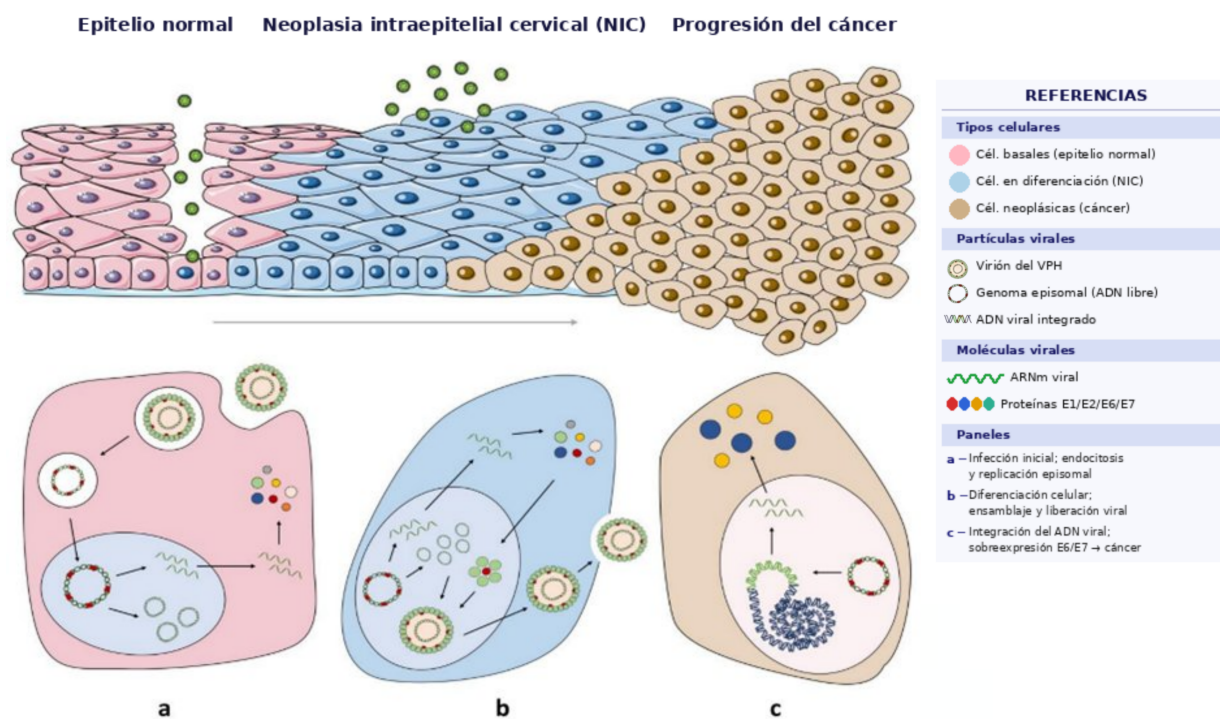


Figura 5.5: Ciclo de vida del VPH y progresión al cáncer. **(a)** El VPH accede a las células basales del epitelio a través de abrasiones. Tras su reconocimiento, el virión es endocitado y transportado por la vía endosomal hasta el núcleo, donde inicia la transcripción temprana y puede entrar en fase de latencia. **(b)** A medida que las células basales se diferencian y migran hacia la superficie, se expresan proteínas estructurales que permiten el ensamblaje y liberación del virión durante la descamación. **(c)** La persistencia viral en células basales puede llevar a la integración del genoma del VPH, favoreciendo la progresión hacia el cáncer (Fuente: [40])

El VPH en su etapa inicial puede mantenerse en forma episomal, es decir, como ADN circular independiente no integrado al genoma celular, lo que posibilita una infección latente o productiva sin modificaciones directas en el ADN del huésped. Este estado suele estar relacionado con lesiones intraepiteliales de bajo grado (CIN I), que en la mayoría de los casos son transitorias y se resuelven espontáneamente [120]. No obstante, cuando la infección persiste, particularmente con genotipos de alto riesgo como VPH-16 y VPH-18, puede producirse la integración del genoma viral en zonas de fragilidad cromosómica, lo que pone en riesgo la estabilidad genética de las células y marca un punto de inflexión hacia la transformación neoplásica [121]. En el proceso de integración, el virus suele interrumpir la región E2 de su propio genoma, provocando la sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7. Estas proteínas virales obstaculizan vías esenciales de regulación celular: E6 fomenta la degradación de la proteína p53 a través de su interacción con la ligasa ubiquitina E6AP, evitando de esta manera la apoptosis. Por otro lado, E7 inactiva la proteína pRb, liberando el factor de

transcripción E2F y promoviendo una proliferación celular descontrolada [122]. Este conjunto de alteraciones moleculares no solo obstaculiza la diferenciación epitelial, sino que también promueve la acumulación de fallos genéticos, generando condiciones favorables para que las células infectadas adquieran características neoplásicas. En consecuencia, el ciclo viral pasa de una etapa productiva a una etapa transformante, donde la célula pierde la capacidad de reparar su ADN o eliminar el genoma viral, lo que favorece la progresión hacia lesiones de alto grado (CIN II/III) y, eventualmente, hacia cáncer cervical invasivo [121].

5.2.2. Estrategias de prevención del CCU

Tamización

Dentro de las estrategias de prevención del CCU, el tamizaje, también denominado cribado, cumple un papel fundamental al enfocarse en la detección precoz de lesiones premalignas o malignas en mujeres aparentemente sanas, a través de exámenes diagnósticos que facilitan la intervención precoz y, en consecuencia, la reducción de la mortalidad vinculada a esta enfermedad [123]. En Colombia, la implementación del tamizaje se adapta según el grupo etario y el contexto territorial. Por lo tanto, se aconseja la citología cervicovaginal para mujeres de 25 a 29 años cada tres años si los hallazgos son negativos, mientras que la prueba del ADN del VPH se aconseja para mujeres de 30 a 65 años, con una periodicidad de cada cinco años en caso de resultados normales. Igualmente, en áreas rurales o de acceso complicado, se recomienda la revisión visual como alternativa para mujeres de entre 30 y 50 años [124]. En particular, para las mujeres con VIH, se recomienda comenzar el tamizaje desde los 21 años o el primer año de actividad sexual, siguiendo un programa de control más estricto que comprende pruebas citológicas anuales y una revisión visual del tracto anogenital [125]. Este esquema se alinea con el enfoque de cribado primario basado en genotipado parcial del VPH, que ha sido promovido por la OMS, y cuyo algoritmo diagnóstico se muestra en la Figura 5.6.

Como la mayoría de las infecciones por VPH son transitorias y no están vinculadas a lesiones, incluso en mujeres de más de 30 años, el test de VPH muestra una especificidad relativamente baja, de aproximadamente el 89 % [126]. Esto requiere la realización de un segundo tamizaje (triage) para detectar, entre el conjunto de mujeres que tengan VPH positivo, aquellas que realmente presentan lesiones precancerosas o cáncer, los cuales deberán confirmarse mediante estudios histológicos. En este contexto, la citología ha sido adoptada como método de triage en varios países que utilizan el test de VPH como herramienta primaria de tamización, debido a su capacidad para identificar alteraciones celulares relevantes [127].

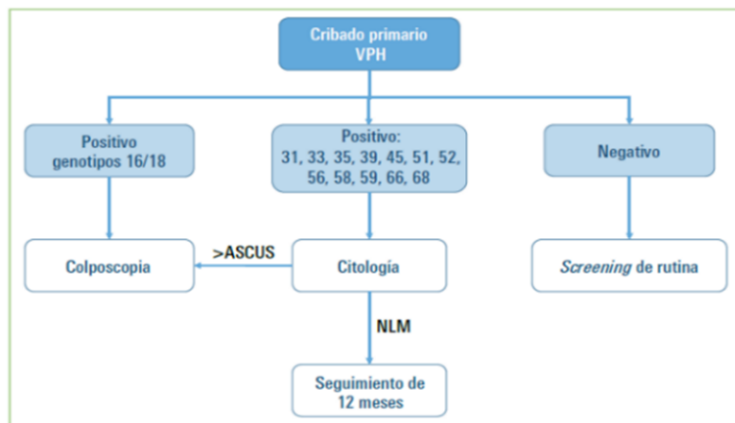


Figura 5.6: Algoritmo de cribado basado en el genotipado parcial. Este esquema muestra la ruta clínica ante un resultado positivo en la prueba de detección de VPH. Las pacientes con genotipos 16/18 son remitidas directamente a colposcopia. En casos positivos para otros genotipos de alto riesgo, se realiza citología para clasificar la lesión. Si esta es atípica (ASCUS), se indica colposcopia; si es normal (NLM), se realiza seguimiento a 12 meses (Fuente: [41]).

De acuerdo con el enfoque establecido por el Ministerio de Salud, las estrategias de prevención del cáncer de cuello uterino se estructuran en tres etapas: primaria, secundaria y terciaria. Cada una corresponde a una etapa diferente del proceso de salud-enfermedad, con metas y medidas particulares. La Tabla 5.2 presenta una síntesis comparativa de estos niveles según su definición, objetivo, etapa de la enfermedad y tipo de intervención.

Tabla 5.2: Niveles de prevención aplicados al cáncer cervicouterino, según la Estrategia Mundial de la OMS. (Adaptado de: [56])

Categoría	Primario	Secundario	Terciario
Definición	Acciones orientadas a evitar la aparición de la enfermedad mediante el control de sus agentes causales y factores de riesgo.	Medidas orientadas a detectar precozmente la enfermedad o sus lesiones precursoras para detener su progresión.	Medidas orientadas a tratar la enfermedad establecida, reducir sus complicaciones y mejorar la calidad de vida.
Objetivo	Disminuir la incidencia de la infección por VPH y del CCU.	Reducir la prevalencia de lesiones precancerosas y detectar el cáncer en estadios tempranos.	Aumentar la supervivencia y la calidad de vida de las pacientes con CCU.
Etapa de la enfermedad.	Prepatogénico.	Patogénico temprano.	Patogénico tardío / secuelas.
Actividades	- Vacunación contra el VPH (niñas 9-14 años). - Educación sexual e información sobre factores de riesgo. - Promoción del uso de preservativo.	- Tamizaje mediante prueba de VPH, citología (Papanicolaou) o inspección visual con ácido acético (IVAA). - Tratamiento de lesiones precancerosas (crioterapia, LEEP, conización).	- Tratamiento del cáncer invasivo: cirugía, radioterapia y quimioterapia. - Cuidados paliativos. - Seguimiento y rehabilitación oncológica.

Prevención primaria

La prevención primaria del cáncer de cuello uterino (CCU) se centra en prevenir el surgimiento de la patología a través de acciones sobre los factores de riesgo. Estas tácticas abarcan la educación sexual integral destinada a niños, niñas y adolescentes, tratando temas como el comienzo de la vida sexual, el uso de preservativos y otras medidas de protección frente a infecciones de transmisión sexual (ITS), incluyendo la infección por el VPH [56]. Previo a los 25 años, se considera fundamental la promoción de la salud sexual y reproductiva, destacando la importancia de la vacunación contra el VPH como una herramienta clave en la prevención del CCU. Esta vacuna está indicada para niñas y niños, preferentemente antes del inicio de relaciones sexuales, y forma parte de los programas nacionales de inmunización en muchos países. Actualmente, existen seis vacunas aprobadas para prevenir la infección por genotipos de alto riesgo del VPH. Entre ellas, Gardasil 9 ha demostrado una eficacia cercana al 100 % en la prevención de lesiones precancerosas e infecciones en cuello uterino, vulva y vagina causadas por los siete genotipos oncogénicos que cubre (16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58) [128]. Por su parte, la vacuna bivalente Cervarix ha mostrado una eficacia de aproximadamente 93 % frente a lesiones relacionadas con los tipos 16 y 18 [129], así como una protección cruzada considerable contra los tipos 31, 33 y 45 [130], lo que amplía su impacto preventivo más allá de su espectro original, contribuyendo a la reducción de lesiones precancerosas y cánceres asociados a la infección viral.

Prevención secundaria

La prevención secundaria se centra en la detección precoz de lesiones precancerosas o del cáncer en estadios iniciales, a través de programas organizados de tamizaje o cribado. El propósito principal de estos programas es disminuir la mortalidad vinculada al CCU, lo que se consigue a través de la reducción de la incidencia de la enfermedad invasiva, mediante la detección temprana de lesiones precursoras [129]. Por más de medio siglo, la citología cervical (Papanicolaou) ha constituido el eje central de los programas de prevención. Este método ha facilitado la identificación de irregularidades celulares antes de que se transformen en cáncer invasivo. Si se detectan resultados anormales, se realiza una colposcopia, una biopsia dirigida e histopatología, para corroborar el diagnóstico [131]. Actualmente, el tamizaje se inicia, idealmente, tres años después del comienzo de la vida sexual, o al año en mujeres inmunocomprometidas o con diagnóstico de VIH. Adicionalmente, se han implementado tecnologías como las pruebas de ADN del VPH, que incrementan la sensibilidad del cribado, aunque necesitan un examen adicional (como la citología) para incrementar su especificidad y prevenir diagnósticos excesivos [132].

Prevención terciaria

La prevención terciaria busca reducir el efecto de la enfermedad una vez detectada, a través de la atención médica adecuada, la rehabilitación física y emocional, y la prevención de recurrencias.

Esta fase incluye tanto la atención médica especializada como el acompañamiento psicosocial del paciente. Su objetivo es, tanto como sea posible, recuperar el estado de salud, evitar discapacidades

permanentes y mejorar la calidad de vida de las mujeres afectadas. Además, conlleva el fortalecimiento de los servicios de salud para ofrecer un abordaje integral que incluya seguimiento, apoyo psicológico, rehabilitación y cuidados paliativos si fueran necesarios [56]. Una atención apropiada en esta etapa requiere asegurar el acceso oportuno a terapias como la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia, dependiendo del estadio clínico del cáncer. Asimismo, un enfoque integral requiere la inclusión de cuidados paliativos y un sistema de monitoreo y evaluación que asegure la efectividad de las intervenciones [133]. Sin embargo, la continuidad del tratamiento puede verse comprometida por factores geográficos, sociales o económicos, lo que hace fundamental proporcionar apoyo logístico y financiero a las pacientes, especialmente durante terapias prolongadas como la radioterapia [134].

5.2.3. Tecnologías para la detección del VPH y el tamizaje del CCU

El progreso en las tecnologías de detección ha transformado significativamente las estrategias de prevención secundaria del CCU. En este contexto, los biomarcadores proteicos, que son moléculas detectables en sangre, tejidos u otros fluidos corporales que indican un proceso biológico normal o patológico han adquirido un papel central, permitiendo identificar con mayor precisión qué mujeres presentan mayor riesgo de desarrollar lesiones premalignas, mediante marcadores como p16INK4a, Ki-67 y la metilación de genes relacionados con la oncogénesis por VPH [135, 136].

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos que permite detectar secuencias específicas del ADN viral mediante ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión catalizados por la enzima Taq polimerasa [137]. Como se ilustra en la Figura 5.7, este proceso genera millones de copias a partir de cantidades mínimas de material genético mediante cepillado cervical, lo que la hace especialmente útil en etapas iniciales de la infección [138, 139]. Si bien su sensibilidad y especificidad son elevadas, su implementación en programas de tamizaje masivo se ve limitada por la necesidad de equipos especializados y personal capacitado [140].

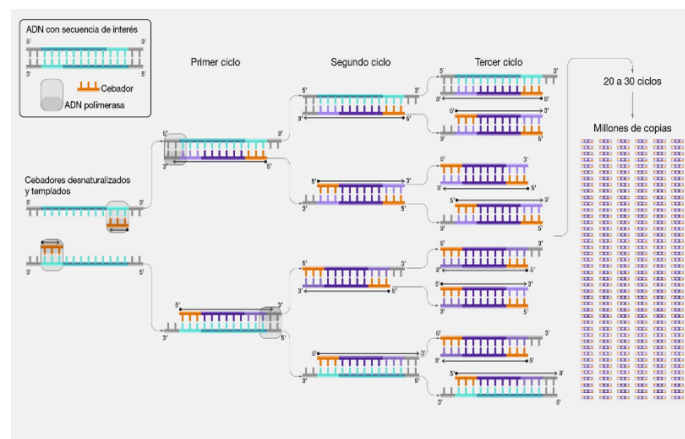


Figura 5.7: Representación esquemática de los ciclos de amplificación de la PCR. (Fuente: [42]).

Las pruebas *Cervista*TM HPV HR y *Cervista*TM HPV 16/18 emplean la tecnología Invader[®], aprobada por la FDA en 2009, que detecta ADN viral mediante reacciones isotérmicas sin necesidad de PCR [141]. Como se muestra en la Figura 5.8, el proceso genera una señal fluorescente a través de sondas FRET tras el reconocimiento del ADN diana por la enzima Cleavase [43]. La prueba HR detecta cualitativamente 14 genotipos de alto riesgo, mientras que la prueba 16/18 identifica específicamente los tipos más oncogénicos; ambas incluyen un control interno que garantiza la integridad de la muestra y presentan menor reactividad cruzada que otros métodos como HC2 [142, 143, 144].

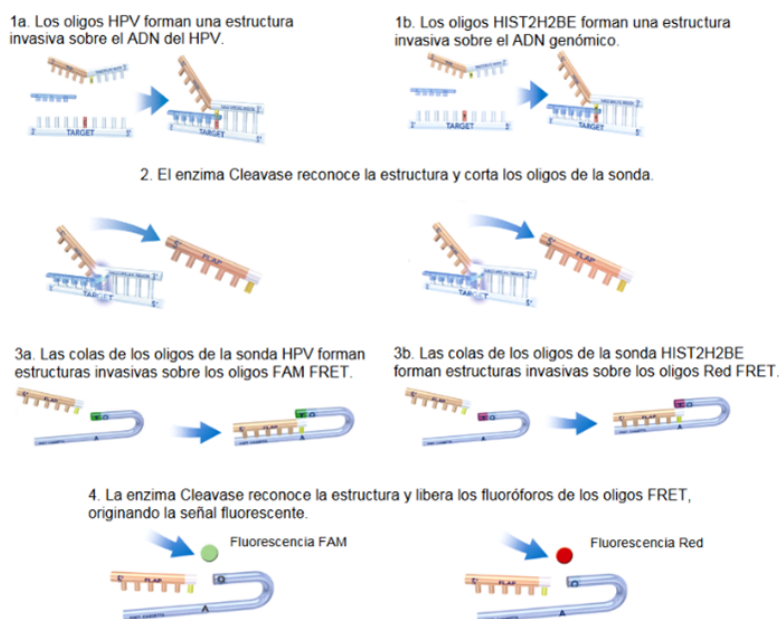


Figura 5.8: Representación gráfica de la química Invader utilizada en Cervista HPV HR. (Fuente: [43])

El método Captura Híbrida 2 (HC2), desarrollado por QIAGEN, detecta el ADN de 13 tipos de VPH de alto riesgo mediante hibridación ADN-ARN y quimioluminiscencia, sin requerir amplificación por PCR [145]. Aunque posee alta sensibilidad clínica, presenta como limitación principal la reactividad cruzada derivada del carácter generalista de sus sondas, lo que puede producir falsos positivos en mujeres sin lesiones precancerosas [146, 147].

La prueba APTIMA detecta el ARNm de las oncoproteínas E6 y E7 en 14 genotipos de VPH de alto riesgo, lo que permite identificar infecciones activas con mayor probabilidad de progresión [148]. A diferencia de las pruebas de ADN, esta estrategia refleja directamente la actividad oncogénica viral, dado que los niveles de ARNm E6/E7 aumentan progresivamente con la severidad de la lesión cervical [149]. En estudios comparativos, APTIMA ha demostrado una especificidad superior a HC2 con sensibilidad equivalente, lo que reduce los falsos positivos y la convierte en una herramienta valiosa tanto para el tamizaje primario como para el triage de resultados citológicos anormales [150].

La citología cervical o prueba de Papanicolaou consiste en la recolección de células del cuello uterino mediante cepillo o espátula para su evaluación microscópica en búsqueda de cambios morfológicos displásicos o malignos [151]. El procedimiento se ilustra en la Figura 5.9. Su precisión depende de la calidad de la muestra y la experiencia del personal, y su frecuencia varía según la edad y el historial clínico: cada tres años en mujeres de 21 a 29 años, y cada tres a cinco años, combinada o no con prueba de VPH, en mujeres de 30 a 65 años [152, 153].

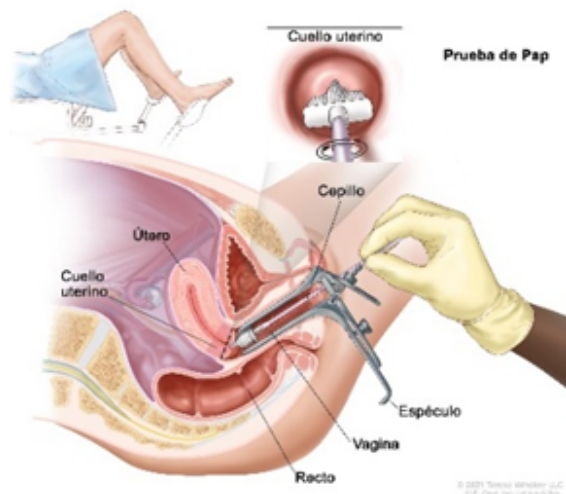


Figura 5.9: Representación esquemática del procedimiento de toma de muestras para una citología cervicouterina (Fuente: [44])

Las técnicas de inspección visual representan una estrategia accesible y de bajo costo para entornos con recursos limitados. La inspección visual con ácido acético (IVAA) consiste en aplicar una solución de ácido acético al 3–5 % sobre el cuello uterino; las lesiones de alto grado se evidencian por la aparición de zonas acetoblancas en la región de transformación [154]. De manera complementaria, la prueba con yodo Lugol permite identificar zonas anormales por su incapacidad de retener el colorante, permaneciendo amarillas frente al tono marrón del epitelio sano [155]. La colposcopia en video integra ambos agentes con magnificación óptica y registro de imágenes para guiar la toma de biopsias dirigidas en áreas sospechosas [156].

5.2.4. Biosensores para la detección en salud

Los avances recientes en biotecnología han permitido el desarrollo de bionanosensores, dispositivos analíticos diseñados para detectar de forma rápida, específica y sensible diversos biomarcadores, incluidos los asociados al VPH. Estos sensores combinan un componente biológico de identificación (tales como anticuerpos, ácidos nucleicos, enzimas o tejidos celulares) con un transductor físico o fisicoquímico, que convierte el suceso biológico (como la unión antígeno-anticuerpo) en una señal medible y comprensible, usualmente en tiempo real [157]. Un biosensor se compone de cinco ele-

mentos fundamentales: el analito, que representa la sustancia objetivo a identificar; el bioreceptor, que identifica específicamente ese analito; el transductor, que transforma esta interacción en una señal eléctrica, óptica, electroquímica o piezoeléctrica [158]. Adicionalmente, consta de un sistema electrónico, que procesa dicha señal; y el visualizador de lectura, que presenta el resultado final [159]. Estos elementos trabajan de manera integrada para ofrecer una medición precisa del evento biológico, convirtiendo estímulos moleculares en datos cuantificables como voltaje, corriente, intensidad de señal, masa, entre otros, como se observa en la Figura 5.10.

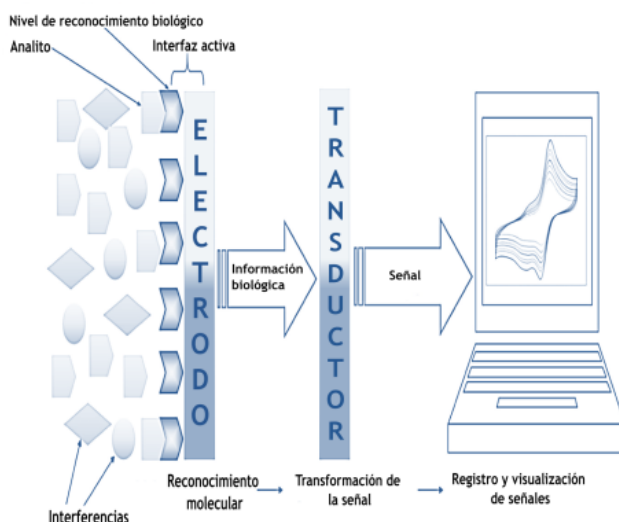


Figura 5.10: Mecanismo principal de un biosensor (Fuente [45])

Según el método de transducción, los biosensores pueden categorizarse en ópticos, térmicos, electroquímicos y de masa, siendo los electroquímicos y ópticos los más habituales en usos biomédicos [157]. La versatilidad de estos dispositivos permite su aplicación no solo en el ámbito clínico, sino también en la industria alimentaria, el monitoreo ambiental y la biotecnología industrial.

Una de las mayores ventajas de los biosensores es su potencial para descentralizar el diagnóstico. En contraste con las pruebas convencionales que demandan el transporte de la muestra a un laboratorio especializado y tiempos de espera prolongados, los biosensores permiten el diagnóstico en el punto de atención (POC, por sus siglas en inglés) [160]. Esta capacidad de detección rápida y portátil ha facilitado el monitoreo de enfermedades infecciosas y ha mejorado el acceso al diagnóstico en zonas rurales o con recursos limitados, reduciendo la necesidad de visitas hospitalarias frecuentes y disminuyendo los costos del sistema de salud [45].

5.2.5. Clasificación de biosensores

Los biosensores pueden clasificarse desde diversas perspectivas, pero la clasificación más común y útil en el ámbito biomédico se basa en dos criterios fundamentales: primero, el elemento de bioreconocimiento, que hace referencia al tipo de molécula biológica utilizada para reconocer el

analito objetivo (como anticuerpos, enzimas, ácidos nucleicos, entre otros); y segundo, el mecanismo de transducción de señal, es decir, la forma en que esa interacción biológica se convierte en una señal medible y cuantificable, ya sea eléctrica, óptica, térmica o mecánica. Entre los elementos de bioreconocimiento más empleados destacan las enzimas y los anticuerpos, por su alta especificidad y afinidad frente a diversos analitos, incluidos patógenos, proteínas y metabolitos clínicos relevantes. Esta clasificación se resume en la Tabla 5.3, que presenta ejemplos representativos para cada tipo de biomolécula y método de transducción.

Tabla 5.3: Clasificación de Biosensores. (Fuente: Adaptado de [57])

Biomolécula de reconocimiento	Tipo de biosensor	Ejemplos	Modo de transducción	Ejemplos
Proteínas: Anticuerpos y Receptores	Inmunosensor.	Anticuerpos monoclonales y policlonales; receptores metabotrópicos e ionotrópicos.	Electroquímico, óptico.	Amperométrico, conductimétrico, impedimétrico, potenciométrico, absorbancia, fluorescencia, bio-/quimioluminiscencia, Raman.
Enzimas	Biosensor enzimático.	β -glucuronidasa (gen <i>gusA</i>), β -galactosidasa (gen <i>lacZ</i>).	Sensores de masa.	Biosensores acústicos de superficie, biosensores de microbalanza (cantilever).
Células completas	Biosensor celular.	Células microbianas, células de mamífero.	Óptico.	<i>E. coli</i> K12C600, HB101, DPD1718.
Ácidos nucleicos	Genosensor / Aptasensor.	Biosensores basados en hibridación de ADN o aptámeros.	Óptico (fluorescencia).	Aptasensores con base fluorescente.

Inmunosensores

Los inmunosensores son biosensores que permiten la detección específica de sustancias biológicas mediante la interacción entre un antígeno (Ant) y un anticuerpo (Ab) inmovilizados sobre una superficie sólida, para esto integran los principios de un inmunoensayo en una plataforma sensora, combinando un sistema de reconocimiento altamente específico con un transductor físico-químico [161]. Esta unión genera una señal bioquímica que un transductor convierte en una señal medible, facilitando así la identificación de analitos con gran especificidad y sensibilidad [57]. La estructura fundamental de un inmunosensor se basa en los fundamentos de las pruebas inmunológicas en fase sólida, en las que los bioreceptores (anticuerpos o antígenos) se inmovilizan en un soporte físico y la reacción de reconocimiento ocurre en la interfaz sólido-líquido. Este diseño favorece una alta reproducibilidad, así como la miniaturización de los dispositivos para aplicaciones portátiles o de punto de atención. Entre los inmunoensayos existentes, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es el más utilizado [162]. La detección del complejo antígeno-anticuerpo se da mediante el uso de moléculas de señalización que se unen al Ant o al Ab, dependiendo del formato específico del ensayo inmunológico, algunos tipos son: Sandwich, que requiere que el analito tenga múltiples sitios de unión para interactuar con dos anticuerpos distintos y competitivos o de captura, que es más adecuado para moléculas pequeñas o con un solo epítipo [162, 163, 164, 165].

Desde un punto de vista funcional, un inmunosensor consta de tres elementos fundamentales:

el biomarcador, que generalmente es un antígeno; el bioreceptor, que puede ser un anticuerpo o un antígeno complementario; y un transductor, responsable de transformar la interacción biológica en una señal cuantificable, ya sea eléctrica, óptica o mecánica [166].

Estos principios también son aplicables a los inmunosensores amperométricos, que pueden ser configurados de diversas formas, tal como se evidencia en la Figura 5.11, que muestra varias estrategias de detección fundamentadas en la estructura del inmunoensayo y el tipo de marcador utilizado (enzimático o no enzimático).

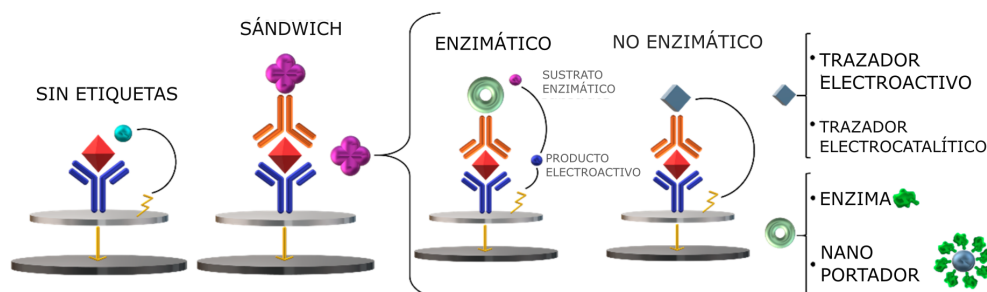


Figura 5.11: Configuraciones de inmunosensores amperométricos. Se representan varios métodos de detección: sin etiquetas, tipo sándwich con etiquetas enzimáticas y no enzimáticas. El antígeno (Ant) se muestra en color rojo, el anticuerpo primario (Ab) de color azul y el anticuerpo secundario (Ab2) de color naranja. Los indicadores del Ab2 se ilustran en tonos violeta, verde o gris, según el tipo de trazador (enzimático, electroactivo o catalítico) (Adaptado de: [46]).

Un ejemplo destacado es el inmunosensor electroquímico, que actúa como un “condensador bioquímico”, compuesto por dos placas conductoras separadas por una capa dieléctrica [167]. En este tipo de sistema, la creación del complejo ant-ab obstaculiza la transferencia electrónica, provocando alteraciones en las propiedades electroquímicas del medio.

Según el tipo de transducción, los inmunosensores se categorizan en electroquímicos, que identifican cambios en la corriente, voltaje o impedancia; ópticos, que reaccionan ante fenómenos como la absorción, fluorescencia o reflexión de la luz; y piezoeléctricos, que convierten las variaciones de masa en cambios de frecuencia o fase en la superficie del sensor; y piezoeléctricos, que convierten las variaciones de masa en cambios de frecuencia o fase en la superficie del sensor [166]. Uno de los beneficios más destacados de estos dispositivos es su potencial de mejora mediante la ingeniería de anticuerpos recombinantes, lo que permite optimizar su afinidad y especificidad frente a analitos concretos [57].

En este contexto, los anticuerpos (Ab) son proteínas de la familia de las inmunoglobulinas, generadas por los linfocitos B de animales vertebrados como parte de la respuesta inmune frente a organismos extraños o sustancias tóxicas. Se calcula que en los seres humanos existen cerca de un billón de células B, que al identificar un antígeno foráneo inician la generación de anticuerpos en forma de Y, conocidos como inmunoglobulinas [168]. Estos anticuerpos se acoplan específicamente a los ant formando un complejo inmunológico (Ant-Ab), fenómeno que representa el fundamento fun-

cional de los inmunoensayos y de los inmunosensores [47]. En términos estructurales, un anticuerpo consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (H) y dos ligeras (L), que se vinculan a través de enlaces de disulfuro. Estas cadenas cuentan con regiones constantes (C) y regiones variables (V), siendo estas últimas las encargadas de la identificación específica del antígeno, como se aprecia en la Figura 5.12.

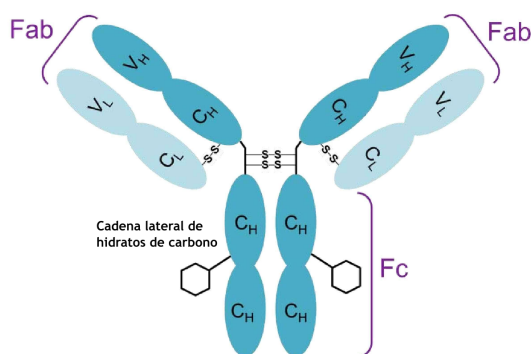


Figura 5.12: Estructura de un anticuerpo en forma de Y. Las regiones **Fab** (fragmento de unión al antígeno) están conformadas por los dominios variables **V_H** (región variable de la cadena pesada) y **V_L** (región variable de la cadena ligera), responsables del reconocimiento específico del antígeno. Las regiones constantes **C_H** (cadena pesada) y **C_L** (cadena ligera) estabilizan la estructura. La región **Fc** (fragmento cristalizante), formada por los dominios constantes de las cadenas pesadas, media las funciones efectoras del sistema inmunológico. Las cadenas se unen entre sí mediante enlaces disulfuro (**S-S**). (Fuente: [47]).

La unión ant-ab ocurre a través del paratopo, localizado en la región Fab, y se fundamenta en fuerzas no covalentes como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals, lo que confiere al complejo su especificidad y afinidad características [132, 138]. Dentro de los distintos tipos de anticuerpos, los IgG se encuentran entre los más empleados en inmunosensores por su elevada especificidad. No obstante, la región Fc puede unirse de manera inespecífica a elementos biológicos, lo que ha impulsado el desarrollo de variantes como fragmentos recombinantes (Fabs, scFvs, nanocuerpos) mediante ingeniería genética, que reducen costos, mejoran la especificidad y optimizan la funcionalidad del biosensor [168].

Biosensores enzimáticos

Las enzimas funcionan como biocatalizadores, promoviendo múltiples reacciones en los sistemas biológicos y cumpliendo una función crucial para la vida en muchos seres vivos [169]. Están compuestas por cadenas de aminoácidos que se adhieren en estructuras terciarias complejas, con núcleos hidrofóbicos envueltos por capas hidrofílicas. Esta complejidad estructural tridimensional genera un ambiente químico adecuado para catalizar procesos de reacción específicos, y en su estructura presentan una zona específica, denominada sitio activo, donde se produce la catálisis [170].

Los biosensores enzimáticos utilizan una enzima inmovilizada como elemento de bioreconocimiento, con la capacidad de catalizar una reacción particular con el analito metabólico. Esta interacción produce un resultado o una alteración físico-química que es identificada por un transductor, que transforma la señal biológica en una señal medible, como la corriente eléctrica, el cambio de pH o la emisión óptica [171]. Las enzimas libres presentan limitaciones en estabilidad, eficiencia y reutilización debido a su solubilidad en agua, lo que dificulta su uso. Ante esto, las técnicas de inmovilización surgen como una solución eficaz, al mejorar su estabilidad, actividad, selectividad y permitir su reutilización [158].

Un biosensor proteico fusiona un dominio de reconocimiento, usualmente una proteína que modifica su conformación al acoplarse a un ligando específico, y un dominio reportero que transforma esa modificación estructural en una señal medible, como la fluorescencia o la emisión de luz. Estas estructuras pueden fusionarse en una única cadena polipeptídica o actuar como un sistema de múltiples compartimentos [172]. Específicamente, los sensores de transferencia de energía mediante resonancia de Förster (FRET) o bioluminiscente (BRET) resultan sumamente eficaces para identificar modificaciones conformacionales en tiempo real, como se observa en la Figura 5.13 [48].

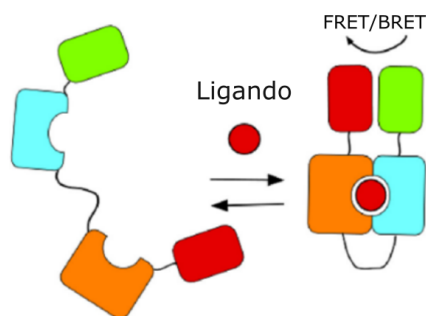


Figura 5.13: Biosensores conformacionales que utilizan FRET o BRET identifican la conexión del ligando a través de modificaciones en la distancia o dirección entre los donantes y los receptores de energía luminosa (Fuente: [48])

A diferencia de los biosensores basados en anticuerpos, que no generan señales redox y deben depender de mediciones de impedancia (lo cual puede reducir la sensibilidad y complicar el análisis), los biosensores enzimáticos permiten una detección directa mediante reacciones catalíticas redox. Estas reacciones, facilitadas por enzimas y sus cofactores (como iones metálicos o coenzimas), ofrecen mayor sensibilidad y simplicidad operativa [173]. En situaciones naturales, las proteínas sensoriales controlan funciones vitales de las células al identificar y reaccionar ante modificaciones químicas o físicas del ambiente. Esta misma habilidad se ha convertido en sistemas artificiales creados para medir moléculas clínicas importantes, como la glucosa en la sangre, que ha representado el modelo tradicional para el avance de biosensores en el campo médico [172].

Biosensores celulares

Los biosensores celulares (CBBs, por sus siglas en inglés) utilizan células vivas en su totalidad, ya sean microbianas, vegetales o animales (incluyendo las líneas celulares humanas), como componentes de bioreconocimiento. Estas células reaccionan específicamente ante estímulos o analitos químicos y biológicos (tales como toxinas, contaminantes o medicamentos), produciendo una señal que un transductor convierte en una salida cuantificable (óptica, eléctrica, electroquímica, etc.) [174].

En general, los CBBs basados en células completas están formados por dos componentes clave: un elemento sensor, representado por las propias células, y uno o varios elementos de señalización o reporte, que pueden tener asociaciones con procesos metabólicos, expresión de genes reporteros, emisión de fluorescencia, o modificaciones en propiedades como la adhesión o la motilidad celular [175]. Uno de los mecanismos más utilizados implica el uso de genes reporteros regulados por promotores sensibles al analito. En este tipo de biosensor, el analito activa una proteína reguladora intracelular, que a su vez induce la transcripción del gen reportero bajo control de un promotor específico. Este proceso produce ARNm, que es traducido en una proteína reportera (como GFP o luciferasa), cuya expresión sirve como señal de lectura del sistema. Este proceso se ilustra en la Figura 5.14,

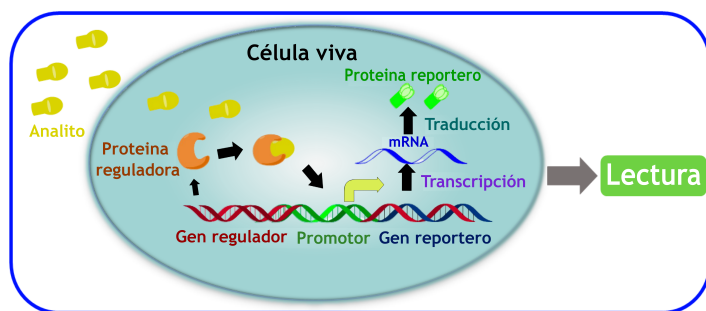


Figura 5.14: Principio de funcionamiento de un biosensor celular. El analito externo se une a una proteína reguladora intracelular, modificando su conformación y activando un promotor asociado al gen regulador. Esta activación desencadena la transcripción del gen reportero en ARNm y su posterior traducción en una proteína reportera, cuya expresión genera una señal cuantificable (lectura), proporcional a la concentración del analito detectado. (Adaptado de: [49])

Biosensores de ADN

Los biosensores de ADN, que utilizan ácidos nucleicos como componentes de reconocimiento, exhiben una exactitud significativa en la detección de secuencias concretas de ADN o ARN. Su mecanismo de operación se fundamenta en el emparejamiento del ADN objetivo con una sonda complementaria, lo que provoca modificaciones en características eléctricas u ópticas que el transductor transforma en señales perceptibles [176]. En el campo del diagnóstico genético, estos biosensores juegan un rol crucial en la identificación de mutaciones genéticas vinculadas a enfermedades, siendo los sucesos de hibridación indicadores extremadamente precisos para la detección temprana [177].

Dentro de esta categoría se destacan dos tipos principales: los aptámeros de ADN y las ADN-zimas.

Los aptámeros son cadenas de ADN diseñadas para unirse específicamente a un analito determinado, y suelen generar señales detectables mediante cambios conformacionales tras la unión. Por su parte, las ADN-zimas son secuencias de ADN con capacidad catalítica, pueden inducir reacciones químicas como la escisión de ácidos nucleicos o la oxidación de sustratos, lo que permite una detección sensible de pequeñas moléculas, incluidos iones metálicos y compuestos orgánicos [178]. Como se observa en las Figuras (5.15A) y (5.15B), tanto las ADN-zimas como los aptámeros pueden emplearse en sensores fluorescentes, donde la separación entre fluoróforo y supresor (quencher), ya sea por catálisis o cambio estructural, activa la señal lumínica en presencia del analito. En el caso de la ADN-zima (5.15A), se utilizan dos cadenas de ADN: una cadena sustrato marcada con un fluoróforo y una cadena enzimática (la ADN-zima) marcada con un supresor de fluorescencia. La escisión de la hebra sustrato libera el fluoróforo, activando la emisión de luz. En el caso del aptámero (5.15B), la unión al analito induce un cambio estructural que aleja el supresor del fluoróforo, incrementando la fluorescencia detectada.

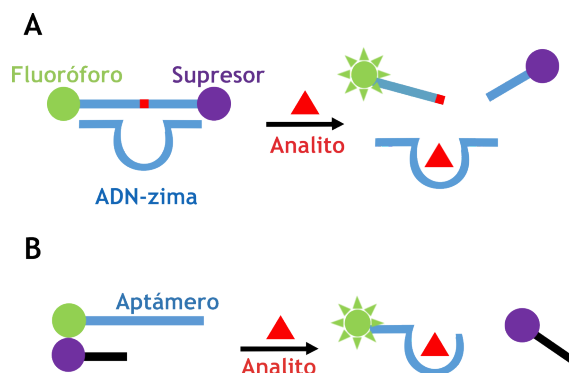


Figura 5.15: Ilustración esquemática de diseños de sensores fluorescentes basados en (A) DNAsimas y (B) aptámeros con fluoróforos y supresores marcados covalentemente. (A) En ausencia del analito, el fluoróforo y el supresor permanecen próximos en la cadena sustrato, inhibiendo la señal; al unirse el analito como cofactor, la DNAsima escinde la cadena sustrato en el sitio de corte, separando el fluoróforo del supresor y activando la emisión fluorescente. (B) De manera análoga, la unión del analito al aptámero induce un cambio conformacional que aleja el supresor del fluoróforo, incrementando la señal fluorescente detectada. Adaptado de [50].

Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos han cobrado importancia en el diagnóstico biomédico y en múltiples aplicaciones analíticas gracias a su capacidad para convertir directamente un suceso biológico en una señal electrónica, lo que facilita la aplicación de análisis rápidos y precisos de una muestra biológica [179]. Su adopción en aumento se atribuye a múltiples beneficios prácticos, incluyendo tiempos de detección cortos, simplicidad instrumental, bajo costo y portabilidad. Estos elementos los sitúan como la elección ideal para el desarrollo de dispositivos de diagnóstico en el punto de atención

(POC) por sus siglas en inglés [180]. Este tipo de sensores se pueden categorizar dependiendo del tipo de señal que producen como potenciométricos, amperométricos, voltamétricos, impedimétricos y conductimétricos. Todos ellos con principios electroquímicos específicos que facilitan la detección de distintos tipos de analitos [181].

El método de identificación se fundamenta en la transferencia de electrones, generados o consumidos durante la detección de la molécula objetivo o analito, hacia o desde el electrodo de trabajo, generando así una señal eléctrica que se corresponde con la concentración del analito [182]. En una configuración convencional, el electrodo de referencia (RE), comúnmente de Ag/AgCl, proporciona un potencial estable, mientras que el electrodo auxiliar o contraelectrodo (CE) cierra el circuito eléctrico. Por otro lado, el electrodo de trabajo (WE) es el sitio donde se realiza la detección que permite identificar y transducir el fenómeno [51], la distribución de los electrodos es como se observa en la Figura 5.16.

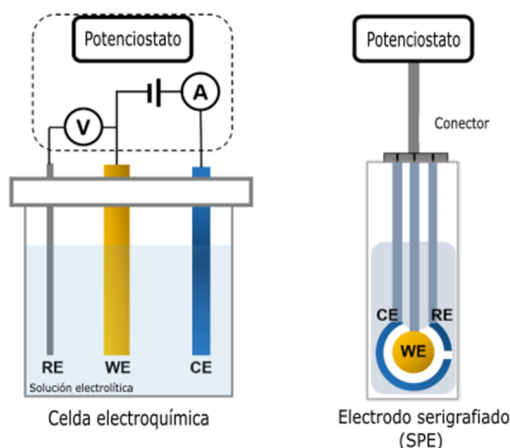


Figura 5.16: Esquema comparativo entre una celda electroquímica convencional y un electrodo serigrafiado (SPE). Los dos sistemas poseen tres electrodos: el electrodo de trabajo (WE), el electrodo de referencia (RE) y el electrodo auxiliar o contraelectrodo (CE), que están conectados a un potenciostato para cuantificar la señal electroquímica producida durante la identificación del analito. Los electrodos serigrafiados (SPE) combinan tres electrodos en un único sustrato, lo que permite su miniaturización y portabilidad. (Fuente: [51]).

Para aplicaciones de alto rendimiento, es posible diseñar sistemas multiplexados. Estos integran un arreglo de múltiples electrodos de trabajo sobre un mismo sustrato, lo que permite la detección simultánea y selectiva de distintos analitos, como diferentes genotipos virales, en una sola muestra [183]. Esta configuración reduce el volumen de muestra y el tiempo de respuesta. Asimismo, la capacidad de funcionalizar cada WE con bioreceptores específicos permite que el sistema transduzca eventos moleculares independientes de manera paralela, transformando un único dispositivo en una plataforma de diagnóstico multianalito compacta.

Biosensores basados en LIG

El grafeno es un nanomaterial bidimensional compuesto por una sola capa de átomos de carbono dispuestos en una red hexagonal, donde cada átomo presenta hibridación sp^2 y se une a tres vecinos en un mismo plano, generando una estructura estable y de alta conductividad con propiedades singulares [184]. Debido a sus extraordinarias características electrónicas, térmicas y mecánicas, que incluyen una movilidad electrónica de hasta $200,000 \text{ cm}^2/\text{Vs}$, una conductividad térmica superior a $4,800 \text{ W/mK}$ y una transparencia óptica del 97.4 %, resulta útil en dispositivos ópticos y facilita la mejora de la sensibilidad y la rapidez de detección en plataformas de diagnóstico [185].

El LIG es un material poroso y tridimensional que se obtiene al irradiar un haz láser sobre materiales con alto contenido de carbono, como las poliimidas. Este método convierte la superficie en una estructura de grafeno sin la necesidad de reactivos químicos, máscaras fotolitográficas o procesos de varios pasos, disminuyendo así el impacto en el medio ambiente, el costo y el uso de recursos [185]. En la Figura 5.17 se ilustra el proceso de fabricación del LIG, junto con los defectos estructurales característicos de este material, que se expresan como anillos de cinco, seis y siete átomos. A diferencia del grafeno ideal, que forma una red hexagonal perfecta, estos defectos, especialmente los pares de anillos de cinco y siete átomos, son intrínsecos al procedimiento de síntesis por láser [52].

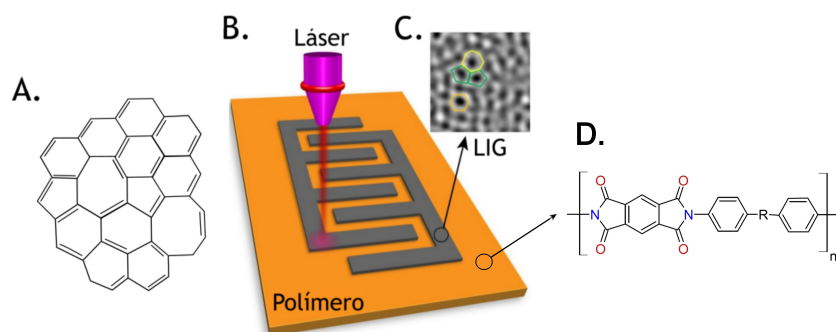


Figura 5.17: Esquema del proceso de fabricación del LIG a partir de poliimida (PI) (A) Representación esquemática de la estructura del LIG. (B) Proceso de escritura por láser sobre un sustrato de polímero, donde el láser convierte selectivamente el polímero en grafeno inducido por láser (LIG). (C) Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) donde se observan los defectos comunes en la estructura LIG en forma de anillos pentagonales y heptagonales. (D) Estructura química de la unidad repetitiva de la poliimida (PI), material precursor del LIG, conformada por grupos imida cíclicos unidos a anillos aromáticos a través de un puente éter. (Fuente: [52])

En el proceso de irradiación, el láser causa la ruptura de enlaces $\text{N}=\text{O}$, $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}=\text{O}$ del precursor polimérico, liberando gases como CO , CO_2 y H_2O . Mientras tanto, los átomos de carbono restantes se reorganizan estructuralmente, convirtiendo enlaces de tipo sp^3 en sp^2 [186]. El LIG exhibe una estructura similar a una “espuma”, que se distingue por su gran superficie específica,

conductividad eléctrica y flexibilidad, características que lo hacen perfecto para su uso en biosensores. Además, posee una alta porosidad, excelente conductividad eléctrica y una superficie flexible, lo que lo convierte en un material ideal para aplicaciones en biosensores [187]. Adicionalmente, facilita la elaboración de patrones prediseñados directamente en el sustrato, lo que resulta esencial para la creación de sensores personalizados de alta precisión.

En este contexto, los sensores LIG se han utilizado en varias modalidades electroquímicas, tales como la identificación amperométrica, potenciométrica, impedimétrica, voltamétrica y conductimétrica, cada una con propiedades técnicas particulares. La Tabla 5.4 presenta una comparación general entre los distintos mecanismos de transducción empleados en biosensores, marco dentro del cual se inscribe el LIG como plataforma electroquímica versátil.

Tabla 5.4: Comparativo de tipos de biosensores según mecanismo de transducción: ventajas y desventajas. (Fuente: [58])

Biosensor	Tipos	Ventajas	Desventajas
Electroquímico	Amperométrico, potenciométrico, conductimétrico, impedimétrico y voltamétrico.	Excelentes límites de detección, detección rápida, facilidad de fabricación, buena resolución, salida lineal.	Corrientes y voltajes inestables, rango limitado o estrecho, vida útil corta/limitada.
Óptico	SPR, fluorescencia, bio/quimioluminiscencia, índice de refracción, Raman, absorbancia.	Alta sensibilidad, selectividad, rentabilidad, tamaño pequeño.	Susceptible a cambios físicos y a la interferencia de efectos ambientales.
Térmico / Calorimétrico	Termistores o termopares.	Escalabilidad, facilidad de uso y de fabricación.	Falta de especificidad en mediciones de temperatura, procedimientos experimentales largos.
Sensibles a masa / gravimétricos.	Biosensores de onda, acústicos, tipo cantiléver.	Bajo costo y simplicidad.	Baja sensibilidad.
Piezoeléctrico	Dispositivos acústicos de superficie, cristal piezoeléctrico.	Detección rápida, buena respuesta en frecuencia, tamaño pequeño y alta sensibilidad.	Alta sensibilidad a la temperatura, no adecuado para condiciones estáticas, algunos cristales se disuelven en ambientes húmedos.

Por otro lado, los métodos tradicionales para la detección del VPH como las pruebas citológicas, colposcopia y observaciones morfológicas del cuello uterino han sido ampliamente utilizados, pero presentan limitaciones en sensibilidad y especificidad, especialmente en etapas tempranas de infección [75]. Frente a estos desafíos, la incorporación de materiales avanzados como el grafeno y sus derivados (incluido el LIG) en el diseño de biosensores se ha posicionado como una estrategia prometedora. El avance en biosensores basados en LIG y grafeno ofrece nuevas oportunidades para

la identificación rápida, precisa y asequible del VPH, lo que supone un progreso significativo en comparación con los métodos convencionales de tamizaje, particularmente en situaciones de difícil acceso.

5.2.6. Métodos de funcionalización

Funcionalización no covalente

La funcionalización no covalente del LIG es una estrategia ampliamente empleada para modificar su superficie sin alterar su estructura cristalina ni su red de electrones π . A diferencia de las técnicas covalentes, este enfoque se fundamenta en interacciones físicas débiles como las fuerzas de van der Waals, interacciones π - π , adsorción electrostática o hidrofóbica, facilitando de esta manera el acoplamiento de biomoléculas, como proteínas o anticuerpos, de manera reversible y eficaz [188]. Un objetivo primordial es mantener las características eléctricas y mecánicas del LIG, esenciales en usos electroquímicos, sensores biomédicos y dispositivos portátiles para diagnóstico [189]. Como se puede apreciar en la Figura 5.18, las moléculas poliméricas y adsorbato de bajo peso molecular se depositan en la superficie del grafeno mediante interacciones no covalentes, preservando así su integridad estructural. El diagrama muestra cómo los polímeros (color morado) y las moléculas pequeñas (color verde) se adsorben en una capa de grafeno a través de interacciones de van der Waals, ejemplificando uno de los mecanismos más comunes de funcionalización física del material.

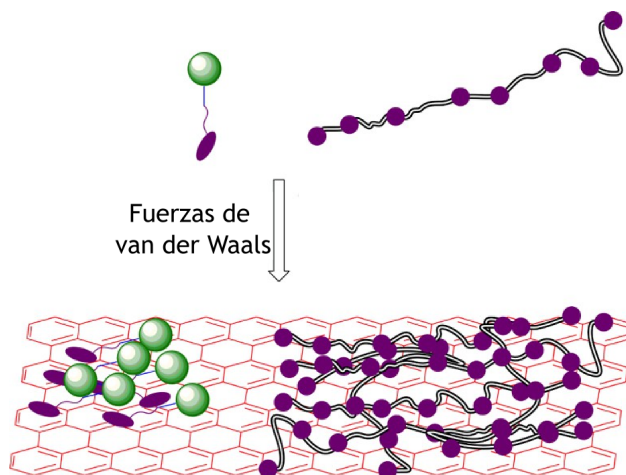


Figura 5.18: Representación esquemática de la modificación superficial del grafeno mediante interacciones físicas con polímeros y moléculas pequeñas (Adaptado de: [53]).

Funcionalización covalente

La funcionalización covalente del grafeno posibilita la formación de una unión química estable de biomoléculas en su superficie, usualmente a través de la incorporación de grupos funcionales

reactivos como carboxilos o aminas [190]. Además, este tipo de modificación mejora significativamente propiedades fundamentales del grafeno, como solubilidad. En particular, la incorporación de grupos polares mediante funcionalización covalente es clave para aumentar su solubilidad en medios acuosos, una característica esencial para su aplicación en contextos biomédicos [191]. Una técnica comúnmente utilizada en medios acuosos involucra el uso del agente de acoplamiento 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), ya sea en su forma libre o como clorhidrato ($\text{EDC} \cdot \text{HCl}$), en combinación con N-hidroxisuccinimida (NHS), para activar grupos carboxilo presentes en la superficie del grafeno o de otros compuestos acoplados a este como el ácido paraaminobenzoico (PABA, por sus siglas en inglés). Este proceso genera un intermedio reactivo (éster de NHS), el cual puede reaccionar posteriormente con grupos amina para formar enlaces amida estables, generando una unión covalente eficiente entre biomoléculas y la superficie del LIG previamente modificada [188]. En particular, el PABA ha sido utilizado como intermediario para anclar biomoléculas sobre grafeno, gracias a su grupo amino libre, lo que facilita la orientación adecuada de las proteínas o anticuerpos [192]. Esta metodología ha sido evaluada en varias versiones de sensores electroquímicos e inmunosensores, en los que la inmovilización eficaz de biomoléculas es esencial para la sensibilidad del dispositivo. La Figura 5.19 ilustra esquemáticamente este mecanismo de funcionalización covalente, mostrando cómo los grupos carboxilo presentes en la superficie del grafeno reaccionan inicialmente con EDC para formar un éster O-acil-isourea inestable. En presencia de NHS, se convierte en un éster NHS más estable y reactivo hacia grupos amino, como los del quitosano. Finalmente, la reacción entre el éster NHS y el grupo amino genera un enlace covalente tipo amida, formando un compuesto grafeno–quitosano con gran estabilidad química.

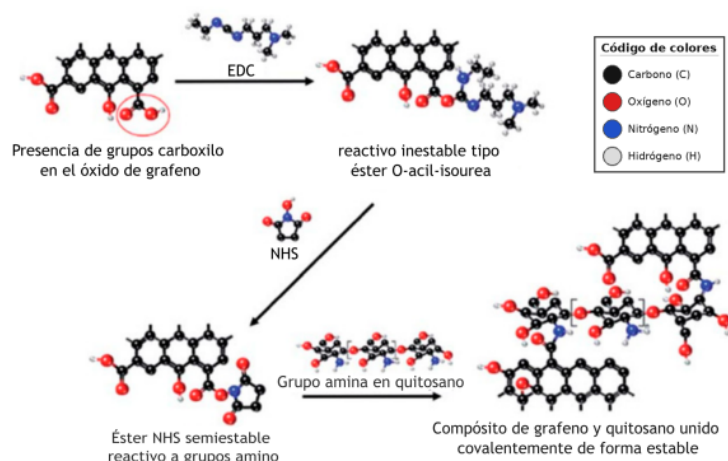


Figura 5.19: Mecanismo de funcionalización covalente del grafeno con quitosano mediado por EDC y NHS. (Adaptado de: [54, 52]).

La Tabla 5.5 presenta una comparación entre la funcionalización covalente y no covalente del grafeno inducido por láser (LIG), destacando sus mecanismos, ventajas, desventajas y aplicaciones

más comunes.

Tabla 5.5: Comparación entre la funcionalización covalente y no covalente del grafeno inducido por láser (LIG) (Fuente: [59, 60])

Característica	Funcionalización covalente	Funcionalización no covalente
Mecanismo	Formación de enlaces químicos (e.g., enlaces amida, ésteres)	Interacciones físicas débiles (π - π , van der Waals, electrostáticas)
Impacto en la estructura del grafeno	Interrumpe la red π , creando defectos tipo sp^3	Preserva la estructura y red π del grafeno
Estabilidad del enlace	Alta (enlaces covalentes estables y permanentes)	Baja a moderada (unión reversible y débil)
Control sobre propiedades electrónicas	Puede alterar la estructura electrónica del grafeno, abriendo una banda prohibida, causando que se comporte como un semiconductor	Mantiene las propiedades electrónicas originales del grafeno
Solubilidad en medios acuosos	Mejorada mediante grupos polares (e.g., $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$)	Limitada sin modificación adicional
Aplicaciones comunes	Dispositivos electrónicos, sensores electroquímicos funcionalizados	Biosensores reversibles, acoplamiento de biomoléculas sensibles
Ejemplo de reactivos	EDC/NHS, PABA, aminas, polímeros funcionales	Polímeros aromáticos, moléculas pequeñas, proteínas
Ventajas principales	Enlace fuerte y durable; permite una orientación más controlada de las biomoléculas	Preserva integridad estructural; facilita procesos reversibles y reutilización
Desventajas principales	Puede dañar la red de carbono, reduciendo conductividad y movilidad electrónica	Menor estabilidad del enlace; menos control sobre orientación molecular

5.3. Trabajos relacionados

A continuación, se muestran estudios vinculados con el problema propuesto:

- **Detección de AND-VPH en muestras de orina de mujeres: ¿Una alternativa eficaz y precisa de las muestras cervicales?** [193]

Este trabajo analiza el uso de la primera micción de orina (first-void urine) como método no invasivo para la detección del ADN del virus del papiloma humano (VPH) en mujeres, sugiriéndolo como una opción efectiva frente a las muestras cervicales convencionales. La recolección de la primera micción de orina facilita la captura de restos celulares y secreciones con ADN del VPH procedentes del sistema reproductivo, evitando la necesidad de pruebas invasivas. La normalización de los procedimientos de recolección, preservación y tratamiento ha permitido alcanzar una sensibilidad similar a la de las muestras clínicas recolectadas por profesionales. El artículo destaca que esta estrategia no solo mejora la aceptabilidad cultural y la participación en programas de tamizaje, sino que también posibilita la detección de biomarcadores adicionales, como la metilación de genes y anticuerpos inducidos por vacunación, que podrían ser beneficiosos en el monitoreo de mujeres con VPH de alto riesgo o vacunadas. A pesar de que todavía se necesitan más investigaciones para su confirmación clínica, el uso de la primera micción de orina se presenta como una herramienta clave en la detección precoz y monitorización del VPH, particularmente en entornos con barreras de acceso al sistema de salud.

- **Sensores electroquímicos de grafeno inducido por láser para aplicaciones en salud [194]**

La tesis doctoral de Tutku Beduk examina a fondo el avance de biosensores electroquímicos que emplean grafeno inducido por láser (LIG) como plataforma de detección para usos en el sector sanitario. La utilización de LIG se distingue por su procedimiento de producción sencillo y asequible, que posibilita la fabricación directa de electrodos sobre sustratos flexibles como la poliimida. La tesis presenta casos utilizados para la identificación de marcadores de cáncer (HER-2 y eIF3d), infarto agudo de miocardio (cTn-I) y COVID-19, incorporando la utilización de un potencióstato portátil (KAUSTat) que facilita el funcionamiento a distancia desde un dispositivo móvil. El uso de nanopartículas de oro o plata incrementa la precisión y la estabilidad del sensor. Adicionalmente, se detallan procedimientos de activación electroquímica de superficie con el objetivo de incrementar la densidad de imperfecciones en el grafeno, lo que mejora la actividad catalítica y la compatibilidad con bioreceptores. Este método sitúa al LIG como una plataforma sólida y adaptable para sensores en el punto de atención (PoC), con un enorme potencial para su uso en contextos clínicos y comunitarios de escasos recursos.

- **Biosensor enzimático basado en grafeno inducido por láser para la detección de glucosa [195]**

Este estudio desarrolló un biosensor electroquímico enzimático que emplea electrodos de grafeno inducido por láser (LIGE), producidos directamente sobre sustratos de poliimida a través de grabación láser UV. La superficie del electrodo fue modificada con una biocapa de quitosano y glucosa oxidasa (GOx), facilitando una detección amperométrica sensible y específica de glucosa, con un límite de detección de 0.431 mM y una sensibilidad de $43.15 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$. El biosensor evidenció un comportamiento lineal entre 0 y 8 mM, lo que incluye los niveles fisiológicos de glucosa en la sangre. Adicionalmente, demostró una elevada selectividad ante posibles interferentes como el ácido úrico, el ácido ascórbico y la urea. El proceso de fabricación fue rápido, económico y fácilmente escalable, lo que refuerza la capacidad de esta plataforma como instrumento portátil para el diagnóstico en el lugar de atención. La estabilidad durante 25 días y la excelente reproducibilidad entre lotes también corroboran su factibilidad para usos clínicos o personales.

- **Citobot: Desarrollo y validación clínica de un sistema portable para el tamizaje de cáncer de cuello uterino [196, 197]**

Este trabajo presenta el desarrollo de cuatro prototipos orientados a prevenir el cáncer de cuello uterino en centros de atención primaria de escasos recursos en Cali, Colombia, empleando la metodología de Diseño Centrado en el Ser Humano (HCD). Uno de los hallazgos más destacados fue Citobot, un dispositivo médico que sustituye el espéculo vaginal convencional y fusiona el examen visual con ácido acético (VIA), la captura de imágenes cervicales y el análisis por inteligencia artificial para detectar lesiones precancerosas. El dispositivo fue diseñado en respuesta al miedo, dolor y vergüenza vinculados al examen ginecológico tradicional, obstáculos habituales en la población de interés.

Citobot se distingue por su enfoque en la experiencia de la paciente y por incorporar tecnologías de innovación como un algoritmo de Inteligencia Artificial. Las primeras evaluaciones en entornos simulados mostraron una buena aceptación por parte de las usuarias, además del potencial del dispositivo para disminuir los tiempos de entrega de resultados y optimizar el monitoreo clínico. Este método demuestra cómo el diseño colaborativo y la innovación tecnológica pueden fusionarse para potenciar el acceso al diagnóstico precoz en grupos desatendidos.

- **Aptasensor basado en grafeno inducido por láser para la detección selectiva de *Escherichia coli* en muestras de orina [198]**

En este estudio, se desarrolló un aptasensor electroquímico basado en electrodos de grafeno inducido por láser (LIG), funcionalizados covalentemente con aptámeros específicos para detectar *Escherichia coli* en muestras de orina. El sensor utiliza la espectroscopía electroquímica de impedancia (EIS) para identificar variaciones en la resistencia de transferencia de carga producidas por la interacción directa con las bacterias. Se logró una respuesta lineal en concentraciones de *E. coli* entre 100 y 10^3 CFU/mL y límites de detección tan bajos como 9 CFU/mL en PBS, 19 CFU/mL en orina artificial y 34 CFU/mL en orina humana. La implementación de LIG permitió la producción rápida, sin máscaras fotolitográficas, es decir, sin necesidad de plantillas físicas para definir los patrones. Además, es compatible con sustratos flexibles como Kapton. Adicionalmente, el sensor demostró una elevada especificidad en relación a bacterias habituales como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Este sensor, por su corto tiempo de respuesta (cerca de 30 minutos) y su habilidad para funcionar sin tratamientos de muestra complicados, se presenta como una herramienta efectiva para usos clínicos portátiles y la detección de infecciones urinarias en el lugar de atención (POC).

- **SenSARS: Sistema electroquímico portátil y de bajo costo para el diagnóstico ultra-sensible y casi en tiempo real de infecciones por SARS-CoV-2 [199]**

En esta investigación se creó un sistema electroquímico portátil, asequible y de alta sensibilidad, fundamentado en la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), diseñado para la detección rápida del antígeno Spike del SARS-CoV-2. El dispositivo utiliza electrodos impresos de carbono (SPCE), funcionalizados con anticuerpos monoclonales anti-Spike, incorporados en una plataforma portátil de menos de 200 gramos y con una autonomía de cinco horas.

El sistema analiza las alteraciones en la impedancia eléctrica producidas por la interacción con las proteínas virales, facilitando un diagnóstico en cerca de 10 minutos. Se logró un límite de detección de 1.065 fg/mL, presentando una respuesta lineal de 1 a 20 fg/mL, y una elevada especificidad ante otros virus como H1N1 y Epstein-Barr. Los resultados logrados se corroboraron ante equipos comerciales (PalmSens y Autolab), demostrando concordancia significativa. Pese a su precisión, se detectaron variaciones producto de la manipulación manual de los electrodos, lo que incentivó sugerencias de mejora como la automatización del procedimiento, la implementación de sistemas microfluídicos y una encapsulación segura.

- **Desarrollo de una prueba de flujo lateral con nanopartículas de oro conjugadas para la detección del Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo [200, 66]**

Este trabajo propone una alternativa de diagnóstico accesible para la detección del virus del papiloma humano (VPH), centrándose en las variantes de alto riesgo VPH16 y VPH18, asociadas al cáncer de cuello uterino. En respuesta a las restricciones de acceso a procedimientos tradicionales en áreas rurales de Colombia, se desarrolló una prueba de flujo lateral (LFA) basada en nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpos específicos, con la capacidad de identificar visualmente la presencia del virus en muestras clínicas. El prototipo demostró resultados prometedores en cuanto a sensibilidad, especificidad y estabilidad. La síntesis controlada de nanopartículas (~ 20 nm) y su caracterización garantizaron la reproducibilidad del sistema. Gracias a su bajo costo, facilidad de uso y portabilidad, esta plataforma se presenta como una herramienta diagnóstica adecuada para contextos con infraestructura limitada, favoreciendo la detección precoz del cáncer cervical en poblaciones vulnerables.

Adicionalmente, el ensayo colorimétrico fue validado analíticamente, reportando que los límites de detección y cuantificación para HPV16-L1 fueron de $0.18 \mu\text{g/mL}$ y $0.54 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. La selectividad del ensayo fue excepcional, sin reactividad cruzada frente a otras variantes de HPV-L1 ni proteínas no relacionadas [200, 66]. Estos parámetros de validación constituyen la referencia de comparación para el biosensor LIG desarrollado en el presente trabajo, particularmente en lo que respecta a linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y selectividad.

Materiales y Métodos

6.1. Materiales y reactivos

Los anticuerpos monoclonales anti-HPV16-L1 (ab234305) y anti-HPV18-L1 (ab267404), junto con las proteínas recombinantes HPV16-L1 (ab119880), HPV16-E6 (ab226447), HPV16-E7 (ab237790), HPV18-L1 (ab119881) y HPV18-E7 (ab236931), fueron suministrados por Abcam, Ltd. (Cambridge, Reino Unido). La proteína recombinante HPV18-E6 (DAGF-097) se adquirió de Creative Diagnostics (Shirley, NY, USA), mientras que las proteínas HPV6-L1, HPV11-L1, HPV33-L1, HPV45-L1 y la proteína SARS-CoV-2 B.1.1.529 (omicron) Spike RBD se obtuvieron de Sino Biological Inc. (Beijing, China).

Para la funcionalización de la superficie del sensor, se utilizó ácido 1-pirenobutírico (1-PBA, P980500) de TRC (Canadá), en conjunto con clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC HCl, E6383) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de Merck (Darmstadt, Alemania).

El resto de los reactivos químicos empleados, incluyendo hexacianoferrato (II) de potasio trihidrato, hexacianoferrato (III) de potasio trihidrato, albúmina sérica bovina (BSA), tampón fosfato salino (PBS), sulfato de sodio, urea, cloruro sódico y cloruro de amonio, fueron provistos por Sigma-Aldrich. Por su parte, el citrato de sodio dihidratado, el cloruro de potasio, el cloruro de calcio anhidro y el di-sodio hidrogenofosfato se adquirieron de Supelco (USA), mientras que el sulfato de magnesio heptahidratado fue suministrado por PanReac AppliChem (Alemania).

Para la fabricación del dispositivo, se utilizó una película de poliimida de $125\mu\text{m}$ de espesor como sustrato (Shijiazhuang Dadao Packaging Materials Co., Ltd.). La máscara de delimitación de la zona de reacción se elaboró con cinta adhesiva de doble cara referencia 9965 (3M, USA). Los electrodos y contactos se definieron mediante el uso de tinta de Ag/AgCl DYCOTEC DM-SIP-3450 (Dycotec Materials, Reino Unido) y pintura de plata coloidal Leitsilber 200 (Ted Pella, Inc., USA). El manejo de soluciones se realizó con micropipetas de precisión (2 a $1000\mu\text{L}$) y material de vidrio estándar (beakers, balones aforados y cajas Petri y tubos Eppendorf (0.5, 1.5 y 2 mL).

6.2. Equipos e instrumentación

Para la caracterización estructural y morfológica del LIG, se empleó microscopía FE-SEM (Tescan CLARA, República Checa) sobre muestras preparadas mediante pulverización catódica (VACCOAT DSR1, Reino Unido). Este análisis se complementó usando espectroscopía Raman (microscopio DXR3, Thermo Fisher Scientific, USA). Asimismo, los grupos funcionales superficiales se determinaron mediante un espectrómetro FT-IR Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific,

USA). La inspección visual durante el proceso se efectuó con estereomicroscopios AmScope SM-4T (USA) y Motic SMZ-171 (Motic, China).

El proceso de fabricación y tratamiento del LIG incluyó el uso de un sistema de grabado láser VLS2.30DT (Universal Laser Systems, USA), un limpiador por plasma HPT-100 (Henniker Plasma, Reino Unido) y un horno universal UN110 (Memmert, Alemania). La preparación de soluciones requirió el uso de un agitador magnético con control de temperatura S88857108 (Thermo Scientific, USA) y una balanza analítica WTC 2000 (RADWAG Balances & Scales, USA).

Finalmente, las mediciones electroquímicas y la validación del desempeño del biosensor se ejecutaron utilizando un potenciostato Sensit Wearable (PalmSens BV, Países Bajos).

6.3. Software y procesamiento de datos

El procesamiento y análisis estadístico de los datos experimentales se realizó mediante el software OriginPro 2024 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Para el análisis de imágenes digitales, específicamente en la determinación del ángulo de contacto y la caracterización morfológica, se utilizó el software de código abierto ImageJ (National Institutes of Health, USA). Para el diseño del sensor multiplexado con dos electrodos de trabajo se utilizó AutoCAD (Autodesk, USA).

6.4. Desarrollo experimental

6.4.1. Fabricación de electrodos de LIG

Durante el desarrollo de este trabajo se emplearon dos diseños de sensor. Para las pruebas de validación y los experimentos de detección de VPH 18 L1 se utilizó un sensor de un único electrodo de trabajo (WE), con su electrodo de referencia (RE) y contraelectrodo (CE) integrados, cuyas dimensiones son 24.3 mm de altura y 6.35 mm de base (Figura 6.1a). Para el sensor multiplexado se empleó un diseño de dos electrodos de trabajo (WE), uno de referencia y un contraelectrodo (Figura 6.1b), adaptado en Autodesk AutoCAD a partir del diseño propuesto por Marques y colaboradores [183] para detección electroquímica dual.

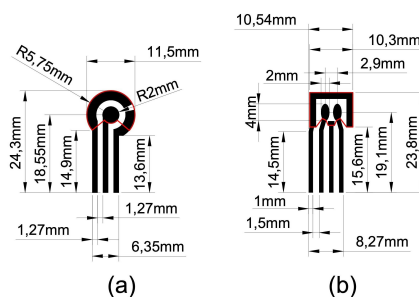


Figura 6.1: Dimensiones y formas de los sensores usados durante el desarrollo experimental. (a) Sensor empleado durante las pruebas de validación con un electrodo de trabajo. (b) Sensor multiplexado con dos electrodos de trabajo.

La fabricación del LIG se realizó sobre láminas de poliimida. El material se precalentó a 150°C durante 30 minutos y, tras enfriarse, se cortó según las dimensiones requeridas para el diseño del sensor. Posteriormente, las piezas se limpiaron mediante sonicación en isopropanol durante 30 minutos y se secaron a temperatura ambiente antes de su almacenamiento en condiciones herméticas.

Para el grabado, se utilizó un sistema láser de CO_2 (Universal Laser Systems) con un lente de alta densidad de potencia HPDFO. Los parámetros de operación se fijaron en una potencia de 16.2% (4.8 W), velocidad de 14% (111 mm/s) y una resolución de 1000 PPI, empleando el modo raster. Finalizada la irradiación, los electrodos se retiraron cuidadosamente para continuar con las etapas de acabado.

A continuación, se procedió a depositar la tinta de referencia sobre el RE de cada sensor mediante pintura de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) DYCOTEC DM-SIP-3450 (Dycotec Materials, Reino Unido), seguida de un curado en horno a 140°C durante 30 minutos. Tras retirar los sensores del horno, se aplicó pintura de plata coloidal Leitsilber 200 (Ted Pella, Inc., EE. UU.) sobre las terminales de conexión, cubriendo desde la mitad del sensor hasta su extremo distal, y se dejaron secar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se colocó sobre cada sensor una máscara de cinta adhesiva de doble cara 3M (9965), cuya función es aislar el electrodo de trabajo de las terminales de conexión, impidiendo que los líquidos dispensados sobre el área de trabajo migren hacia los terminales. En la Figura 6.2 se muestran ambos sensores terminados, con su máscara aplicada y listos para su uso.

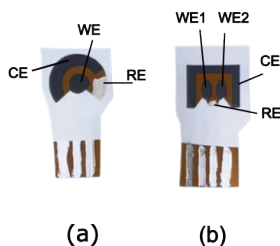


Figura 6.2: Fotografías de los sensores LIG finalizados con máscara aplicada. (a) Sensor de un único electrodo de trabajo (WE), electrodo de referencia (RE) y contraelectrodo (CE) integrados, empleado en las pruebas de validación. (b) Sensor multiplexado con dos electrodos de trabajo independientes (WE1 y WE2) y RE y CE compartidos, empleado en el ensayo final.

6.4.2. Tratamientos superficiales para la modificación de la hidrofiliidad

Debido a la naturaleza hidrofóbica del LIG, se evaluaron tres estrategias de modificación superficial para incrementar su afinidad por soluciones acuosas y facilitar la inmovilización de biorreceptores. Para la validación de estos métodos, se incluyó un grupo control consistente en electrodos de LIG fabricados mediante el protocolo de grabado estándar del laboratorio, sin modificaciones posteriores.

Con base en la literatura, se seleccionaron métodos orientados a aumentar la densidad de grupos carboxilo en la superficie del material. El primer tratamiento consistió en una hidratación previa del sustrato mediante la deposición de una capa de agua desionizada sobre la poliimida antes del grabado láser, seguido de un secado térmico a 80 °C por 10 minutos [201]. El segundo método empleó un flujo de aire frío constante a 20 PSI durante el proceso de impresión [202]. En el tercer tratamiento, los electrodos estandarizados se sometieron a un plasma de aire a 1.5 Bar en una cámara cerrada. La Figura 6.3 ilustra los esquemas de estos procesos.

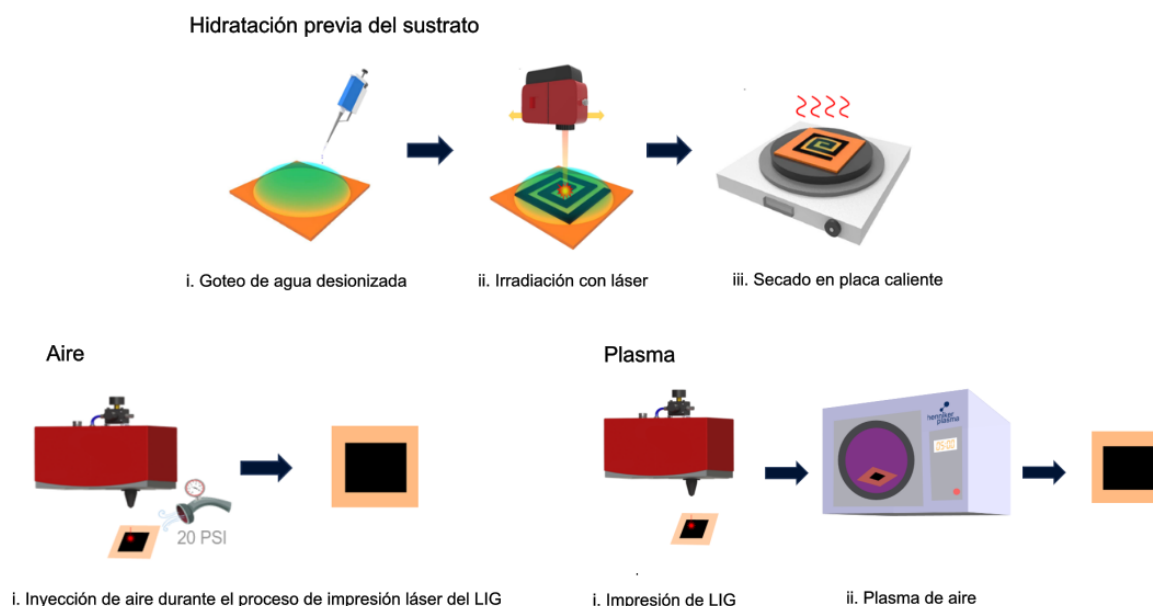


Figura 6.3: Esquema comparativo de los tratamientos aplicados al grafeno.

6.4.3. Caracterización del material

Las propiedades del LIG se evaluaron mediante un análisis multitécnico comparativo. La calidad estructural y la densidad de defectos se determinaron mediante espectroscopía Raman, analizando la evolución de las bandas características (D , G y $2D$) tras los diversos tratamientos. Para garantizar un punto de comparación estadísticamente representativo, se caracterizó el material mediante un muestreo de cinco puntos aleatorios en cinco electrodos independientes ($n = 25$) por tratamiento. Complementariamente, la composición química y los grupos funcionales se identificaron mediante FTIR, empleando la técnica de pastilla de KBr para mitigar la alta absorptividad óptica del material. Con el fin de descartar la contribución de humedad adsorbida en las señales, cada electrodo fue sometido a un tratamiento térmico a 100 °C durante 10 minutos previo a la preparación de la pastilla de KBr.

La morfología y porosidad superficial se analizaron por FE-SEM y EDS. Para optimizar la resolución, las muestras se recubrieron con una capa de oro (2 nm) mediante pulverización catódica (35 mA, 60 s) utilizando una recubridora por pulverización catódica de escritorio DSR1 (VACCOAT,

Reino Unido). Las imágenes se adquirieron mediante un detector de electrones secundarios utilizando el microscopio electrónico de barrido por emisión de campo (FE-SEM) modelo CLARA (TESCAN), y la composición elemental de la superficie se verificó mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS).

Finalmente, la hidrofiliidad se cuantificó midiendo el ángulo de contacto de una gota de agua desionizada ($2\ \mu\text{L}$) depositada sobre el LIG. Las imágenes se capturaron con un microscopio trinocular AmScope SM-4T y se procesaron mediante el software ImageJ para determinar el ángulo de contacto.

6.4.4. Funcionalización del sensor

La inmovilización de los anticuerpos sobre la superficie del LIG se evaluó mediante dos estrategias de funcionalización, ambas evaluadas sobre el sensor de un único electrodo de trabajo empleado durante las pruebas de validación. Siguiendo el protocolo de Tabassum y colaboradores [203], la primera estrategia consistió en una funcionalización covalente directa en la que se depositaron $8\ \mu\text{L}$ de una solución de EDC-HCl ($0.4\ \text{M}$) directamente sobre el electrodo de trabajo seguido de incubación durante 2 horas en la oscuridad. Posteriormente, se depositaron $8\ \mu\text{L}$ de agua tipo I sobre el electrodo de trabajo, se dejó actuar durante 5 minutos y se retiró el excedente con papel absorbente, este procedimiento se repitió 3 veces. A continuación, se depositaron $8\ \mu\text{L}$ de NHS ($0.4\ \text{M}$) sobre el electrodo de trabajo y se incubó otras 2 horas en la oscuridad, seguidas del mismo protocolo de lavado. Una vez activada la superficie, se añadieron $8\ \mu\text{L}$ de anticuerpos anti-VPH 18 L1 ($37.5\ \text{ng/mL}$) sobre el electrodo de trabajo y se incubó durante 1 hora, tras lo cual se realizó un nuevo lavado. Posteriormente, se depositaron $8\ \mu\text{L}$ de albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % como agente bloqueante y se incubó durante 30 minutos, seguidos de un lavado final con agua tipo I. Los sensores se almacenaron a 4°C hasta su uso.

La segunda estrategia, de funcionalización mixta, siguió el procedimiento de Vaughan [204]. Se depositaron $2\ \mu\text{L}$ de ácido 1-pirenobutírico (1-PBA, $250\ \text{mM}$ en DMSO) sobre el electrodo de trabajo y se incubó durante 60 minutos, lavando posteriormente con un chorro de PBS 1X durante 5 segundos, este procedimiento se repitió 3 veces. Posteriormente, se depositaron $8\ \mu\text{L}$ de una solución acuosa de EDC ($75\ \text{mM}$) y NHS ($50\ \text{mM}$) sobre el electrodo de trabajo y se incubó durante 90 minutos. Tras la activación, se realizó un lavado por inmersión depositando $8\ \mu\text{L}$ de PBS 1X sobre el electrodo de trabajo durante 15 minutos, retirando la solución con papel absorbente. A continuación, se añadieron $8\ \mu\text{L}$ de anticuerpos anti-VPH 18 L1 ($37.5\ \text{ng/mL}$) y se incubó durante 90 minutos, seguidos de un lavado con chorro de PBS 1X (5 segundos, 3 veces). Finalmente, se depositaron $8\ \mu\text{L}$ de albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % como agente bloqueante, con una incubación de 30 minutos y un lavado final con el mismo protocolo. Los sensores se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Para la prueba de concepto con el sensor multiplexado, cuyo menor diámetro de electrodo de trabajo requirió ajustar los volúmenes, se siguió la estrategia de funcionalización mixta con las siguientes modificaciones: se depositaron $0.8\ \mu\text{L}$ de 1-PBA sobre cada electrodo de trabajo, y para todas las soluciones posteriores (EDC/NHS, anticuerpo y BSA) se emplearon $3\ \mu\text{L}$ por electrodo. Los tiempos de incubación y los protocolos de lavado se mantuvieron idénticos a los descritos

anteriormente.

6.4.5. Validación analítica del biosensor

La validación analítica del biosensor basado en LIG se llevó a cabo mediante la determinación de los parámetros de linealidad, sensibilidad, selectividad y robustez. Este proceso se realizó siguiendo el protocolo establecido por Navarro-Chica y colaboradores [66], adaptado específicamente para la detección de VPH 18-L1. Para este propósito, se empleó como modelo de estudio el sistema de interacción entre el anticuerpo monoclonal específico y la proteína recombinante VPH 18-L1.

Este proceso permitió establecer el rango operativo del nanosensor, sus límites de detección y la fiabilidad de la respuesta electroquímica frente a posibles interferentes y variaciones en el proceso de fabricación.

6.4.5.1. Procedimiento de medición electroquímica

Las mediciones electroquímicas se realizaron con el potenciostato portátil Sensit Wearable (PalmSens BV, Países Bajos) mediante voltametría de onda cuadrada (VOC, del inglés *Square Wave Voltammetry*, SWV), una técnica pulsada de alta sensibilidad que permite detectar variaciones en la corriente de oxidación y reducción de una sonda redox en función del potencial aplicado. Los parámetros instrumentales empleados fueron: tiempo de equilibración de 5 s, potencial inicial de -0.1 V, potencial final de 0.5 V, incremento de potencial (E_{step}) de 0.01 V, amplitud de 0.05 V y frecuencia de 1.0 Hz. Como sonda redox se empleó el par conjugado ferrocianuro/ferricianuro, preparado como una solución compuesta por 5 mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y 5 mM de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en tampón PBS 0.01 M (pH 7.4).

Para las mediciones de control, se depositaron $100 \mu\text{L}$ de solución redox directamente sobre el sensor funcionalizado, cubriendo la totalidad de los electrodos (WE, CE y RE), y se conectaron las terminales al potenciostato para la adquisición de la señal. En las mediciones con analito realizadas con el sensor de un WE, se depositaron $8 \mu\text{L}$ de solución de proteína VPH-18 L1 a la concentración correspondiente sobre el WE y se incubaron durante 60 minutos; transcurrido este tiempo, se lavó el electrodo con un chorro de PBS 1X durante 5 segundos, repitiéndolo 3 veces, tras lo cual se depositaron $100 \mu\text{L}$ de solución redox sobre la totalidad del sensor para proceder con la medición. En el caso del sensor multiplexado, se depositaron $3 \mu\text{L}$ de proteína sobre cada WE de forma independiente, manteniendo el mismo tiempo de incubación y protocolo de lavado, y se emplearon $80 \mu\text{L}$ de solución redox para cubrir la totalidad del sensor durante la adquisición de la señal.

6.4.5.2. Análisis estadístico

Los experimentos fueron realizados por quintuplicado ($n = 5$) salvo que se indique lo contrario. Los datos obtenidos se procesaron en OriginPro 2025 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.). Los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (DE). Previo a cualquier comparación, la normalidad de los datos fue verificada mediante una prueba de normalidad. Para comparaciones entre dos grupos se empleó la prueba t de Student para muestras independientes;

cuando se compararon más de dos grupos simultáneamente, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey para comparaciones múltiples. En todos los casos se estableció un nivel de significancia de $p < 0.05$.

6.4.5.3. Determinación de selectividad

Para evaluar la capacidad del dispositivo de distinguir el analito objetivo frente a posibles interferentes, se fabricaron y funcionalizaron electrodos siguiendo el protocolo de funcionalización mixta detallado en la sección 6.4.4. Las mediciones se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.4.5.1

Se evaluaron trece grupos experimentales, donde el primero correspondió a un control negativo (blanco) en el que el sensor funcionalizado se midió únicamente en la solución redox. Los grupos restantes se expusieron a una concentración constante de 200 ng/mL de las siguientes proteínas: el analito específico VPH 18-L1, los genotipos VPH 16-L1, 33, 6, 11 y 45, las oncoproteínas E6 y E7 (de los tipos 16 y 18), proteína Spike y BSA. El procesamiento de datos y el análisis estadístico se llevaron a cabo conforme a lo indicado en la sección 6.4.5.2

6.4.5.4. Determinación de la linealidad

La linealidad del biosensor se evaluó mediante la construcción de una curva de calibración utilizando la proteína recombinante VPH 18-L1. Para ello, se prepararon muestras del analito en concentraciones de 6.25, 25, 50, 100 y 200 ng/mL. Para cada punto de la curva, los sensores se funcionalizaron y las mediciones se realizaron conforme a los protocolos descritos en las secciones 6.4.4 y 6.4.5.1, respectivamente. Los datos de altura de pico se ajustaron mediante regresión lineal para establecer la relación entre la respuesta de corriente (μA) y la concentración de VPH 18-L1.

6.4.5.5. Determinación de la sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del biosensor se estimó mediante el cálculo del límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ). Para ello, se construyó una curva de calibración a concentraciones bajas (1.5, 3.1 y 6.25 ng/mL), inferiores al punto más bajo de la curva de linealidad. Los parámetros analíticos se calcularon a partir de las siguientes expresiones[205]:

$$LoD = \frac{3.3 \times \sigma}{m} \quad (6.1)$$

$$LoQ = \frac{10 \times \sigma}{m} \quad (6.2)$$

donde σ corresponde a la desviación estándar de los valores del grupo control sin proteína, y m es la pendiente de la curva de calibración obtenida a partir de las concentraciones evaluadas en el rango de 1.5 a 6.25 ng/mL.

6.4.5.6. Determinación de robustez del sensor

La robustez del biosensor se evaluó analizando el impacto de variaciones deliberadas en el tiempo de incubación del anticuerpo durante el proceso de funcionalización, evaluando tres niveles: 60, 90 y 120 minutos. Para cada nivel, se midió la señal de corriente obtenida ante una concentración fija de proteína VPH 18-L1 de 200 ng/mL. El procesamiento de datos y el análisis estadístico se llevaron a cabo conforme a lo indicado en la sección 6.4.5.2

6.4.5.7. Preparación de orina artificial

La orina artificial fue preparada siguiendo el protocolo descrito por Sarigul y colaboradores [27]. Los componentes se disolvieron en 100 mL de agua desionizada bajo agitación magnética a 300 rpm, manteniendo la temperatura constante a 37.5 °C mediante la función de calentamiento del agitador.

Dado que no fue posible obtener todos los componentes de la formulación original, se utilizaron los reactivos disponibles enumerados en la Tabla 6.1. Una vez preparada, la solución se almacenó durante 24 horas en refrigeración a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se midió el pH inicial de la solución (7.52) y se ajustó a un valor de 6.00, correspondiente al rango fisiológico de la orina humana, mediante la adición de HCl 1 M.

Tabla 6.1: Componentes utilizados en la preparación de la orina artificial, adaptados de [27].

Compuesto	Molaridad (mM)	Cantidad (g/100 mL)
Na ₂ SO ₄	11.965	0.1700
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	2.450	0.0720
C ₄ H ₇ N ₃ O	7.791	0.0881
CH ₄ N ₂ O	249.750	1.5000
KCl	30.953	0.2308
NaCl	30.053	0.1756
CaCl ₂	1.663	0.0185
NH ₄ Cl	23.667	0.1266
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.389	0.1082
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4.667	0.0831

6.4.5.8. Prueba de concepto del sensor multiplexado

Con el fin de evaluar el desempeño del biosensor en condiciones representativas de su aplicación clínica, se llevó a cabo una prueba de concepto empleando el sensor multiplexado descrito en la sección 6.4.1. Cada electrodo de trabajo fue funcionalizado de forma independiente con un anticuerpo específico: uno dirigido contra la proteína L1 del VPH 16 y otro contra la proteína L1 del VPH 18, siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.4.4.

Se evaluaron tres grupos experimentales. El primero correspondió al control, en el que los sensores fueron funcionalizados pero no expuestos a proteína, registrándose únicamente la señal basal. El segundo grupo fue incubado con las proteínas VPH 16-L1 y VPH 18-L1 disueltas en PBS 1X a

200 ng/mL durante 60 minutos sobre cada WE correspondiente. El tercer grupo se incubó bajo las mismas condiciones, pero con las proteínas disueltas en orina artificial preparada según el procedimiento descrito en la sección [6.4.5.7](#). Las mediciones electroquímicas y el procesamiento de datos se realizaron conforme a lo descrito en las secciones [6.4.5.1](#) y [6.4.5.2](#), respectivamente.

Resultados y Discusión

7.1. Modificación y caracterización del LIG

El objetivo principal de esta etapa fue modificar la superficie del LIG para incrementar su hidrofiliidad de forma reproducible, garantizando una interacción óptima con medios biológicos acuosos como la orina. Se evaluaron cuatro tratamientos: control (sin tratamiento), hidratación previa, exposición a aire y tratamiento por plasma. La caracterización se realizó mediante espectroscopía Raman e infrarroja (FTIR), microscopía electrónica de barrido (FE-SEM) y microscopía óptica para medición de ángulo de contacto.

7.1.1. Caracterización estructural por espectroscopía Raman

El espectro del LIG muestra las tres bandas características del grafeno. De derecha a izquierda, la banda D ($\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$) refleja la presencia de defectos estructurales y bordes de grano en la red gráfitica; la banda G ($\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$) corresponde a la vibración en el plano de los átomos de carbono con hibridación sp^2 y es indicativa de la estructura gráfitica ordenada; y la banda 2D ($\sim 2700 \text{ cm}^{-1}$) está relacionada con el ordenamiento del grafeno en capas típico del LIG.

En la Figura 7.1 se presenta el espectro representativo del LIG control que corresponde a la obtención directa del material sin ningún tratamiento posterior.

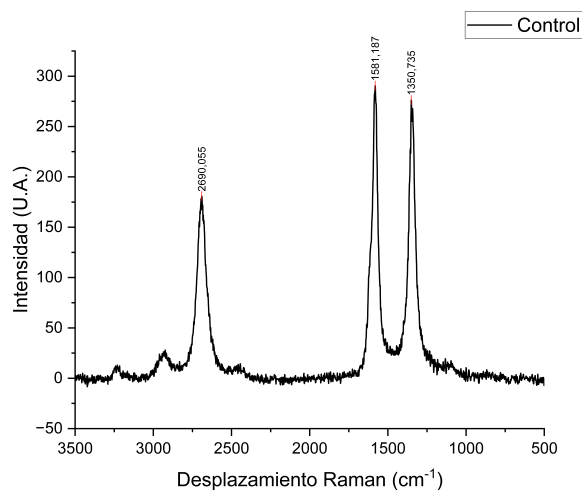


Figura 7.1: Espectro Raman del grupo control.

Para cuantificar la calidad del material, se procesaron las alturas de estos picos, calculando las relaciones de intensidad I_G/I_D e I_{2D}/I_G . La relación I_{2D}/I_G es el indicador principal del número de capas, donde un valor < 1 confirma la obtención de grafeno multicapa, característica propia del LIG. La segunda relación fue I_G/I_D , es una métrica que permite cuantificar la proporción de defectos en la muestra. Una relación I_G/I_D baja indica un aumento en la densidad de defectos, lo que sugiere la formación de grupos funcionales sobre la superficie [206]. En la Figura 7.2 se observa la dispersión de las relaciones obtenidas por replica.

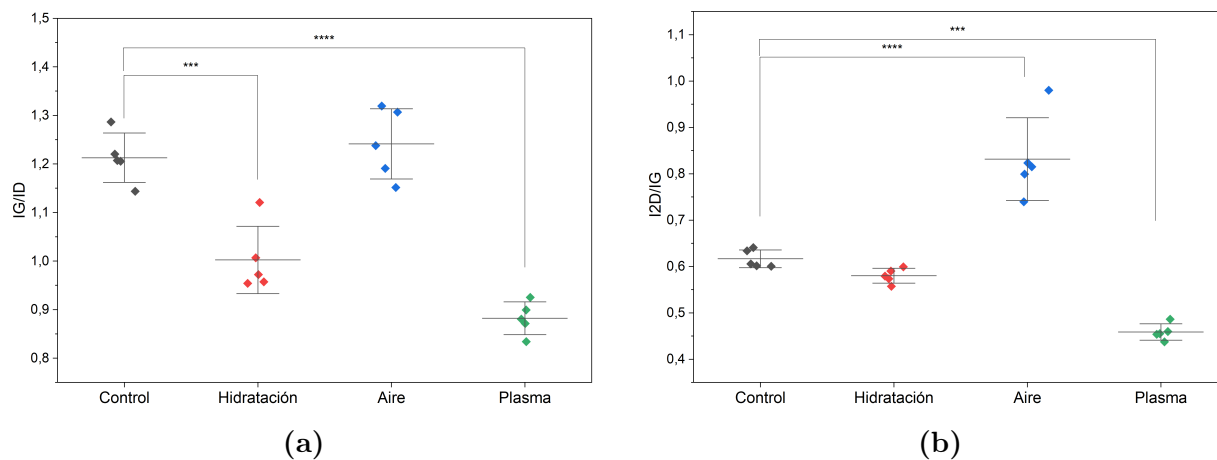


Figura 7.2: Distribución de las relaciones espectrales Raman para cada tratamiento de superficie del LIG. **(a)** Relación I_G/I_D y **(b)** relación I_{2D}/I_G . Los datos se presentan como media $\pm$ DE sobre cinco réplicas por tratamiento. El análisis estadístico corresponde a ANOVA de una vía con prueba post-hoc de Tukey ($\alpha = 0.05$). Para I_G/I_D : Hidratación vs Control ($p < 0.001$, ***), Plasma vs Control ($p < 0.0001$, ****), Aire vs Control ($p = 0.866$, n/s). Para I_{2D}/I_G : Aire vs Control ($p < 0.0001$, ****), Plasma vs Control ($p < 0.001$, ***), Hidratación vs Control ($p = 0.622$, n/s).

Los resultados permiten caracterizar el efecto de cada tratamiento sobre la estructura del LIG. Como se observa en la Figura 7.2a, la relación I_G/I_D muestra que el tratamiento con plasma produjo la mayor reducción respecto al control ($p < 0.0001$), indicando un aumento significativo en la densidad de defectos superficiales, comportamiento consistente con la capacidad del plasma para generar sitios activos mediante la ruptura de enlaces C=C y la posible incorporación de grupos funcionales oxigenados como hidroxilo ($-C-OH$), carboxilo ($-COOH$) y carbonilo ($-C=O$) sobre la superficie del material [207]. La hidratación previa también mostró una reducción significativa ($p < 0.001$), posicionándose como una alternativa viable en términos estructurales cuando el objetivo es crear defectos o potenciales sitios activos. El tratamiento con aire, en cambio, no generó diferencias significativas respecto al control ($p = 0.866$, n/s), sugiriendo que no introduce defectos adicionales en la red grafitica bajo las condiciones evaluadas.

En cuanto a la relación I_{2D}/I_G , la Figura 7.2b muestra que los valores se mantuvieron por debajo de 1 en todos los tratamientos, confirmando que el material corresponde a grafeno multicapa,

característica inherente al proceso de inducción láser y consistente con lo reportado en la literatura [208]. No obstante, se observaron diferencias entre tratamientos: el tratamiento con aire presentó un incremento en la relación I_{2D}/I_G respecto al control, acercándose a 1, lo que sugiere una tendencia hacia la reducción en el número de capas. En contraste, el tratamiento con plasma mostró valores que se alejan significativamente de 1 ($p < 0.0001$), lo que indica la formación de un material con mayor número de capas y, por ende, una estructura potencialmente más porosa.

7.1.2. Caracterización química mediante espectroscopía FTIR

Para confirmar que el aumento de defectos identificado por Raman corresponde efectivamente a la incorporación de grupos oxigenados, se realizó un análisis complementario mediante FTIR, cuyos espectros para los cuatro tratamientos evaluados se presentan en la Figura 7.3.

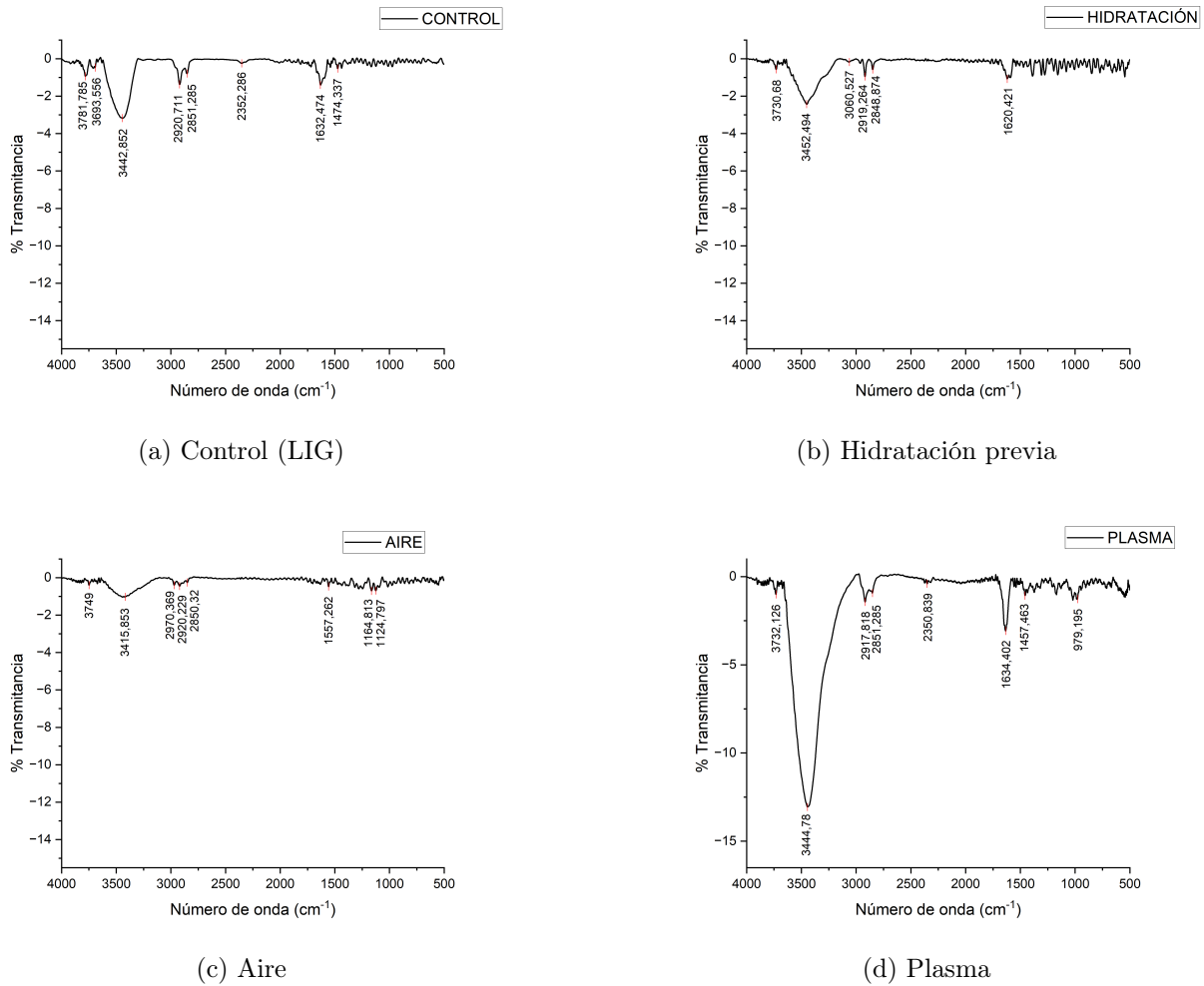


Figura 7.3: Espectros FTIR de los cuatro tratamientos de modificación superficial del LIG.

Las muestras se prepararon mediante la técnica de pastilla de KBr, dispersando el material LIG de cada tratamiento en bromuro de potasio y prensando la mezcla hasta obtener una pastilla translúcida apta para la medición en transmitancia. En todos los espectros se identifican bandas comunes que constituyen la huella química base del LIG: una banda ancha entre 3415 y 3452 cm^{-1} atribuida al estiramiento O–H de grupos hidroxilo superficiales, bandas en 2917 – 2920 cm^{-1} y 2849 – 2852 cm^{-1} correspondientes a estiramientos C–H alifáticos del LIG, y una señal entre 1620 y 1635 cm^{-1} atribuida a grupos carbonilo (C=O), observable en los espectros del control (Figura 7.3a), hidratación (Figura 7.3b) y plasma (Figura 7.3d), pero ausente en el tratamiento con aire (Figura 7.3c). La señal en $\sim 2350\text{ cm}^{-1}$, presente en el control y el plasma, corresponde a CO_2 atmosférico y no es atribuible al material [209].

Las diferencias entre tratamientos son evidentes al comparar tanto la intensidad de las bandas comunes como la aparición de señales adicionales en la región de huella digital (500 – 1500 cm^{-1}). El control y la hidratación presentan perfiles espectrales similares, con intensidades de la banda O–H comparables y sin señales nuevas en la región de huella digital, lo que indica que la hidratación previa no introduce de manera significativa hidroxilo enlazados de manera covalente a la superficie de grafeno. En su lugar el aumento en la proporción de defectos obtenida por Raman debe estar asociado a defectos no relacionados con dicho grupo funcional como defectos de Stone-Wales, vacancias simples o múltiples, y defectos de borde o de línea [210]. El tratamiento con aire muestra señales adicionales en 1557 cm^{-1} y en 1164 y 1124 cm^{-1} ; sin embargo, resulta relevante que no se observe una banda de carbonilo en torno a 1630 cm^{-1} , lo que indica que la exposición al aire no genera defectos tipo carbonilo en la red grafitica, a diferencia de lo observado con el tratamiento de plasma.

El tratamiento con plasma produjo el espectro con mayor intensidad en la banda O–H (3444 cm^{-1} , $\sim -14\%$ de transmitancia), superando en casi seis veces la intensidad observada en el control ($\sim -2.5\%$). Dado que los electrodos fueron secados previamente a 100°C , esta señal no puede atribuirse a humedad adsorbida, confirmando la presencia de grupos hidroxilo enlazados químicamente a la superficie. Adicionalmente, la banda en 1634 cm^{-1} confirma la presencia de grupos carbonilo (C=O) conjugados con la red grafitica, ausentes en el tratamiento con aire. En conjunto, estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura para tratamientos de plasma sobre materiales grafiticos [211], y confirman que el plasma de aire genera una funcionalización química real de la superficie del LIG mediante la incorporación de grupos oxigenados, en particular hidroxilos y carbonilos, lo cual es consistente con el aumento de defectos estructurales reportado por Raman.

7.1.3. Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)

Con el fin de evaluar si los tratamientos de modificación superficial generaron cambios visibles en la morfología y porosidad del LIG, se obtuvieron micrografías por FE-SEM a dos magnificaciones: $502\times$ para evaluar la distribución general de la porosidad, y $16,0\times$ para observar en detalle la microestructura de las láminas y filamentos de grafeno. Se empleó espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) con el objetivo de corroborar la composición elemental superficial identificada por FTIR; sin embargo, dado que elementos ligeros como el oxígeno no son detectados con suficien-

te sensibilidad por este detector, el análisis quedó limitado a confirmar la naturaleza carbonácea del material, con presencia de oro (Au) proveniente del recubrimiento de pulverización catódica empleado para mejorar la conductividad durante la medición.

El grupo control exhibe la morfología porosa característica del LIG, con poros bien definidos y láminas de grafeno suspendidas entre las paredes de los poros (Figura 7.4a y 7.4e), consistente con lo reportado en la literatura para LIG sintetizado sobre poliimida [212, 213]. La hidratación previa conserva la estructura laminar del material, con capas de grafeno más dispersas y alargadas, sin cambios estructurales significativos respecto al control (Figura 7.4b y 7.4f). El tratamiento con aire produjo una estructura fibrosa y fragmentada, con filamentos delgados de grafeno que conforman una red irregular entre los poros (Figura 7.4c y 7.4g).

El cambio morfológico más pronunciado fue el generado por el plasma: a alta magnificación se observa la coexistencia de dos zonas estructurales, una con poros de mayor tamaño similares a los de la estructura original del LIG y otra con poros más pequeños y densamente distribuidos (Figura 7.4d y 7.4h). Esto confirma la observación realizada a través de Raman cuyos resultados indican mayor porosidad inducida por este tratamiento. A menor magnificación, el tratamiento con plasma generó la red porosa más uniforme y compacta de todos los tratamientos evaluados. Esta reducción en el tamaño de poro y el aumento en la densidad de la red porosa incrementan el área superficial disponible, lo que, junto con la incorporación de grupos oxigenados identificados por FTIR, favorece la hidrofiliidad y la capacidad de interacción con medios acuosos. En la Figura 7.4 se presentan las imágenes obtenidas para cada tratamiento.

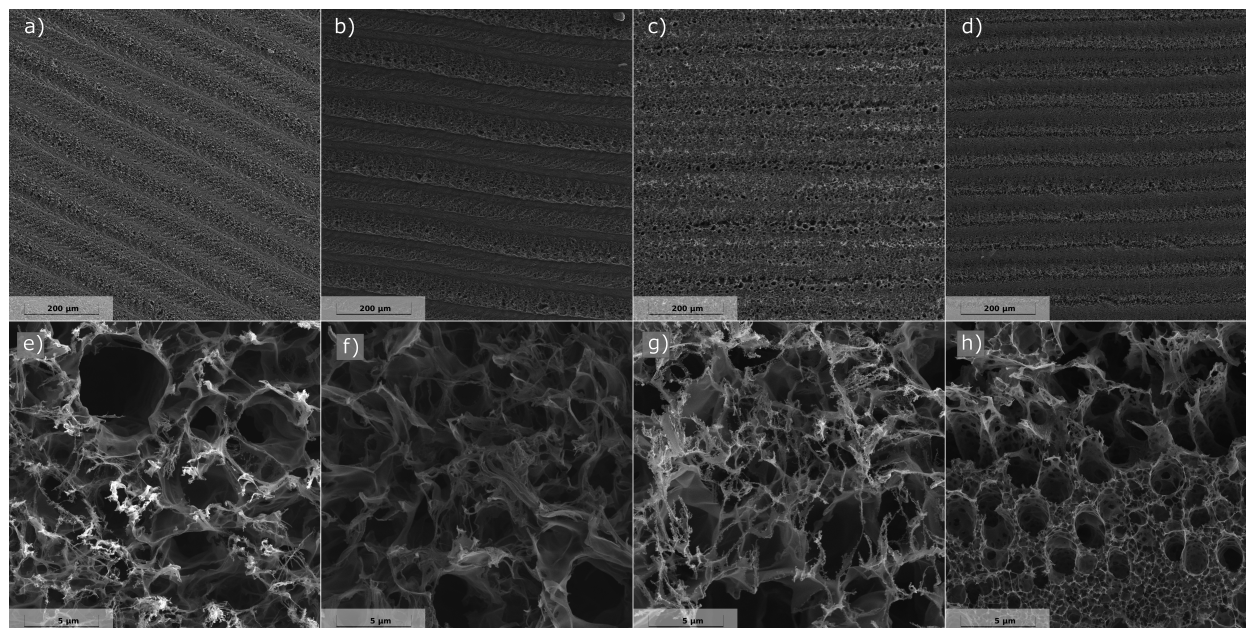
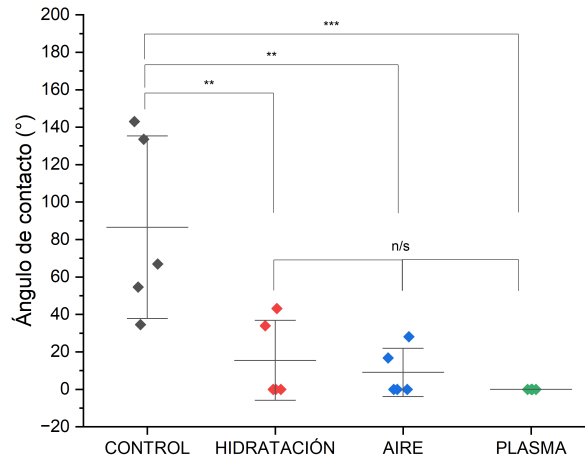
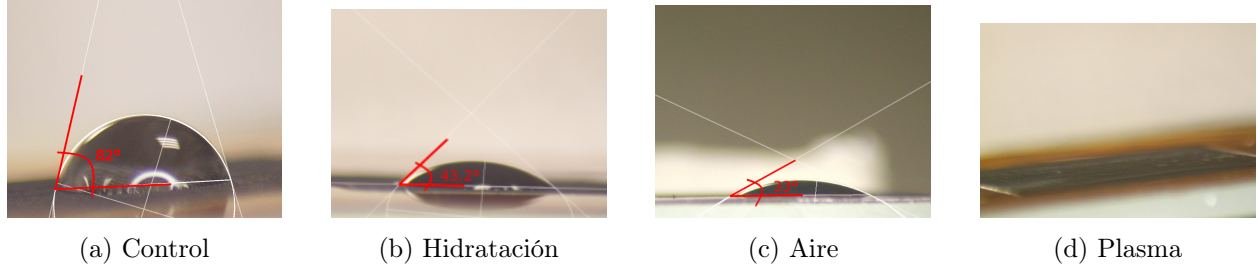


Figura 7.4: Micrográficas FE-SEM de los cuatro tratamientos de modificación superficial del LIG. Fila superior (502x): de izquierda a derecha, (a) control, (b) hidratación previa, (c) aire y (d) plasma. Fila inferior (16,0 kx): los mismos tratamientos en el mismo orden, (e)–(h).

7.1.4. Medición del ángulo de contacto

El ángulo de contacto fue medido como corroboración directa del efecto de cada tratamiento sobre la hidrofiliicidad del LIG, cuyos resultados se presentan en la Figura 7.5.



(e) Distribución de ángulos de contacto por tratamiento.

Figura 7.5: Análisis del ángulo de contacto de los electrodos LIG sometidos a distintos tratamientos de superficie. Los paneles (a)–(d) muestran una fotografía representativa de una de las cinco réplicas realizadas por tratamiento: (a) Control, con un ángulo de contacto de 82.0°; (b) Hidratación previa del sustrato, con un ángulo de 43.2°; (c) Aire, con un ángulo de 33.0°; y (d) Plasma, con un ángulo de 0°. El panel (e) muestra la distribución de los ángulos de contacto por tratamiento. El análisis estadístico corresponde a ANOVA de una vía con prueba post-hoc de Tukey ($\alpha = 0.05$): Control vs Hidratación ($p = 0.004$, **), Control vs Aire ($p = 0.002$, **), Control vs Plasma ($p < 0.001$, ***). Sin diferencias significativas entre los tratamientos entre sí (n/s).

Para cada condición se analizaron cinco electrodos independientes mediante microscopía óptica y el plugin *Contact Angle* del software ImageJ. Dado que las gotas presentaron geometría elipsoidal, se empleó el ángulo θ_E reportado por el software, calculando el ángulo de contacto real como su

complementario ($\theta = 180^\circ - \theta_E$), siguiendo el procedimiento descrito por Torrent-Burgués en [214]. El grupo Control presentó un ángulo de contacto promedio de 86.5° , valor cercano al umbral de 90° establecido como límite entre superficies hidrofílicas e hidrofóbicas [215], siendo el tratamiento con mayor carácter hidrofóbico entre los evaluados. Los tres tratamientos evaluados redujeron significativamente el ángulo de contacto respecto al control ($p < 0.01$ en todos los casos), sin presentar diferencias significativas entre ellos (n/s), lo que indica que todos generaron un efecto hidrofílico comparable sobre la superficie. No obstante, el tratamiento con plasma produjo un ángulo de contacto de 0° en todas las réplicas, que se observa en la Figura 7.5d como la absorción inmediata de la gota sobre la superficie sin formación de un ángulo medible. Este resultado corresponde a un comportamiento superhidrofílico, tal como ha sido reportado para LIG tratado con plasma de aire o sintetizado en atmósferas oxidantes [216].

7.2. Inmovilización covalente de anticuerpos en la superficie del nanosensor

Para evaluar la capacidad del biosensor de detectar la proteína VPH 18-L1, se compararon los dos protocolos de funcionalización descritos en la sección 6.4.4, con el fin de determinar cuál permitía una inmovilización eficiente del anticuerpo y una respuesta diferenciable ante el analito. El comportamiento esperado sigue un mecanismo *signal-off*, donde la formación del inmunocomplejo genera un impedimento estérico que reduce la corriente de pico respecto al control [217]. Las mediciones se realizaron conforme al procedimiento descrito en la sección 6.4.5.1. Se comparó un grupo control, correspondiente al sensor funcionalizado sin exposición a proteína, frente a un grupo en el que, tras la funcionalización, se depositaron $8 \mu\text{L}$ de proteína VPH 18-L1 a 200 ng/mL sobre el WE. En ambos casos, las mediciones se realizaron siguiendo el proceso descrito en la sección 6.4.5.1.

7.2.1. Funcionalización covalente directa

Se evaluó la unión directa sobre los grupos oxigenados del LIG ($n = 3$), incluyendo electrodos con y sin modificación superficial mediante plasma de aire, cuyos resultados se presentan en la Figura 7.6. En ambas condiciones los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y el grupo con proteína, lo que indica que el tratamiento con plasma de aire, a pesar de incrementar la densidad de defectos superficiales, no fue suficiente para lograr una densidad de anticuerpos adecuada mediante acoplamiento directo EDC/NHS.

Este resultado puede atribuirse a la insuficiente densidad de grupos carboxilo ($-\text{COOH}$) disponibles para el acoplamiento, dado que el plasma de aire introduce sobre la superficie del LIG una mezcla heterogénea de grupos oxigenados en la que predominan hidroxilos ($-\text{OH}$), epóxidos ($-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$) y carbonilos ($-\text{C}=\text{O}$) [207], siendo la fracción de $-\text{COOH}$ insuficiente para lograr una activación eficiente por EDC y una cobertura de anticuerpos que produjera una respuesta electroquímica diferenciable. Ante este resultado, se procedió a evaluar la estrategia de funcionalización mixta.

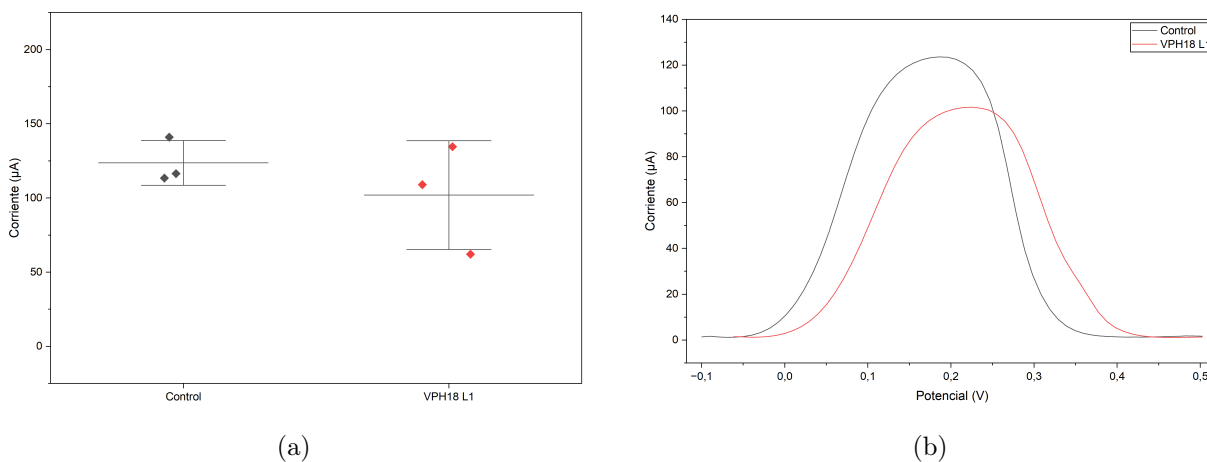


Figura 7.6: Evaluación de la funcionalización covalente directa. (a) Gráfica de dispersión de corriente de pico (media $\pm$ DE, $n = 3$). (b) Voltagramas SWV promedio. No se observó una disminución significativa de la señal tras la incubación del analito ($p = 0.279$).

7.2.2. Funcionalización mixta mediante 1-PBA

Se empleó el ácido 1-pirenobutírico (1-PBA) como interfaz para facilitar el apilamiento π - π sobre el grafeno y mejorar la estabilidad del complejo de inmovilización, evaluando la respuesta electroquímica mediante voltagramas de onda cuadrada (Figura 7.7).

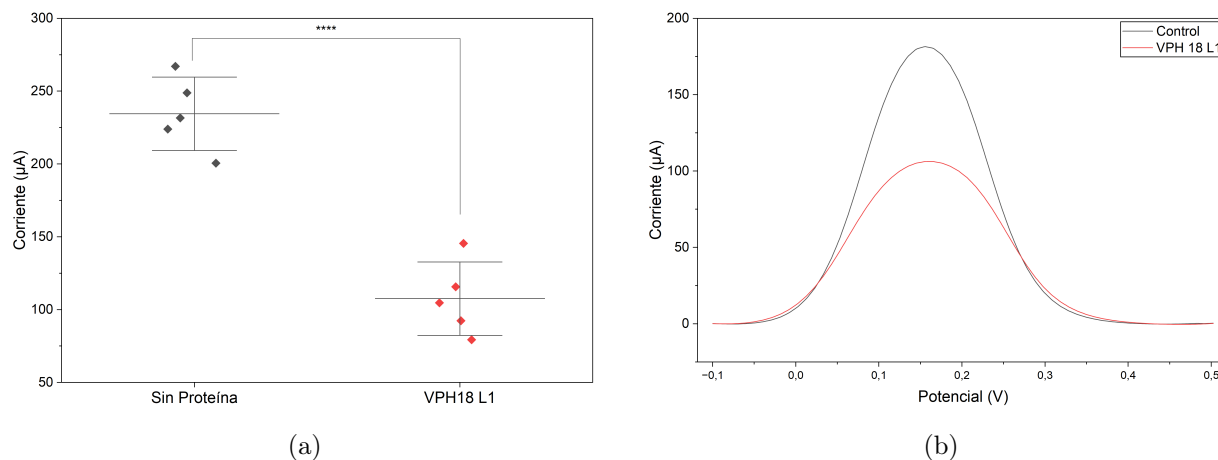


Figura 7.7: Resultados de la funcionalización mixta para la detección de VPH 18 L1 (200 ng/mL). (a) Gráfica de dispersión (media $\pm$ DE, $n = 5$) con diferencia significativa confirmada mediante una prueba t ($p < 0.0001$). (b) Voltagramas SWV promedio que muestran la caída de señal esperada.

La funcionalización se realizó sobre el LIG sin tratamiento superficial previo, dado que el pireno

y sus derivados requieren dominios de carbono con hibridación sp^2 para establecer interacciones estables de apilamiento π - π [218]. El tratamiento con plasma introduce grupos oxigenados mediante la ruptura de enlaces C=C [207], lo que reduce la densidad de sitios disponibles para dicha interacción. El protocolo presentó una reducción significativa de la corriente de pico ante la presencia de VPH 18 L1 ($p < 0.0001$), validando el mecanismo *signal-off*, donde el impedimento estérico tras la unión antígeno-anticuerpo restringe eficientemente la transferencia de carga desde y hacia la sonda del par conjugado ferrocianuro/ferricianuro en la superficie del electrodo. Esta estrategia asegura una inmovilización estable y orientada del anticuerpo [219], que combinada con la activación covalente a través de EDC/NHS permite acoplar el anticuerpo para la detección de la molécula objetivo. Debido a esta respuesta clara y reproducible, este protocolo fue seleccionado como estándar de fabricación para todas las etapas posteriores del desarrollo del biosensor.

7.3. Validación analítica del biosensor

7.3.1. Determinación de selectividad

La selectividad del biosensor se evaluó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.4.5.3, exponiendo el sensor funcionalizado con el anticuerpo anti-VPH 18 L1 a trece grupos de analitos diferentes a una concentración de 200 ng/mL, incluyendo el analito objetivo, proteínas estructurales de otros genotipos de VPH, oncoproteínas y proteínas no relacionadas. Los resultados demuestran que el biosensor detectó de forma específica la proteína objetivo VPH 18 L1, evidenciada por la reducción estadísticamente significativa de la corriente de pico respecto al control ($p < 0.0001$). La mayoría de las proteínas evaluadas, incluyendo BSA, VPH 33, VPH 6, VPH 11, VPH 45, proteína Spike y VPH 16 E6, no generaron una respuesta estadísticamente diferente al control, confirmando la selectividad del sensor (Figura 7.8).

Se observaron diferencias significativas en dos grupos adicionales: VPH 16 L1 ($p < 0.0001$) y VPH 18 E7 ($p = 0.0168$). La respuesta frente a VPH 18 E7 fue de menor magnitud estadística y podría atribuirse a interacciones inespecíficas con el anticuerpo. La respuesta obtenida frente al VPH 16 L1 resulta analíticamente relevante ya que, a pesar de que el ensayo se centró en la detección del genotipo 18, la reducción de corriente indica que el anticuerpo anti-VPH 18 L1 no logra discriminar completamente entre ambas proteínas. Este comportamiento puede explicarse por la elevada similitud estructural entre las proteínas L1 de los genotipos 16 y 18, que comparten dominios conformacionales conservados en la cápside viral. Este hallazgo es consistente con lo reportado por Navarro-Chica y colaboradores [66], quienes observaron que su nanosensor colorimétrico basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpos anti-VPH 16 L1 también detectó la proteína VPH 18 L1, sin que ninguna otra proteína evaluada generara interferencia. Los autores atribuyen este comportamiento a la similitud estructural entre ambas proteínas L1. Para el desarrollo de un biosensor multiplexado capaz de detectar simultáneamente y de forma independiente VPH 16 y VPH 18, sería necesario el uso de anticuerpos con mayor especificidad epitópica que permitan una distinción más precisa entre ambos genotipos. Los resultados se presentan en la Figura 7.8.

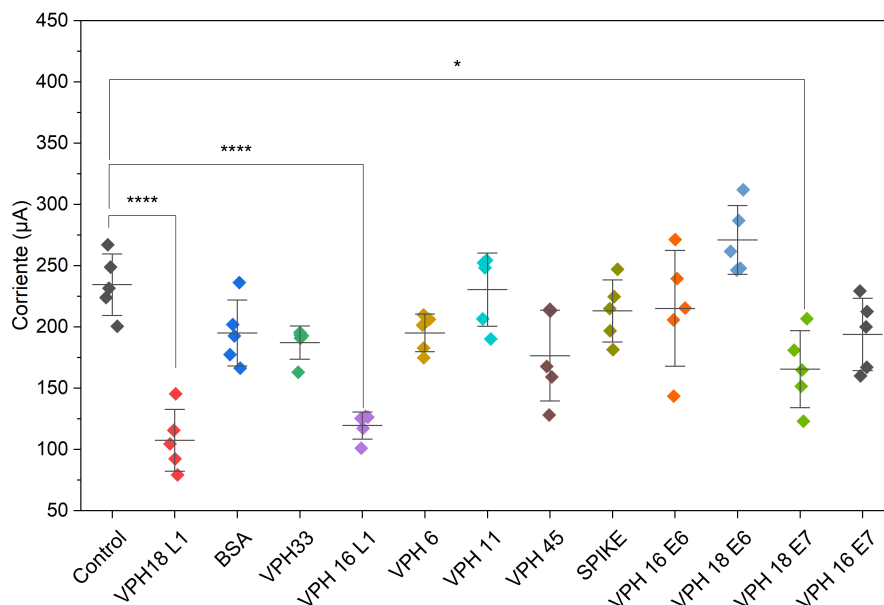


Figura 7.8: Evaluación de la selectividad del biosensor frente a trece analitos a 200 ng/mL. Los datos se expresan como media $\pm$ DE ($n = 5$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, comparando cada grupo frente al control (sin proteína VPH 18 L1). Se identificaron diferencias estadísticamente significativas únicamente para VPH 18 L1 ($p < 0.0001$, ****), VPH 16 L1 ($p < 0.0001$, ****) y VPH 18 E7 ($p = 0.0168$, *). Los demás grupos no presentaron diferencias significativas respecto al control.

7.3.2. Determinación de Linealidad

La linealidad del biosensor se evaluó en el rango de 6.25 a 200 ng/mL de VPH 18 L1. El biosensor exhibió una respuesta lineal en el rango evaluado ($p = 0,01382$), siguiendo la ecuación:

$$y = 150.25 - 0.255 \cdot x \quad (7.1)$$

donde y representa la corriente de pico (μA) y x la concentración de VPH 18 L1 (ng/mL). El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.90$) confirma la proporcionalidad inversa entre la señal y la cantidad de analito, validando el desempeño del sensor para la cuantificación de la proteína en el intervalo estudiado. Esta tendencia decreciente corrobora que el incremento en la concentración de proteína genera una restricción efectiva en la transferencia de carga en la superficie del electrodo, en concordancia con el mecanismo *signal-off* descrito previamente. Los resultados se presentan en la Figura 7.9.

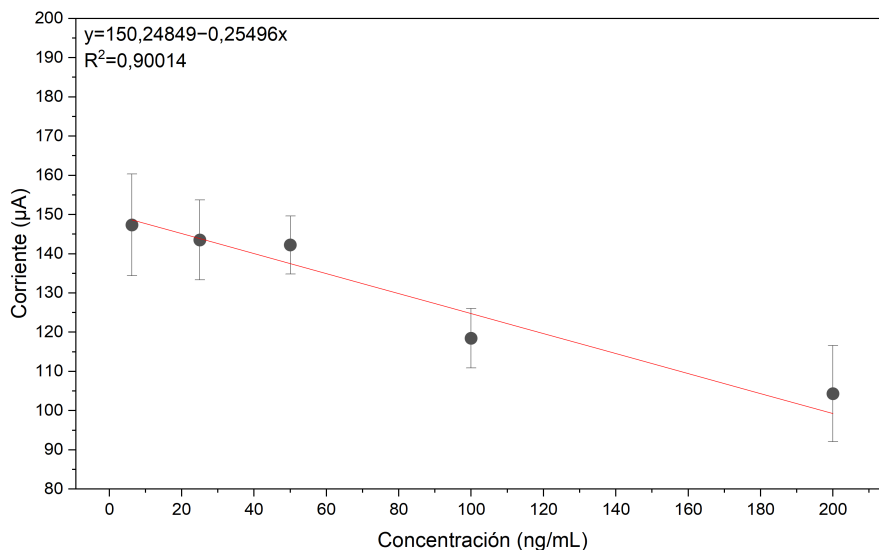


Figura 7.9: Curva de calibración del biosensor para VPH 18 L1. Los puntos representan la media de la corriente de pico medida por SWV (μA) frente a la concentración de proteína (ng/mL), con barras de error correspondientes al error estándar (SE) ($n = 5$). La línea roja indica el ajuste lineal ponderado ($R^2 = 0.90$).

7.3.3. Determinación de la sensibilidad analítica

Para el cálculo del límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se emplearon cinco mediciones del grupo blanco, que produjeron una corriente de pico promedio de $261.40 \pm 7.28 \mu\text{A}$, donde la desviación estándar ($\sigma = 7.28 \mu\text{A}$) fue utilizada como estimador de la variabilidad basal del sistema. La pendiente ($m = 8.363 \mu\text{A} \cdot \text{mL}/\text{ng}$) se obtuvo a partir de una curva de calibración construida con las concentraciones de 1.5, 3.1 y 6.25 ng/mL ($R^2 = 0.999$), y estos valores fueron aplicados en las expresiones 6.1 y 6.2 para establecer la concentración mínima detectable y cuantificable, obteniendo un LoD de 2.87 ng/mL y un LoQ de 8.71 ng/mL . En comparación con el nanosensor colorimétrico de Navarro-Chica y colaboradores [66], cuyo reporte fue de 180 ng/mL (LoD) y 540 ng/mL (LoQ), el biosensor basado en LIG mejora la sensibilidad analítica en aproximadamente 62 veces. Esta mejora se atribuye a las propiedades intrínsecas del grafeno como material transductor ya que su elevada área superficial específica aumenta la densidad de sitios de anclaje para los biorreceptores, mientras que sus excepcionales propiedades electrónicas derivadas del sistema π - π conjugado de átomos de carbono con hibridación sp^2 favorecen una transferencia de carga eficiente entre el analito y la superficie del electrodo, amplificando la señal electroquímica [220]. Los resultados de la curva empleada para este cálculo se presentan en la Figura 7.10.

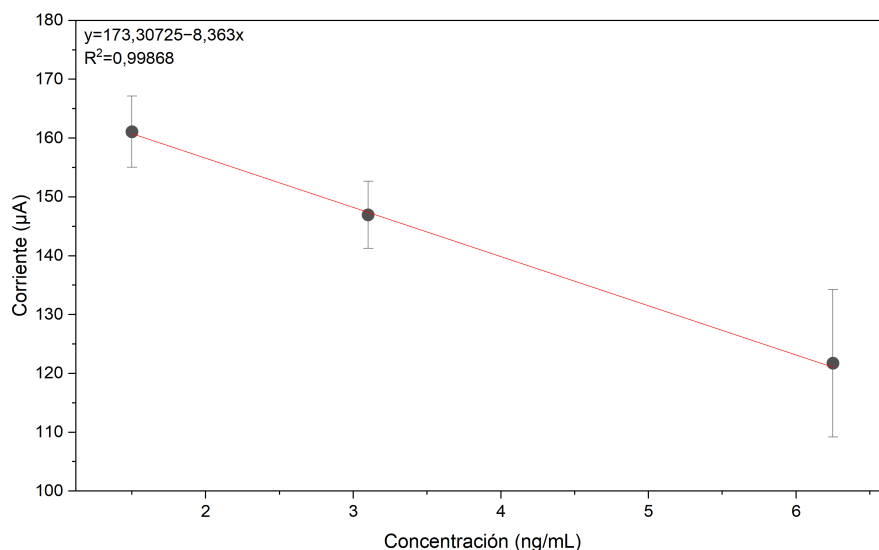


Figura 7.10: Curva de calibración del biosensor en el rango de concentraciones de 1.5, 3.1 y 6.25 ng/mL de VPH 18 L1, empleada para la determinación de los parámetros de sensibilidad analítica ($n = 5$ réplicas por punto). El ajuste lineal obtenido corresponde a $y = 173.08 - 8.363x$, con $R^2 = 0.999$.

7.3.4. Determinación de robustez

La robustez del biosensor se evaluó analizando el efecto de variaciones en el tiempo de incubación del anticuerpo sobre la respuesta electroquímica, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.4.5.6. Los tres tiempos evaluados (60, 90 y 120 min) produjeron una reducción estadísticamente significativa de la corriente de pico respecto al grupo control sin proteína ($p < 0.0001$ en cada caso), confirmando que el biosensor detecta la proteína VPH 18 L1 en todos los tiempos evaluados. Al comparar entre sí los tres grupos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$), lo que indica que variaciones en el tiempo de incubación del anticuerpo dentro de este rango no afectan de forma relevante la respuesta del sensor. Estos resultados demuestran que el biosensor es confiable frente a este parámetro de fabricación, y respaldan el tiempo de 90 minutos establecido en el protocolo de funcionalización como condición adecuada dentro de un rango operativo flexible. Los resultados se presentan en la Figura 7.11.

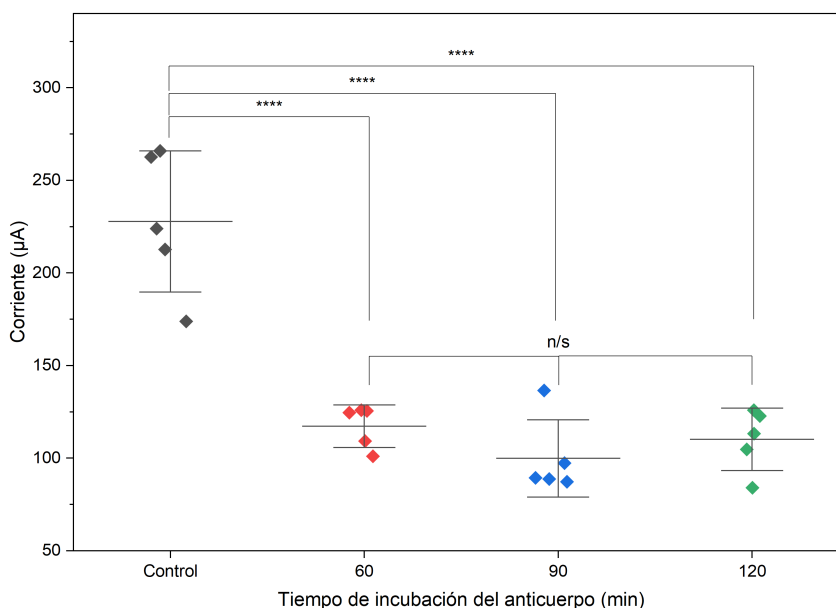


Figura 7.11: Evaluación del efecto del tiempo de incubación del anticuerpo (60, 90 y 120 min) sobre la señal de corriente del biosensor frente a VPH 18 L1 (200 ng/mL). Los datos se presentan como media $\pm$ DE ($n = 5$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. **** indica $p < 0.0001$ respecto al grupo control; n/s indica ausencia de diferencia estadísticamente significativa entre los tiempos de incubación evaluados ($p > 0.05$).

7.3.5. Prueba de concepto del sensor multiplexado

El sensor multiplexado final fue fabricado siguiendo el diseño descrito en la sección 6.4.1, integrando dos electrodos de trabajo funcionalizados de forma independiente con los anticuerpos Anti-VPH 16 L1 y Anti-VPH 18 L1 respectivamente. Para evaluar el desempeño del biosensor, se comparó la señal del grupo control sin proteína frente a cuatro grupos experimentales: VPH 16 L1 y VPH 18 L1 disueltas en PBS 1X, y VPH 16 L1 y VPH 18 L1 disueltas en orina artificial, todos a una concentración de 200 ng/mL. Los resultados muestran que todos los grupos experimentales presentaron una reducción estadísticamente significativa de la corriente de pico respecto al control, confirmando que el biosensor multiplexado es capaz de detectar simultáneamente las proteínas VPH 16 L1 y VPH 18 L1 tanto en PBS 1X como en orina artificial. La ausencia de diferencias significativas entre los grupos medidos en PBS 1X y los medidos en orina artificial (VPH 16 L1: $p = 0.452$; VPH 18 L1: $p = 0.636$) indica que los componentes de la matriz urinaria no interfieren con la capacidad de detección del sensor, lo cual representa un resultado relevante para su potencial aplicación clínica en muestras reales. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas entre el electrodo funcionalizado con Anti-VPH 16 L1 y el funcionalizado con Anti-VPH 18 L1, independientemente del medio de dilución (PBS 1X: $p = 0.977$; orina: $p = 0.999$), resultado que es consistente con la falta

de selectividad entre ambas variantes identificada en la sección de selectividad y que refuerza la necesidad de anticuerpos con mayor especificidad epitópica para lograr una detección verdaderamente diferenciada de cada genotipo. Los resultados se presentan en la Figura 7.12.

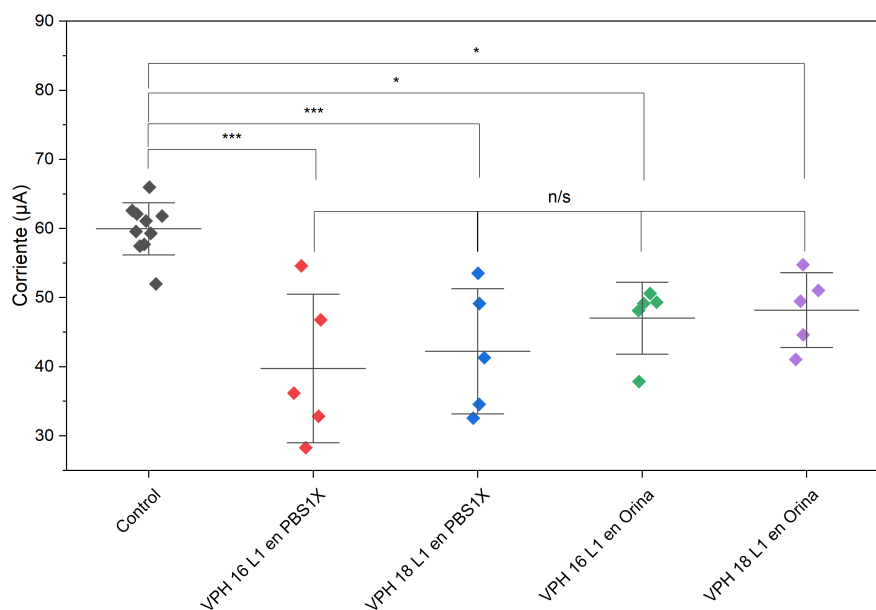


Figura 7.12: Comparación de la respuesta entre el grupo control y cuatro grupos experimentales correspondientes a las proteínas VPH 16 L1 y VPH 18 L1 (200 ng/mL) diluidas en PBS 1X y orina artificial. Los datos se presentan como media $\pm$ DE ($n = 5$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. Valores de p respecto al control: VPH 16 L1 en PBS 1X, $p = 1.03 \times 10^{-4}$ (***) ; VPH 18 L1 en PBS 1X, $p = 5.64 \times 10^{-4}$ (***) ; VPH 16 L1 en orina, $p = 0.014$ (*) ; VPH 18 L1 en orina, $p = 0.029$ (*). n/s indica ausencia de diferencia estadísticamente significativa entre los demás grupos comparados ($p > 0.05$).

Conclusiones

A través de la caracterización multimodal, se demostró que los diferentes tratamientos aplicados al LIG permiten ajustar selectivamente el grado de hidrofilicidad y la morfología microestructural de la red porosa. Esta capacidad de ajuste permite establecer condiciones para obtener sensores de diferente naturaleza dependiendo de la aplicación final. No obstante, el análisis de desempeño determinó que, para los requerimientos de este sensor en particular, el plasma no constituye la ruta de funcionalización óptima. Por ello, se seleccionó un enfoque de funcionalización dual (covalente e interacciones π - π). Este trabajo establece las bases para el diseño de interfaces a medida, subrayando la necesidad de resolver cómo integrar la funcionalización y detección exitosa en aquellos sensores con carácter hidrofílico.

Se pudo comprobar la efectividad del protocolo de funcionalización mixta basado en la adsorción física del ácido 1-pirenobutírico (1-PBA) seguida de acoplamiento covalente mediante EDC/NHS para la inmovilización de los anticuerpos Anti-VPH 16 L1 y Anti-VPH 18 L1 sobre la superficie del LIG. Este protocolo aprovecha el apilamiento π - π entre el núcleo aromático del 1-PBA y el plano basal del grafeno para el anclaje físico, y el enlace amida formado entre los grupos carboxilo activados y los grupos amino del anticuerpo para la unión covalente, garantizando una inmovilización estable y eficiente confirmada por la reducción estadísticamente significativa de la corriente de pico en presencia de la proteína objetivo ($p < 0.0001$).

Se logró obtener un prototipo de biosensor electroquímico basado en LIG para la detección de las proteínas VPH 16 L1 y VPH 18 L1, cuya validación analítica demostró un comportamiento lineal en el rango de 6.25 a 200 ng/mL ($R^2 = 0.90$), un LoD de 2.87 ng/mL y un LoQ de 8.71 ng/mL, representando una mejora de aproximadamente 62 veces en sensibilidad respecto al nanosensor colorimétrico previamente desarrollado [66]. El sensor demostró además robustez ante variaciones en el tiempo de incubación del anticuerpo entre 60 y 120 minutos. Se identificó una limitación en la selectividad entre las proteínas VPH 16 L1 y VPH 18 L1, atribuible a su elevada similitud estructural, lo que indica la necesidad de anticuerpos con mayor especificidad epitópica para lograr una detección verdaderamente diferenciada de cada genotipo.

La prueba de concepto del sensor multiplexado con dos electrodos de trabajo permitió demostrar la detección simultánea de las proteínas VPH 16 L1 y VPH 18 L1 tanto en PBS 1X como en orina artificial a 200 ng/mL, sin interferencia estadísticamente significativa de la matriz urinaria sobre la respuesta del sensor. Este resultado es especialmente relevante en el contexto de una aplicación clínica no invasiva, ya que la orina representa una muestra de fácil obtención frente a los métodos convencionales de detección de VPH como el Papanicolaou o la detección de ADN viral, que requieren personal especializado y equipamiento de laboratorio. La disponibilidad de un dispositivo portátil, sensible y de bajo costo para la detección de variantes de alto riesgo del VPH en

orina tiene el potencial de contribuir significativamente al diagnóstico temprano y la prevención del cáncer de cuello uterino, especialmente en poblaciones con acceso limitado a los sistemas de salud convencionales.

Trabajos futuros

Como continuación del trabajo desarrollado, se identifican las siguientes líneas de investigación para el prototipo de biosensor electroquímico basado en LIG.

En el marco de la validación analítica, quedó pendiente la determinación de la precisión y exactitud del biosensor por limitaciones de tiempo, parámetros necesarios para completar la validación analítica del sensor.

Una vez completada la validación, el paso siguiente consiste en evaluar el desempeño del biosensor en muestras de orina real provenientes de pacientes con y sin infección por VPH. No obstante, para establecer la aplicabilidad clínica real del dispositivo, es imperativo contar con un estudio concluyente sobre el rango de concentraciones del virus presentes en la orina. Este conocimiento permitirá determinar si la sensibilidad obtenida actualmente es suficiente para una detección diagnóstica fiable o si, por el contrario, es necesario implementar estrategias adicionales de amplificación de señal o modificaciones en el diseño para aumentar el límite de detección del sensor.

La limitación de selectividad identificada entre las proteínas VPH 16 L1 y VPH 18 L1 sugiere la necesidad de explorar anticuerpos u otras moléculas de bioreconocimiento como aptámeros con mayor especificidad epitópica dirigidos a regiones estructuralmente divergentes entre ambos genotipos, con el fin de lograr una detección diferenciada y simultánea de cada variante.

Finalmente, se recomienda explorar la integración del biosensor con plataformas de lectura portátiles y el desarrollo de un empaque que garantice su estabilidad durante el almacenamiento y transporte, aspectos clave para su escalamiento y aplicación en entornos de punto de atención clínica.

Bibliografía

- [1] American Cancer Society, “Anticuerpos monoclonales y sus efectos secundarios,” <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/inmunoterapia/anticuerpos-monoclonales.html>, 2023, consultado: 2025.
- [2] MedlinePlus, “Definición de antígeno,” <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002224.htm>, 2023, consultado: 2025.
- [3] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, and P. Estrela, “Introduction to biosensors,” *Essays in Biochemistry*, vol. 60, p. 1, 6 2016. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4986445/>
- [4] R. M. Califf, “Biomarker definitions and their applications,” *Experimental Biology and Medicine*, vol. 243, pp. 213–221, 2 2018. [Online]. Available: [/doi/pdf/10.1177/1535370217750088?download=true](https://doi.org/10.1177/1535370217750088?download=true)
- [5] ScienceDirect Topics, “Viral load – an overview,” <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/viral-load>, 2024, consultado: 2025.
- [6] Chemistry Job Insight, “Understanding calibration curves for accurate measurements,” <https://www.chemistryjobinsight.com/2025/03/all-about-calibration-curve.html>, 2025, consultado: 2025.
- [7] D. Crosby, S. Bhatia, K. M. Brindle, L. M. Coussens, C. Dive, M. Emberton, S. Esener, R. C. Fitzgerald, S. S. Gambhir, P. Kuhn, T. R. Rebbeck, and S. Balasubramanian, “Early detection of cancer,” *Science*, vol. 375, no. 6586, p. eaay9040, 2022.
- [8] I. H. Elrobaa, K. Khan, and E. Mohamed, “The role of point-of-care testing to improve acute care and health care services,” *Cureus*, vol. 16, p. e55315, 3 2024. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10905651/>
- [9] A. Samavati, Z. Samavati, M. Velashjerdi, A. F. Ismail, M. H. Othman, G. E. B, M. S. Abdullah, M. Bolurian, and M. Bolurian, “Sustainable and fast saliva-based covid-19 virus diagnosis kit using a novel go-decorated au/fbg sensor,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 420, 9 2021. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html>
- [10] Instituto Nacional del Cáncer, “Definición de epítipo - Diccionario de cáncer del NCI,” accedido el 14 de abril de 2026. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/epitopo>

- [11] A. Hadded, M. B. Ayed, and S. A. Alshaya, "High sensitivity and specificity in healthcare: Design and validation of a novel sinw-fet biosensor for viral detection," *IEEE Access*, vol. 12, pp. 112 308–112 319, 2024.
- [12] E. Demir, K. K. Kırboga, and M. Işık, "An overview of stability and lifetime of electrochemical biosensors," *Novel Nanostructured Materials for Electrochemical Bio-sensing Applications*, pp. 129–158, 1 2024. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/edited-volume/abs/pii/B9780443153341000225>
- [13] J. A. Dickinson, N. Pimlott, R. Grad, H. Singh, O. Szafran, B. J. Wilson, S. Groulx, G. Thériault, and N. R. Bell, "Screening: when things go wrong," *Canadian Family Physician*, vol. 64, no. 7, p. 502, 7 2018. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6042667/>
- [14] Nanowerk, "Graphene explained: A beginner's Guide to its Properties, Uses, and Potential," 2026, consultado el 14 de abril de 2026. [Online]. Available: https://www.nanowerk.com/what_is_graphene.php
- [15] AZoNano, "Graphene functionalization: Covalent Vs Non-Covalent," 2026, consultado el 14 de abril de 2026. [Online]. Available: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=6097>
- [16] V. Georgakilas, M. Otyepka, A. B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K. C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril, and K. S. Kim, "Functionalization of graphene: Covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications," *Chemical Reviews*, vol. 112, pp. 6156–6214, 11 2012.
- [17] S. J. Novick and J. D. Rozzell, "Immobilization of enzymes by covalent attachment," *Microbial Enzymes and Biotransformations*, pp. 247–271, 2005.
- [18] F. M. Vivaldi, A. Dallinger, A. Bonini, N. Poma, L. Sembranti, D. Biagini, P. Salvo, F. Greco, and F. D. Francesco, "Three-dimensional (3d) laser-induced graphene: Structure, properties, and application to chemical sensing," pp. 30 245–30 260, 7 2021.
- [19] T. Neumann and C. Olea-Gangas, "Cáncer cervicouterino y lesiones preinvasoras de cuello," Red Clínica Universidad de Chile, Informe técnico, 2026, consultado el 14 de abril de 2026. [Online]. Available: <https://www.redclinica.cl>
- [20] D. Harvey, "Detection Limits," LibreTexts Analytical Chemistry, 2026, consultado el 14 de abril de 2026. [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_\(Harvey\)/04%3A_Evaluating_Analytical_Data/4.07%3A_Detection_Limits](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey)/04%3A_Evaluating_Analytical_Data/4.07%3A_Detection_Limits)
- [21] D. A. Armbruster and T. Pry, "Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation," *The Clinical Biochemist Reviews*, vol. 29, no. Suppl 1, pp. S49–S52, 8 2008, consultado el 14 de abril de 2026. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2556583/>

- [22] International Council for Harmonisation, “ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures,” International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, Step 5 edition, 2024, effective date: 14 June 2024. [Online]. Available: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_1130.pdf
- [23] M. Javaid, A. Haleem, R. P. Singh, S. Rab, and R. Suman, “Exploring the potential of nanosensors: A brief overview,” *Sensors International*, vol. 2, p. 100130, 1 2021. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666351121000516>
- [24] Instituto Nacional del Cáncer, “Definición de neoplasia - Diccionario de cáncer del NCI,” 2026, consultado el 14 de abril de 2026. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/neoplasia>
- [25] IARC Screening Group, *Introducción a la neoplasia intraepitelial cervical (NIC)*. International Agency for Research on Cancer, 2026, ch. 2, manual técnico de tamizaje y diagnóstico. [Online]. Available: <https://screening.iarc.fr/doc/colpochapteres02.pdf>
- [26] National Human Genome Research Institute, “Oncogene,” 2026, series: Talking Glossary of Genetics. Consultado el 14 de abril de 2026. [Online]. Available: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Oncogene>
- [27] N. Sarigul, F. Korkmaz, and İlhan Kurultak, “A new artificial urine protocol to better imitate human urine,” *Scientific Reports*, vol. 9, 12 2019.
- [28] N. Marmiroli and E. Maestri, “Polymerase chain reaction (pcr),” *Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments*, pp. 147–187, 7 2025. [Online]. Available: <http://europepmc.org/books/NBK589663https://europepmc.org/article/NBK/nbk589663>
- [29] Explorable, “Reproducibilidad,” 2026, consultado el 14 de abril de 2026. [Online]. Available: <https://explorable.com/es/reproducibilidad>
- [30] A. Simonian, M. A. Arugula, and P. Bollella, “Biosensors characteristics: Definitions and concepts,” *Biosensors as Analytical Tools for the 21st Century*, pp. 17–23, 2025. [Online]. Available: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-032-01726-0_2
- [31] E. de Jesús Torregroza-Diazgranados, J. P. Torregroza-Castilla, E. de Jesús Torregroza-Diazgranados, and J. P. Torregroza-Castilla, “Pruebas diagnósticas de tamizaje,” *Revista Colombiana de Cirugía*, vol. 37, pp. 673–683, 9 2022. [Online]. Available: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-75822022000400673&lng=en&nrm=iso&tlng=eshttp://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2011-75822022000400673&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- [32] American Cancer Society, “La prueba de Papanicolaou,” 2026, consultado el 14 de abril de 2026. [Online]. Available: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-cuello-uterino>

- /deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/pruebas-de-deteccion/prueba-de-papanicolau.html
- [33] Cleveland Clinic, “Viruses: Definition, Types, Characteristics & Facts,” 2026, consultado el 14 de abril de 2026. [Online]. Available: <https://my.clevelandclinic.org/health/body/24861-virus>
- [34] M. E. Harden and K. Munger, “Human papillomavirus molecular biology,” *Mutation research*, vol. 772, p. 3, 4 2016. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5500221/>
- [35] SIB Swiss Institute of Bioinformatics, “Alphapolyomavirus,” ViralZone, 2024, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: https://viralzone.expasy.org/58.html?outline=all_by_species
- [36] J. V. Fernandes and T. A. A. de Medeiros Fernandes, “Human papillomavirus: Biology and pathogenesis,” *Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - A Clinical Perspective*, 1 2012.
- [37] B. Dehghani, Z. Hasanshahi, T. Hashempour, and M. Motamedifar, “The possible regions to design human papilloma viruses vaccine in iranian l1 protein,” *Biologia*, vol. 75, pp. 749–759, 5 2020. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.2478/s11756-019-00386-w>
- [38] X. Wang and W. Fu, “Hpv16 l1 pentamer in complex with fab f5-196,” 2 2025. [Online]. Available: https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00008yeh
- [39] Y. Modis, B. L. Trus, and S. C. Harrison, “Atomic model of the papillomavirus capsid,” *EMBO Journal*, vol. 21, pp. 4754–4762, 9 2002. [Online]. Available: [/doi/pdf/10.1093/emboj/cdf494?download=true](https://doi.org/10.1093/emboj/cdf494?download=true)
- [40] A. R. Ferreira, A. C. Ramalho, M. Marques, and D. Ribeiro, “The interplay between antiviral signalling and carcinogenesis in Human Papillomavirus infections,” *Cancers*, vol. 12, no. 3, p. 646, 2020, ferreira and Ramalho contributed equally to this work. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/cancers12030646>
- [41] Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, “La lucha contra el virus del papiloma humano,” *Punto Farmacológico*, no. 159, pp. 9–10, marzo 2022.
- [42] National Human Genome Research Institute, “Glosario parlante de términos genómicos y genéticos: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR),” NHGRI Digital Gallery, 2025, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-PCR>
- [43] Hologic, Inc., “Cervista™ HPV HR,” Especificaciones del fabricante, 2024, accedido: 6 de mayo de 2026. Información técnica sobre la prueba de ADN de alto riesgo. [Online]. Available: <https://www.hologic.com/>

- [44] D. de cáncer del NCI, “Definición de prueba de papanicolaou.” [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/prueba-de-papanicolaou>
- [45] D. Bhatia, S. Paul, T. Acharjee, and S. S. Ramachairy, “Biosensors and their widespread impact on human health,” *Sensors International*, vol. 5, p. 100257, 1 2024.
- [46] R. Zumpano, F. Polli, C. D’Agostino, R. Antiochia, G. Favero, and F. Mazzei, “Nanostructure-based electrochemical immunosensors as diagnostic tools,” *Electrochem 2021, Vol. 2, Pages 10-28*, vol. 2, pp. 10–28, 1 2021. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2673-3293/2/1/2/htmhttps://www.mdpi.com/2673-3293/2/1/2>
- [47] V. M. A. Aguilar and V. M. A. A. S. M. Aguirre, “Estudio de la respuesta de un biosensor mediante la simulación de interacciones proteína-proteína usando resonancia de plasmones superficiales,” 2022. [Online]. Available: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/16113>
- [48] M. Kowalski-Jahn, H. Schihada, A. Turku, T. Huber, T. P. Sakmar, and G. Schulte, “Frizzled bret sensors based on bioorthogonal labeling of unnatural amino acids reveal wnt-induced dynamics of the cysteine-rich domain,” *Science Advances*, vol. 7, p. 7917, 11 2021. [Online]. Available: [/doi/pdf/10.1126/sciadv.abj7917?download=true](https://doi/pdf/10.1126/sciadv.abj7917?download=true)
- [49] Q. Gui, T. Lawson, S. Shan, L. Yan, and Y. Liu, “The application of whole cell-based biosensors for use in environmental analysis and in medical diagnostics,” *Sensors 2017, Vol. 17, Page 1623*, vol. 17, p. 1623, 7 2017. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/1424-8220/17/7/1623/htmhttps://www.mdpi.com/1424-8220/17/7/1623>
- [50] Y. Zhao, K. Yavari, Y. Wang, K. Pi, P. V. Cappellen, and J. Liu, “Deployment of functional dna-based biosensors for environmental water analysis,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 153, p. 116639, 8 2022. [Online]. Available: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993622001224?casa_token=rz4UXq6bK-kAAAAA:NcAOBZoV7p o1OA8mP1cIfoSP_RH9sHd2-7pcCNzwE2skFuOYcuyDxTLBg3IMnXgLODlDjIUYnCPV
- [51] S. Damiani and B. Schuster, “Electrochemical biosensors based on s-layer proteins,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, 3 2020. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/340045142_Electrochemical_Biosensors_Based_on_S-Layer_Proteins
- [52] T. Org, “Defects are perfect in laser-induced graphene.” [Online]. Available: <https://www.technology.org/2014/12/10/defects-perfect-laser-induced-graphene/>
- [53] J. A. Mann and W. R. Dichtel, “Noncovalent functionalization of graphene by molecular and polymeric adsorbates,” pp. 2649–2657, 8 2013.
- [54] W. Liu and G. Speranza, “Functionalization of carbon nanomaterials for biomedical applications,” *C*, vol. 5, p. 72, 11 2019.

- [55] A. I. Toro-Montoya and L. J. Tapia-Vela, “Virus del papiloma humano (VPH) y cáncer,” *Medicina y Laboratorio*, vol. 25, no. 1, pp. 143–159, marzo 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.36384/01232576.431>
- [56] Organización Mundial de la Salud, *Estrategia mundial para acelerar la eliminación del cáncer del cuello uterino como problema de salud pública*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2022, licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [Online]. Available: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789240014107>
- [57] H. A. Alhadrami, “Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective,” *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 65, pp. 497–508, 5 2018.
- [58] S. M. Nair and X. T. Suryabai, “Sensing the Future—Frontiers in biosensors: Exploring classifications, principles, and recent advances,” *ACS Omega*, vol. 9, no. 50, pp. 48 918–48 987, 2024.
- [59] V. Georgakilas, M. Otyepka, A. B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K. C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril, and K. S. Kim, “Functionalization of graphene: Covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications,” *Chemical Reviews*, vol. 112, pp. 6156–6214, 11 2012.
- [60] AZoNano, “Graphene functionalization: Covalent vs non-covalent,” AZoNetwork - Nanotechnology News and Articles, 2022, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=6097>
- [61] ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer, “Colombia: Human papillomavirus and related cancers, fact sheet 2023,” Institut Català d’Oncologia / International Agency for Research on Cancer, Tech. Rep., 2023. [Online]. Available: https://hvpcentre.net/statistics/reports/COL_FS.pdf
- [62] S. Estrada, P. Sánchez, C. Arango, K. Salazar, and C. López, “Prevalencia del papiloma virus humano de alto riesgo en una población de mujeres y hombres que tienen sexo con hombres (HSH) VIH (+) atendidos en el laboratorio clínico VID medellín – colombia; durante los años 2020 a 2023,” *Infectio*, vol. 28, no. 2, 2024. [Online]. Available: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922024000200105
- [63] A. M. Beddoe, “Yes! to scaling up cervical cancer screening with self-collection: But the cost of HPV screening must be reduced,” *JCO Global Oncology*, 2021.
- [64] I. Zhetpisbayeva, F. Kassymbekova, S. Sarmuldayeva, Y. Semenova, and N. Glushkova, “Cervical cancer prevention in rural areas,” *Annals of Global Health*, 2023.
- [65] L. S. Sanabria, V. A. Laverde Cardona, Y. R. Pérez D, F. Abreu, M. L. Cicerchia, C. Cajelli, M. d. J. Inurreta Díaz, M. J. Vásquez Medina, K. A. Amador, and G. R. Ruiz Carillo, “Barriers in the prevention and early detection of human papillomavirus in Latin America,” *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2025.

- [66] C. E. Navarro Chica, L. L. Alfonso Tobón, J. J. López Abella, M. P. Valencia Piedrahita, D. Neira Acevedo, P. C. Bermúdez, M. Arrivillaga, and A. Jaramillo-Botero, “Nanoparticle-based colorimetric assays for early and rapid screening of the oncogenic HPV variants 16 and 18,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 568, p. 120144, 2 2025. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898125000233>
- [67] World Health Organization, “Cervical cancer,” 2024, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>
- [68] D. B. Vale, J. C. Teixeira, J. F. Bragança, S. Derchain, L. O. Sarian, and L. C. Zeferino, “Elimination of cervical cancer in low- and middle-income countries: Inequality of access and fragile healthcare systems,” *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, vol. 152, pp. 7–11, 10 2020.
- [69] J. Ferlay, M. Ervik, L. F. M. Laversanne, M. Colombet, L. Mery, M. Piñeros, A. Znaor, S. i, and F. Bray, “Global cancer observatory: Cancer today.” 2024. [Online]. Available: <https://gco.iarc.who.int/today>
- [70] American Cancer Society, “Types of HPV,” 2024, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/risk-prevention/hpv/types-of-hpv.html>
- [71] Ministerio de Salud y Protección Social, “Cáncer de cuello uterino,” 2023, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/ssr/Paginas/Cancer-de-cuello-uterino.aspx>
- [72] A. K. Grabowska and A. B. Riemer, “The invisible enemy – how Human Papillomaviruses avoid recognition and clearance by the host immune system,” *The Open Virology Journal*, vol. 6, no. 1, pp. 249–256, enero 2012. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3547646/>
- [73] P. Karimi, S. M. R. Hosseini, Z. S. M. Hiagh, S. Aboulhassanzadeh, N. Asghari, and H. Aghazadeh, “Exploring the intricacies of cervical intraepithelial neoplasia and its connection with hpv: A narrative review,” *Iranian Journal of Public Health*, vol. 53, p. 2671, 12 2024. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11693788/http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC11693788>
- [74] L. R. Godoy, J. C. Possati-Resende, Y. M. Guimarães, P. G. Pedrão, R. D. Reis, and A. Longatto-Filho, “Implementation of hpv tests in latin america: What we learned; what should we have learned, and what can we do better?” *Cancers 2022, Vol. 14, Page 2612*, vol. 14, p. 2612, 5 2022. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/11/2612/htmhttps://www.mdpi.com/2072-6694/14/11/2612>
- [75] O. Fashedemi, O. C. Ozoemena, S. Peteni, A. B. Haruna, L. J. Shai, A. Chen, F. Rawson, M. E. Cruickshank, D. Grant, O. Ola, and K. I. Ozoemena, “Advances in human papillomavirus detection for cervical cancer screening and diagnosis: challenges of conventional methods

- and opportunities for emergent tools,” *Analytical Methods*, vol. 17, pp. 1428–1450, 2 2025. [Online]. Available: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2025/ay/d4ay01921khttps://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2025/ay/d4ay01921k>
- [76] M. Peñaranda Rodríguez, “Factores socioculturales relacionados con el acceso al tamizaje de cáncer de cuello uterino en la comunidad Wayuu, Municipio de Riohacha - 2015,” Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Manizales, Manizales, Colombia, 2021.
- [77] L. Torres Viana, “Morbimortalidad asociada a derivación percutánea de la vía urinaria en pacientes con obstrucción ureteral maligna secundaria a cáncer de cuello uterino en el Instituto Nacional de Cancerología,” Tesis de Especialidad, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 2017.
- [78] National Library of Medicine, “Cáncer de cuello uterino,” 2024, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://medlineplus.gov/spanish/cervicalcancer.html>
- [79] Z. Cogollo, I. Castillo, B. Torres, L. Sierra, E. Ramos, and M. Ramos, “Conocimientos, actitudes y prácticas de mujeres entre 18 y 49 años frente a la citología cérvicouterina en instituciones de salud pública de cartagena (colombia),” *Salud Uninorte*, vol. 26, pp. 223–231, 2010. [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81719006005>
- [80] E. Rasouli, W. J. Basirun, M. R. Johan, M. Rezayi, M. R. Mahmoudian, and D. P. Poenar, “Electrochemical dna-nano biosensor for the detection of cervical cancer-causing hpv-16 using ultrasmall fe₃o₄-au core-shell nanoparticles,” *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 40, p. 100562, 6 2023. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214180423000144>
- [81] F. Cui, Z. Zhou, and H. S. Zhou, “Review—measurement and analysis of cancer biomarkers based on electrochemical biosensors,” *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 167, p. 037525, 1 2020. [Online]. Available: <https://iopscience.iop.org/article/10.1149/2.0252003JES>
[Shttps://iopscience.iop.org/article/10.1149/2.0252003JES/meta](https://iopscience.iop.org/article/10.1149/2.0252003JES/meta)
- [82] K. Mahato, A. Kumar, P. K. Maurya, and P. Chandra, “Shifting paradigm of cancer diagnoses in clinically relevant samples based on miniaturized electrochemical nanobiosensors and microfluidic devices,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 100, pp. 411–428, 2 2018.
- [83] J. Lin, Z. Peng, Y. Liu, F. Ruiz-Zepeda, R. Ye, E. L. Samuel, M. J. Yacaman, B. I. Yakobson, and J. M. Tour, “Laser-induced porous graphene films from commercial polymers,” *Nature Communications* 2014 5:1, vol. 5, pp. 1–8, 12 2014. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/ncomms6714>
- [84] S. Pankaj, A. Kumari, S. Kumari, V. Choudhary, J. Kumari, A. Kumari, and S. Nazneen, “Evaluation of sensitivity and specificity of pap smear, lbc and hpv in screening of cervical cancer,” *Indian Journal of Gynecologic Oncology*, vol. 16, pp. 1–5, 9 2018. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40944-018-0221-x>

- [85] I. A. Frías, K. Y. Avelino, R. R. Silva, C. A. Andrade, and M. D. Oliveira, "Trends in biosensors for hpv: Identification and diagnosis," *Journal of Sensors*, vol. 2015, p. 913640, 1 2015. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2015/913640><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1155/2015/913640><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2015/913640>
- [86] H. Madrigal Rodríguez, "Grafeno: Propiedades y aplicaciones en ingeniería," Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Valladolid, Valladolid, España, septiembre 2024.
- [87] P. Y. Y. Prado, D. Veitía, M. C. Ferreiro, Z. D. Guglielmo, M. Ávila, A. Fernandes, and M. Correnti, "Comparación de la detección y tipificación del virus del papiloma humano en muestras citológicas y de orina en pacientes del sexo femenino." *Investigación Clínica versión impresa ISSN 0535-5133*, 2017. [Online]. Available: https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0535-51332017000200002&script=sci_abstract&tlng=pt
- [88] L. Bran-Piedrahita, A. Valencia-Arias, L. Palacios-Moya, S. Gómez-Molina, Y. Acevedo-Correa, C. Arias-Arciniegas, L. Bran-Piedrahita, A. Valencia-Arias, L. Palacios-Moya, S. Gómez-Molina, Y. Acevedo-Correa, and C. Arias-Arciniegas, "Barreras de acceso del sistema de salud colombiano en zonas rurales: percepciones de usuarios del régimen subsidiado," *Hacia la Promoción de la Salud*, vol. 25, pp. 29–38, 7 2020. [Online]. Available: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-75772020000200029&lng=en&nrm=iso&tlng=eshttp://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-75772020000200029&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- [89] M. Ricaurte-Cepeda, Y. P. Guerrero-Luna, M. Ricaurte-Cepeda, and Y. P. Guerrero-Luna, "Salud materna de mujeres indígenas. experiencias tradicionales e institucionales," *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, vol. 42, p. 2024, 2024. [Online]. Available: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-386X2024000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=eshttp://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-386X2024000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- [90] United Nations, "State of the world's indigenous peoples: Indigenous peoples' access to health services," United Nations, New York, NY, Report, febrero 2016. [Online]. Available: <https://www.un-ilibrary.org/content/books/9789210575553>
- [91] H. U. Bernard, R. D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen, and E. M. de Villiers, "Classification of papillomaviruses (pvs) based on 189 pv types and proposal of taxonomic amendments," *Virology*, vol. 401, pp. 70–79, 5 2010.
- [92] M. Stanley, "Hpv - immune response to infection and vaccination," *Infectious Agents and Cancer*, vol. 5, pp. 1–6, 10 2010. [Online]. Available: <https://infectagentscancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-9378-5-19>
- [93] J. Doorbar, W. Quint, L. Banks, I. G. Bravo, M. Stoler, T. R. Broker, and M. A. Stanley, "The biology and life-cycle of human papillomaviruses," *Vaccine*, vol. 30, pp. F55–F70, 11 2012.

- [94] D. Martinez-Zapien, F. X. Ruiz, J. Poirson, A. Mitschler, J. Ramirez, A. Forster, A. Cousido-Siah, M. Masson, S. V. Pol, A. Podjarny, G. Travé, and K. Zanier, "Structure of the e6/e6ap/p53 complex required for hpv-mediated degradation of p53," *Nature*, vol. 529, pp. 541–545, 1 2016. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nature16481>
- [95] S. W. Strickland, N. Brimer, C. Lyons, and S. B. V. Pol, "Human papillomavirus e6 interaction with cellular pdz domain proteins modulates yap nuclear localization," *Virology*, vol. 516, pp. 127–138, 3 2018. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682218300035?via%3Dihub>
- [96] S. Bera and D. Loeffler, "Cell polarity: cell type-specific regulators, common pathways, and polarized vesicle transport," *Leukemia* 2025, pp. 1–13, 4 2025. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41375-025-02601-x>
- [97] M. C. Montoya, D. Sancho, M. Vicente-Manzanares, and F. Sánchez-Madrid, "Cell adhesion and polarity during immune interactions," *Immunological Reviews*, vol. 186, pp. 68–82, 8 2002. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12234363/>
- [98] T. Veldman, I. Horikawa, J. C. Barrett, and R. Schlegel, "Transcriptional activation of the telomerase htert gene by human papillomavirus type 16 e6 oncoprotein," *Journal of Virology*, vol. 75, pp. 4467–4472, 5 2001. [Online]. Available: </doi/pdf/10.1128/jvi.75.9.4467-4472.2001?download=true>
- [99] O. Basukala and L. Banks, "The not-so-good, the bad and the ugly: Hpv e5, e6 and e7 oncoproteins in the orchestration of carcinogenesis," *Viruses*, vol. 13, p. 1892, 10 2021. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8541208/>
- [100] I. Gbala, N. Kavcic, and L. Banks, "The retinoblastoma protein contributes to maintaining the stability of hpv e7 in cervical cancer cells," *Journal of Virology*, vol. 99, 4 2025. [Online]. Available: </doi/pdf/10.1128/jvi.02203-24?download=true>
- [101] C. A. Moody and L. A. Laimins, "Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation," *Nature Reviews Cancer* 2010 10:8, vol. 10, pp. 550–560, 7 2010. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nrc2886>
- [102] J. Chen, D. Wang, Z. Wang, K. Wu, S. Wei, X. Chi, C. Qian, Y. Xu, L. Zhou, Y. Li, S. Zhang, T. Li, Z. Kong, Y. Wang, Q. Zheng, H. Yu, Q. Zhao, J. Zhang, N. Xia, S. Li, and Y. Gu, "Critical residues involved in the coassembly of l1 and l2 capsid proteins of human papillomavirus 16," *Journal of Virology*, vol. 97, 3 2023.
- [103] S. DiGiuseppe, M. Bienkowska-Haba, L. G. M. Guion, T. R. Keiffer, and M. Sapp, "Human papillomavirus major capsid protein l1 remains associated with the incoming viral genome throughout the entry process," *Journal of Virology*, vol. 91, pp. 537–554, 8 2017. [Online]. Available: </doi/pdf/10.1128/jvi.00537-17?download=true>

- [104] C. A. Horvath, G. A. Boulet, V. M. Renoux, P. O. Delvenne, and J. P. J. Bogers, "Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview," *Virology Journal*, vol. 7, p. 11, 2010. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2823669/>
- [105] J. W. Wang and R. B. Roden, "L2, the minor capsid protein of papillomavirus," *Virology*, vol. 445, pp. 175–186, 10 2013. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682213002262>
- [106] J. Guan, S. M. Bywaters, S. A. Brendle, H. Lee, R. E. Ashley, A. M. Makhov, J. F. Conway, N. D. Christensen, and S. Hafenstein, "Structural comparison of four different antibodies interacting with human papillomavirus 16 and mechanisms of neutralization," *Virology*, vol. 483, pp. 253–263, 9 2015. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682215002275>
- [107] A. Godi, D. Boampong, B. Elegunde, K. Panwar, M. Fleury, S. Li, Q. Zhao, N. Xia, N. D. Christensen, and S. Beddows, "Comprehensive assessment of the antigenic impact of human papillomavirus lineage variation on recognition by neutralizing monoclonal antibodies raised against lineage a major capsid proteins of vaccine-related genotypes," *Journal of Virology*, vol. 94, 11 2020. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.01236-20>
- [108] Z. Wang, D. Wang, J. Chen, F. Gao, Y. Jiang, C. Yang, C. Qian, X. Chi, S. Zhang, Y. Xu, Y. Lu, J. Shen, C. Zhang, J. Li, L. Zhou, T. Li, Q. Zheng, H. Yu, S. Li, N. Xia, and Y. Gu, "Rational design of a cross-type hpv vaccine through immunodominance shift guided by a cross-neutralizing antibody," *Science Bulletin*, vol. 69, pp. 512–525, 2 2024.
- [109] A. Wang, Y. Zhou, Y. Chen, J. Zhou, X. You, H. Liu, Y. Liu, P. Ding, Y. Qi, C. Liang, X. Zhu, Y. Zhang, E. Liu, and G. Zhang, "Electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of human papillomaviruse type 16 l1 protein based on ag@aunps-go/spa," *Analytical Biochemistry*, vol. 660, p. 114953, 1 2023.
- [110] C. B. Buck, P. M. Day, and B. L. Trus, "The papillomavirus major capsid protein l1," *Virology*, vol. 445, pp. 169–174, 10 2013.
- [111] G. Cardone, A. L. Moyer, N. Cheng, C. D. Thompson, I. Dvoretzky, D. R. Lowy, J. T. Schiller, A. C. Steven, C. B. Buck, and B. L. Trus, "Maturation of the human papillomavirus 16 capsid," *mBio*, vol. 5, pp. 1–11, 2014. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.01104-14>
- [112] B. Bishop, J. Dasgupta, and X. S. Chen, "Structure-based engineering of papillomavirus major capsid l1: Controlling particle assembly," *Virology Journal*, vol. 4, pp. 1–6, 1 2007. [Online]. Available: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-4-3>
- [113] L. S. Brito, M. Tutores, D. Karen, M. Domínguez, L. Yunier, and S. Rivero, "Obtención de las proteínas l1 del virus del papiloma humano de los tipos 16 y 18 a partir de muestras clínicas cubanas, en e. coli shuffle ® c3026."

- [114] D. D. la Fuente-Villarreal, S. Guzmán-López, O. Barboza-Quintana, and R. A. González-Ramírez, “Biología del virus del papiloma humano y técnicas de diagnóstico,” *Medicina Universitaria*, vol. 12, pp. 231–238, 10 2010. [Online]. Available: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-universitaria-304-articulo-biologia-del-virus-del-papiloma-X1665579610901659><http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-universitaria-304-articulo-biologia-del-virus-del-papiloma-X1665579610901659>
- [115] F. Di Spirito, “Human papillomavirus: Oral lesions and vaccination,” *Cancers*, vol. 15, no. 10, p. 2711, 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10216653/>
- [116] D. H. López Tobad, “Frecuencia de casos positivos a Virus del Papiloma Humano (VPH) diagnosticados por el método de biología molecular, en pacientes de sexo femenino en unidad de salud San Antonio Abad realizado en el mes de julio de 2023,” Tesis de Grado, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, agosto 2023.
- [117] D. Nica-Badea, V. I. Mihaela, M. G. F. Răzvan, and T. C. T. Stefanita, “Oncogenic potential of persistent infection with human papillomavirus,” *Pharmacophore*, vol. 15, pp. 57–64, 4 2024. [Online]. Available: <https://pharmacophorejournal.com/article/oncogenic-potential-of-persistent-infection-with-human-papillomavirus-qlsjlkw5vn9cfd?html><https://pharmacophorejournal.com/article/oncogenic-potential-of-persistent-infection-with-human-papillomavirus-qlsjlkw5vn9cfd>
- [118] V. Mello and R. K. Sundstrom, “Cervical intraepithelial neoplasia,” *StatPearls*, 8 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544371/>
- [119] Centers for Disease Control and Prevention, “Cancers linked with HPV each year,” CDC Official Website, 2024, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/cancer/hpv/cases.html>
- [120] R. Blanco and J. P. Muñoz, “Hpv and hcmv in cervical cancer: A review of their co-occurrence in premalignant and malignant lesions,” *Viruses* 2024, Vol. 16, Page 1699, vol. 16, p. 1699, 10 2024. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/1999-4915/16/11/1699/html><https://www.mdpi.com/1999-4915/16/11/1699>
- [121] S. L. Frazia, S. Pauciullo, V. Zulian, and A. R. Garbuglia, “Viral oncogenesis: Synergistic role of genome integration and persistence,” *Viruses* 2024, Vol. 16, Page 1965, vol. 16, p. 1965, 12 2024. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/1999-4915/16/12/1965/html><https://www.mdpi.com/1999-4915/16/12/1965>
- [122] E. C. Cozma, L. M. Banciu, A. M. Celarel, E. Soare, B. S. Srichawla, V. Kipkorir, and M. A. Găman, “Molecular mechanisms of human papilloma virus related skin cancers: A review,” *Medicine (United States)*, vol. 103, p. E38202, 5 2024. [Online]. Available: https://journals.lww.com/md-journal/fulltext/2024/05240/molecular_mechanisms_of_human_papilloma_virus.6.aspx

- [123] Hospital San Vicente Fundación, “Tamización para cáncer de mama. ¿quién, cómo y cuándo?” Blog para profesionales de la salud, 2024, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.sanvicentefundacion.com/blog/para-profesionales-de-la-salud/tamizacion-para-cancer-de-mama-quien-como-y-cuando>
- [124] Universidad del Cauca, “Detección temprana de cáncer de cuello uterino,” Unidad de Salud - Unisalud, Popayán, Colombia, Guía de Práctica Clínica, 2021. [Online]. Available: https://unisalud.unicauca.edu.co/unisalud/sites/default/files/deteccion_temprana_de_cancer_de_cuello_uterino.pdf
- [125] Medcover Hospitals, “Infección por VPH: tipos, síntomas, causas, vacunas y tratamiento,” 2024, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.medcoverhospitals.in/es/woman-and-child/diseases/human-papillomavirus-infection>
- [126] S. Arrossi, L. Thouyaret, and L. Paul, *Prevención del cáncer cervicouterino: recomendaciones para el tamizaje, seguimiento y tratamiento de mujeres en el marco de programas de tamizaje basados en el test de VPH: actualización 2015*. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud de la Nación, 2015.
- [127] G. Koliopoulos, V. N. Nyaga, N. Santesso, A. Bryant, P. P. Martin-Hirsch, R. A. Mustafa, H. Schünemann, E. Paraskevidis, and M. Arbyn, “Cytology versus hpv testing for cervical cancer screening in the general population,” *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2017, 8 2017. [Online]. Available: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD008587.pub2/fullhttps://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD008587.pub2/abstract>
- [128] C. Dehlendorff, L. Baandrup, and S. K. Kjaer, “Real-world effectiveness of human papillomavirus vaccination against vulvovaginal high-grade precancerous lesions and cancers,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 113, pp. 869–874, 7 2021. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/germenes-infectiosos/hoja-informativa-vacuna-vph>
- [129] S. de Sanjosé and R. Ibáñez, “Epidemiología del cáncer cervical,” *Revisiones en Cancer*, vol. 38, pp. 179–186, 7 2024.
- [130] A. Monie, C. F. Hung, R. Roden, and T. C. Wu, “Cervarix™: a vaccine for the prevention of hpv 16, 18-associated cervical cancer,” *Biologics : Targets Therapy*, vol. 2, p. 107, 2008. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2727782/>
- [131] M. Pino, “Guía: Prevención secundaria del cáncer de cuello del útero, 2022. conducta clínica ante resultados anormales de las pruebas de cribado,” Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC), Guía Clínica, 2022. [Online]. Available: <https://www.aepcc.org/>

- [132] A. R. Mogrovejo, A. L. Rivas, and J. A. V. Cruz, *Virus del Papiloma Humano (VPH)*. Puerto Madero EDITORIAL, 5 2024.
- [133] World Health Organization, *Essentials for cervical cancer prevention and control programmes - Comprehensive Cervical Cancer Control*. National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2014, bookshelf ID: NBK269608. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK269608/>
- [134] Organización Panamericana de la Salud and Organización Mundial de la Salud, “Nota de orientación de la OPS/OMS: Prevención y control integrales del cáncer cervicouterino: un futuro más saludable para niñas y mujeres,” OPS/OMS, Washington, D.C., Nota de orientación, 2013.
- [135] National Cancer Institute, “Definición de biomarcador,” Diccionario de cáncer del NCI, 2024, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/biomarcador>
- [136] K. Likhitha, K. N. Kumar, D. G. Bindhu, M. S. Charani, N. D. Priya, and Y. Gowthami, “Molecular and potential biomarkers in diagnosis of cervical carcinoma: A review,” *Asian Pacific Journal of Environment and Cancer*, vol. 7, pp. 113–117, 5 2024. [Online]. Available: <https://waocp.com/journal/index.php/apjec/article/view/1413>
- [137] N. Khehra, I. S. Padda, and C. J. Swift, “Polymerase chain reaction (pcr),” *StatPearls*, 3 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- [138] L. Garibyan and N. Avashia, “Polymerase chain reaction,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 133, pp. 1–4, 3 2013. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X1536139X>
- [139] International Agency for Research on Cancer, “Uso de pruebas de VPH para el tamizaje del cáncer cervicouterino y el manejo de mujeres VPH positivas: una guía práctica en línea,” IARC Screening Group, 2024, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://screening.iarc.fr/atlasHPVesdetail.php?Index=032>
- [140] L. V. Nam, H. X. Son, L. V. N. Bang, and L. V. Duyet, “Hpv prevalence and genotype distribution among vietnamese cervical cancer patients in the northern region of vietnam, from 2018 – 2020,” *Journal of Clinical Virology Plus*, vol. 4, p. 100182, 6 2024. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667038024000073>
- [141] H. Ltd., “Cervista hpv hr.”
- [142] M. H. Einstein, M. G. Martens, F. A. Garcia, D. G. Ferris, A. L. Mitchell, S. P. Day, and M. C. Olson, “Clinical validation of the cervista® hpv hr and 16/18 genotyping tests for use in women with asc-us cytology,” *Gynecologic Oncology*, vol. 118, pp. 116–122, 8 2010. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090825810003239>

- [143] S. P. Day, A. Hudson, A. Mast, T. Sander, M. Curtis, S. Olson, L. A. Chehak, N. Quigley, J. Ledford, B. Yen-Lieberman, D. Kohn, D. I. Quigley, and M. Olson, "Analytical performance of the investigational use only cervista™ hpv hr test as determined by a multi-center study," *Journal of Clinical Virology*, vol. 45, pp. S63–S72, 7 2009. [Online]. Available: https://www.academia.edu/47969321/Analytical_performance_of_the_Investigational_Use_Only_Cervista_HPVR_test_as_determined_by_a_multi_center_study
- [144] K. Tao, J. Yang, H. Yang, Z. H. Guo, Y. M. Hu, Z. Y. Tan, F. Zhang, and J. L. Duan, "Comparative study of the cervista and hybrid capture 2 methods in detecting high-risk human papillomavirus in cervical lesions," *Diagnostic Cytopathology*, vol. 42, pp. 213–217, 3 2014.
- [145] C. L. Peyton, M. Schiffman, A. T. Lörincz, W. C. Hunt, I. Powers, S. D. Abbate, C. Edmunds, and C. M. Wheeler, "Restricted cross-reactivity of Hybrid Capture 2 with nononcogenic Human Papillomavirus types," *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 11, no. 11, pp. 1394–1399, 2002, american Association for Cancer Research. [Online]. Available: <https://aacrjournals.org/cebp/article/11/11/1394/166650/>
- [146] J. S. Gibson, "Nucleic acid-based assays for the detection of high-risk Human Papillomavirus: A technical review," *Cancer Cytopathology*, vol. 122, no. 11, pp. 781–791, 2014. [Online]. Available: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncy.21451>
- [147] G. Boehmer, L. Wang, A. Iftner, B. Holz, J. Haedicke, R. von Wasielewski, P. Martus, and T. Iftner, "A population-based observational study comparing cervista and hybrid capture 2 methods: Improved relative specificity of the cervista assay by increasing its cut-off," *BMC Infectious Diseases*, vol. 14, pp. 1–9, 12 2014. [Online]. Available: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-014-0674-1>
- [148] J. Haedicke and T. Iftner, "A review of the clinical performance of the Aptima HPV assay," *Journal of Clinical Virology*, vol. 76, pp. S40–S48, 3 2016.
- [149] H. Ltd., "Aptima ® hpv designed with your patients and your practice in mind," 2013.
- [150] D. A. Cook, L. W. Smith, J. Law, W. Mei, D. J. van Niekerk, K. Ceballos, L. Gondara, E. L. Franco, A. J. Coldman, G. S. Ogilvie, D. Jang, M. Chernesky, and M. Krajden, "Aptima hpv assay versus hybrid capture® 2 hpv test for primary cervical cancer screening in the hpv focal trial," *Journal of Clinical Virology*, vol. 87, pp. 23–29, 2 2017. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653216306175>
- [151] Adeslas, "Citología."
- [152] S. J. Curry, A. H. Krist, D. K. Owens, M. J. Barry, A. B. Caughey, K. W. Davidson, C. A. Doubeni, J. W. Epling, A. R. Kemper, M. Kubik, C. S. Landefeld, C. M. Mangione, M. G. Phipps, M. Silverstein, M. A. Simon, C. W. Tseng, and J. B. Wong, "Screening for cervical cancer us preventive services task force recommendation statement," *JAMA - Journal of the American Medical Association*, vol. 320, pp. 674–686, 8 2018.

- [153] A. C. médicos para el cuidado de la mujer, “¿cada cuánto tiempo hay que hacerse una citología?” [Online]. Available: <https://www.agrupacionginecologica.es/ginecologia/citologia-a-que-es-y-cada-cuanto-hacerse-la-prueba/>
- [154] International Agency for Research on Cancer, “Atlas de inspección visual con ácido acético del cuello uterino: detectar, clasificar y determinar la elegibilidad de las lesiones precancerosas para el tratamiento ablativo,” IARC Screening Group, 2024, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://screening.iarc.fr/atlasviaesdetail.php?Index=1&e=>
- [155] S. Wang, L. Dang, S. Liu, R. Rezhake, H. Yan, X. Duan, L. Zhang, L. Zhang, L. Zhang, M. Su, F. Guo, C. Yan, M. Liu, X. Cao, M. Sun, Y. Qiao, and F. Zhao, “Cervical cancer screening via visual inspection with acetic acid and lugol iodine for triage of hpv-positive women,” *JAMA Network Open*, vol. 7, pp. e244 090–e244 090, 3 2024. [Online]. Available: <https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2816960>
- [156] ecancer, “Hay 3 pruebas para detectar el cáncer de cuello uterino,” ecancer News, marzo 2015, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://ecancer.org/es/news/7032-hay-3-pruebas-para-detectar-el-cancer-de-cuello-uterino>
- [157] P. Leonard, S. Hearty, J. Brennan, L. Dunne, J. Quinn, T. Chakraborty, and R. O’Kennedy, “Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 32, pp. 3–13, 1 2003.
- [158] F. T. Cavalcante, I. R. Italo, J. E. José, T. G. Rocha, I. G. de Sousa, A. L. Cavalcante, A. L. de Oliveira, M. C. de Sousa, and J. C. dos Santos, “Designing of nanomaterials-based enzymatic biosensors: Synthesis, properties, and applications,” *Electrochem 2021, Vol. 2, Pages 149-184*, vol. 2, pp. 149–184, 3 2021. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2673-3293/2/1/12/htmlhttps://www.mdpi.com/2673-3293/2/1/12>
- [159] A. Haleem, M. Javaid, R. P. Singh, R. Suman, and S. Rab, “Biosensors applications in medical field: A brief review,” *Sensors International*, vol. 2, p. 100100, 1 2021.
- [160] K. Baryeh, S. Takalkar, M. Lund, and G. Liu, *Introduction to medical biosensors for point of care applications*. Elsevier Inc., 2017, pp. 3–25.
- [161] S. Harshavardhan, S. E. Rajadas, K. K. Vijayakumar, W. A. Durai, A. Ramu, and R. Mariappan, “Electrochemical immunosensors: Working principle, types, scope, applications, and future prospects,” in *Bioelectrochemical Interface Engineering*, R. N. Krishnaraj and K. S. Rajesh, Eds. Wiley-Blackwell, septiembre 2019, ch. 18, pp. 357–375. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119611103.ch18>
- [162] F. S. Felix and L. Angnes, “Electrochemical immunosensors – a powerful tool for analytical applications,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 102, pp. 470–478, 4 2018. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566317307583>

- [163] K. L. Cox, V. Devanarayan, A. Kriauciunas, J. Manetta, C. Montrose, and S. Sittampalam, "Immunoassay methods," *Assay Guidance Manual*, 7 2019. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>
- [164] A. Sharma, "Enzyme immunoassays: Overview," *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 625–633, 1 1999. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B0122270703045001>
- [165] A. Bioquest, "What are the advantages of label-free immunoassays?" 11 2023. [Online]. Available: <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/what-are-the-advantages-of-label-free-immunoassays>
- [166] Z. Li, J. Zhang, Y. Huang, J. Zhai, G. Liao, Z. Wang, and C. Ning, "Development of electroactive materials-based immunosensor towards early-stage cancer detection," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 471, p. 214723, 11 2022.
- [167] K. Sode, T. Yamazaki, I. Lee, T. Hanashi, and W. Tsugawa, "Biocapacitor: A novel principle for biosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 76, pp. 20–28, 2 2016. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566315303122?via%3Dihub>
- [168] X. Zeng, Z. Shen, and R. Mernaugh, "Recombinant antibodies and their use in biosensors," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 402, pp. 3027–3038, 4 2012. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-011-5569-z>
- [169] Britannica, "Enzyme | definition, mechanisms, nomenclature." [Online]. Available: <https://www.britannica.com/science/enzyme>
- [170] S. Aryal, "Enzymes: Structure, types, mechanism, functions," Microbe Notes, 2024, accedido: 6 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://microbenotes.com/enzymes/>
- [171] H. H. Nguyen, S. H. Lee, U. J. Lee, C. D. Fermin, and M. Kim, "Immobilized enzymes in biosensor applications," *Materials 2019, Vol. 12, Page 121*, vol. 12, p. 121, 1 2019. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/1996-1944/12/1/121/htmhttps://www.mdpi.com/1996-1944/12/1/121>
- [172] C. Jackson, A. Anderson, and K. Alexandrov, "The present and the future of protein biosensor engineering," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 75, p. 102424, 8 2022. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X22001038>
- [173] X. Wang, J. Zhou, and H. Wang, "Bioreceptors as the key components for electrochemical biosensing in medicine," *Cell Reports Physical Science*, vol. 5, p. 101801, 2 2024. [Online]. Available: [https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S2666386424000213https://www.cell.com/action/showAbstract?pii=S2666386424000213https://www.cell.com/cell-reports-physical-science/abstract/S2666-3864\(24\)00021-3](https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S2666386424000213https://www.cell.com/action/showAbstract?pii=S2666386424000213https://www.cell.com/cell-reports-physical-science/abstract/S2666-3864(24)00021-3)

- [174] S. Gaba, N. Chauhan, R. Chandra, and U. Jain, "Future advances of artificial biosensor technology in biomedical applications," *Talanta Open*, vol. 9, p. 100301, 8 2024. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666831924000158>
- [175] F. Xu, S. Moon, A. E. Emre, C. Lien, E. S. Turali, and U. Demirci, "Cell bioprinting as a potential high-throughput method for fabricating cell-based biosensors (cbbs)," *Proceedings of IEEE Sensors*, pp. 387–391, 2009.
- [176] A. Hashem, M. A. Hossain, A. R. Marlinda, M. A. Mamun, S. Sagadevan, Z. Shahnavaz, K. Simarani, and M. R. Johan, "Nucleic acid-based electrochemical biosensors for rapid clinical diagnosis: advances, challenges, and opportunities," *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, vol. 59, pp. 156–177, 2022. [Online]. Available: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408363.2021.1997898>
- [177] M. Hemdan, M. A. Ali, A. S. Doghish, S. S. Mageed, I. M. Elazab, M. M. Khalil, M. Mabrouk, D. B. Das, and A. S. Amin, "Innovations in biosensor technologies for healthcare diagnostics and therapeutic drug monitoring: Applications, recent progress, and future research challenges," *Sensors (Basel, Switzerland)*, vol. 24, p. 5143, 8 2024. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11360123/>
- [178] Y. Hua, J. Ma, D. Li, and R. Wang, "Dna-based biosensors for the biochemical analysis: A review," *Biosensors 2022, Vol. 12, Page 183*, vol. 12, p. 183, 3 2022. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2079-6374/12/3/183/htmhttps://www.mdpi.com/2079-6374/12/3/183>
- [179] A. Salek-Maghsoudi, F. Vakhshiteh, R. Torabi, S. Hassani, M. R. Ganjali, P. Norouzi, M. Hosseini, and M. Abdollahi, "Recent advances in biosensor technology in assessment of early diabetes biomarkers," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 99, pp. 122–135, 1 2018. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566317304967>
- [180] C. Wang, M. Liu, Z. Wang, S. Li, Y. Deng, and N. He, "Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices," *Nano Today*, vol. 37, p. 101092, 4 2021. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748013221000177>
- [181] M. Madadelahi, F. O. Romero-Soto, R. Kumar, U. B. Tlaxcala, and M. J. Madou, "Electrochemical sensors: Types, applications, and the novel impacts of vibration and fluid flow for microfluidic integration," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 272, p. 117099, 3 2025. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566324011060#sec2>
- [182] A. Singh, A. Sharma, A. Ahmed, A. K. Sundramoorthy, H. Furukawa, S. Arya, and A. Khosla, "Recent advances in electrochemical biosensors: Applications, challenges, and future scope," *Biosensors*, vol. 11, p. 336, 9 2021. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8472208/>

- [183] A. C. Marques, A. R. Cardoso, R. Martins, M. G. F. Sales, and E. Fortunato, "Laser-induced graphene-based platforms for dual biorecognition of molecules," *ACS Applied Nano Materials*, vol. 3, pp. 2795–2803, 3 2020.
- [184] Y. Guo, C. Zhang, Y. Chen, and Z. Nie, "Research progress on the preparation and applications of laser-induced graphene technology," *Nanomaterials 2022, Vol. 12, Page 2336*, vol. 12, p. 2336, 7 2022. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2079-4991/12/14/2336/htmlhttps://www.mdpi.com/2079-4991/12/14/2336>
- [185] T. S. D. Le, H. P. Phan, S. Kwon, S. Park, Y. Jung, J. Min, B. J. Chun, H. Yoon, S. H. Ko, S. W. Kim, and Y. J. Kim, "Recent advances in laser-induced graphene: Mechanism, fabrication, properties, and applications in flexible electronics," 11 2022.
- [186] K. Avinash and F. Patolsky, "Laser-induced graphene structures: From synthesis and applications to future prospects," *Materials Today*, vol. 70, pp. 104–136, 2023. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702123003383>
- [187] Y. Wentao, X. Yingxi, F. Yinze, L. Longsheng, Y. Shu, Y. Renpeng, C. Hanxian, and L. Feilong, "Surface and interface functionalization of laser induced graphene: Properties, fabrication, and applications to flexible sensor," *Results in Surfaces and Interfaces*, vol. 18, p. 100362, 1 2025. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S266684592400182X?via%3Dihub>
- [188] A. Gostaviceanu, S. Gavrilas, L. Copolovici, and D. M. Copolovici, "Graphene-oxide peptide-containing materials for biomedical applications," *International Journal of Molecular Sciences 2024, Vol. 25, Page 10174*, vol. 25, p. 10174, 9 2024. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/18/10174/htmlhttps://www.mdpi.com/1422-0067/25/18/10174>
- [189] T.-R. Cui, Y.-C. Qiao, J.-W. Gao, C.-H. Wang, Y. Zhang, L. Han, Y. Yang, T.-L. Ren, J.-W. . Wang, C.-H. . Zhang, Y. . Han, L. . Yang, Y. . Ren, and T.-L. Ultrasensitive, "Ultrasensitive detection of covid-19 causative virus (sars-cov-2) spike protein using laser induced graphene field-effect transistor," *Molecules 2021, Vol. 26, Page 6947*, vol. 26, p. 6947, 11 2021. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/22/6947/htmlhttps://www.mdpi.com/1420-3049/26/22/6947>
- [190] C. Peng and X. Zhang, "Chemical functionalization of graphene nanoplatelets with hydroxyl, amino, and carboxylic terminal groups," *Chemistry 2021, Vol. 3, Pages 873-888*, vol. 3, pp. 873–888, 8 2021. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2624-8549/3/3/64/htmlhttps://www.mdpi.com/2624-8549/3/3/64>
- [191] V. Nanjundappa, T. Ramakrishnappa, K. Sureshkumar, H. Prakash, and B. Praveen, "Efficient strategies to produce graphene and functionalized graphene materials: A review," *Applied Surface Science Advances*, vol. 14, p. 100386, 4 2023. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666523923000211>

- [192] C. Cristea, A. Florea, M. Tertiş, R. Săndulescu, C. Cristea, A. Florea, M. Tertiş, and R. Săndulescu, “Immunosensors,” *Biosensors - Micro and Nanoscale Applications*, 9 2015. [Online]. Available: <https://www.intechopen.com/chapters/48359undefined/chapters/48359>
- [193] 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?’,” pp. 755–757, 10 2019.
- [194] T. Beduk, “Laser-scribed graphene electrochemical sensors for health applications dissertation by,” 3 2022.
- [195] K. Settu, P.-T. Chiu, and Y.-M. Huang, “Laser-induced graphene-based enzymatic biosensor for glucose detection,” *Polymers*, vol. 13, no. 16, p. 2795, 2021. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/16/2795>
- [196] M. Arrivillaga, P. C. Bermúdez, J. P. García-Cifuentes, and J. Botero, “Innovative prototypes for cervical cancer prevention in low-income primary care settings: A human-centered design approach,” *PLoS ONE*, vol. 15, p. e0238099, 8 2020. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7446804/>
- [197] M. Arrivillaga, P. C. Bermúdez, J. P. García-Cifuentes, H. D. Vargas-Cardona, D. Neira, M. del Mar Torres, M. Rodríguez-López, D. Morales, and B. Arizala, “Designing citobot: A portable device for cervical cancer screening using human-centered design, smart prototyping, and artificial intelligence,” *Computational and Structural Biotechnology Journal*, vol. 24, pp. 739–745, 12 2024.
- [198] L. Sembranti, A. Bonini, F. Vivaldi, N. Poma, D. Biagini, A. Dallinger, F. Greco, A. Tavanti, and F. D. Francesco, “Laser-induced graphene-based aptasensor for the selective detection of escherichia coli in urine samples,” *Talanta*, vol. 282, p. 127014, 1 2025.
- [199] S. A. Perdomo, V. Ortega, A. Jaramillo-Botero, N. Mancilla, J. H. Mosquera-Delacruz, D. P. Valencia, M. Quimbaya, J. D. Contreras, G. E. Velez, O. A. Loaiza, A. Gomez, and J. D. L. Roche, “Sensars: A low-cost portable electrochemical system for ultra-sensitive, near real-time, diagnostics of sars-cov-2 infections,” *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, vol. 70, 2021.
- [200] J. J. L. Abella and M. P. V. Piedrahita, “Desarrollo de una prueba de flujo lateral con nanopartículas de oro conjugadas para la detección del virus del papiloma humano (vph) de alto riesgo,” 7 2024.
- [201] J. W. An, S. K. Hyeong, K. M. Kim, H. R. Lee, J. W. Park, T. W. Kim, S. Bae, and S. K. Lee, “Facile synthesis of laser-induced graphene oxide and its humidity sensing properties,” *Carbon Letters*, vol. 34, pp. 1173–1185, 5 2024. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42823-023-00672-3#Sec9>

- [202] A. Kaidarova and J. Kosel, “Physical sensors based on laser-induced graphene: A review,” *IEEE Sensors Journal*, vol. 21, no. 11, pp. 12 426–12 443, 6 2021.
- [203] R. Tabassum, P. P. Sarkar, A. H. Jalal, A. Ashraf, and N. Islam, “Laser-induced electrochemical biosensor modified with graphene-based ink for label-free detection of alpha-fetoprotein and 17-estradiol,” *Polymers 2024*, Vol. 16, Page 2069, vol. 16, p. 2069, 7 2024. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2073-4360/16/14/2069/htmhttps://www.mdpi.com/2073-4360/16/14/2069>
- [204] E. Vaughan, “Laser-induced graphene for electrochemical sensing applications,” Ph.D. dissertation, University College Cork, 2023. [Online]. Available: <https://cora.ucc.ie/bitstream/522dac9a-90ea-43c0-a56f-df6a9d4d2ebe/download>
- [205] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, “ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1),” ICH, Tech. Rep., 2005. [Online]. Available: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1__Guideline.pdf
- [206] V. Fiodorov, R. Trusovas, Z. Mockus, K. Ratautas, and G. Račiukaitis, “Laser-induced graphene formation on polyimide using uv to mid-infrared laser radiation,” *Polymers 2023*, Vol. 15, Page 4229, vol. 15, p. 4229, 10 2023. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2073-4360/15/21/4229/htmhttps://www.mdpi.com/2073-4360/15/21/4229>
- [207] K. Kadela, G. Grzybek, A. Kotarba, and P. Stelmachowski, “Enhancing graphene nanoplatelet reactivity through low-temperature plasma modification,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 16, no. 15, pp. 19 771–19 779, 2024.
- [208] D. Kwak, H. Kim, S. Jang, B. G. Kim, D. Cho, H. Chang, and J.-O. Lee, “Investigation of laser-induced graphene (LIG) on a flexible substrate and its functionalization by metal doping for gas-sensing applications,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, no. 2, p. 1172, 2024.
- [209] Compound Interest, “Analytical chemistry – infrared (IR) spectroscopy,” 2015, consultado: 2025. [Online]. Available: <https://www.compoundchem.com/2015/02/05/irspectroscopy/>
- [210] M. D. Bhatta, H. Kim, and G. Kim, “Various defects in graphene: a review,” *RSC Advances*, vol. 12, no. 33, pp. 21 520–21 547, 2022.
- [211] I. Kondratowicz, M. Nadolska, M. Suchecki, and K. Żelechowska, “Plasma treatment for enhanced functionalization of graphene nanosheets by octadecylamine,” *Separation and Purification Technology*, vol. 298, p. 121588, 2022.
- [212] F. F. Franco, M. H. Malik, L. Manjakkal, A. Roshanghias, C. J. Smith, and C. Gauchotte-Lindsay, “Optimizing carbon structures in laser-induced graphene electrodes using design of experiments for enhanced electrochemical sensing characteristics,” *ACS*

- Applied Materials & Interfaces*, vol. 16, pp. 65 489–65 502, 11 2024. [Online]. Available: [/doi/pdf/10.1021/acsami.4c13124?ref=article_openPDF](https://doi/pdf/10.1021/acsami.4c13124?ref=article_openPDF)
- [213] J. Bian and Y. Huang, “Laser-induced direct graphene patterning: from formation mechanism to flexible applications,” *Soft Science*, vol. 3, p. 4, 2023.
- [214] J. Torrent Burgués, “Medida del ángulo de contacto en materiales ópticos,” Informe técnico, Departamento de Ingeniería Química, FOOT-UPC, Terrassa, España, 2023.
- [215] T. M. G. Selva *et al.*, “Contact angle measurement,” in *Encyclopedia of Sensors and Biosensors*. Elsevier, 2023.
- [216] Y. Li, D. X. Luong, J. Zhang, Y. R. Tarkunde, C. Kittrell, F. Sargunaraj, Y. Ji, C. J. Arnusch, and J. M. Tour, “Laser-induced graphene in controlled atmospheres: From superhydrophilic to superhydrophobic surfaces,” *Advanced Materials*, vol. 29, 7 2017.
- [217] S. Mahshid, S. Camiré, S. O. Kelley, and A. Vallée-Bélisle, “A highly selective electrochemical dna-based sensor that employs steric hindrance effects to detect proteins directly in whole blood,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 137, no. 50, pp. 15 596–15 599, 2015.
- [218] M. Holzinger, S. Cosnier, and P. H. M. Buzzetti, “The versatility of pyrene and its derivatives on sp² carbon nanomaterials for bioelectrochemical applications,” *Synthetic Metals*, vol. 292, p. 117219, 2023.
- [219] D. Jayananda, A. Kumar, and W.-Y. Chung, “Detection of an IL-6 biomarker using a GFET platform developed with a facile organic solvent-free aptamer immobilization approach,” *Sensors*, vol. 21, no. 4, p. 1335, 2021. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7918451/>
- [220] O. Adegoke *et al.*, “Smart graphene-based electrochemical nanobiosensor for clinical diagnosis: Review,” *Biosensors*, 2023.