

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



Escuela Superior de Apan

LICENCIATURA EN INGENIERIA EN NANOTECNOLOGIA

TESIS DE LICENCIATURA

ANÁLISIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO ELEMENTO DE RECONOCIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Para obtener el título de

Licenciada en Ingeniería en Nanotecnología

P R E S E N T A

Karen Paola Ríos Armenta

No de cuenta: 420908

Directores:

Dr. Luis Marat Álvarez Salas

Dr. Luis Alberto Hernández Hernández

Apan, Hgo., Diciembre de 2024

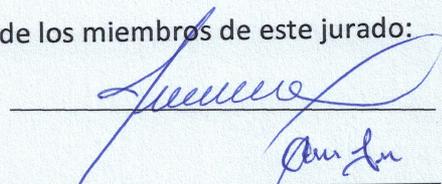


MTRA. OJUKY DEL ROCIO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.
P R E S E N T E

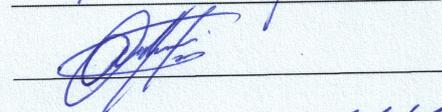
Por este conducto, le comunico que la Comisión Revisora asignada al trabajo de tesis de la alumna de la Licenciatura en Ingeniería en Nanotecnología, **Karen Paola Ríos Armenta**, con número de cuenta 420908, quien presenta el tema **“ANÁLISIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO ELEMENTO DE RECONOCIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO”**, después de revisar la tesis y constituida como Jurado, ha autorizado la impresión de la tesis, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

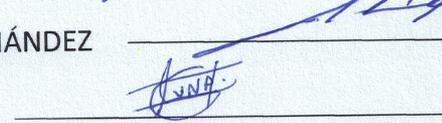
PRESIDENTE: DR. LUIS MARAT ÁLVAREZ SALAS



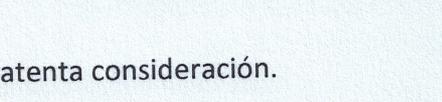
SECRETARIO: DR. MIGUEL ÁNGEL MELÉNDEZ LIRA



PRIMER VOCAL: DR. ARTURO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ



SEGUNDO VOCAL: DR. LUIS ALBERTO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ



TERCER VOCAL: M. EN C. SOFÍA LUNA GARCÍA

Sin otro particular, le reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”
Apan, Hgo., a 21 de noviembre de 2024



DR. JORGE ZUNO SILVA
DIRECTOR DE LA ESCUELA SUPERIOR DE APAN

Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43900
Teléfono: 7717172000 Ext. 5800, 5801
esap@uaeh.edu.mx

*"El agradecimiento es la memoria del corazón."
– Jean-Baptiste Massieu*

Agradecimientos

Le dedico este trabajo de tesis con gratitud y amor a mi familia: a mi madre, mi padre y a mi hermana, a quienes agradezco profundamente por apoyarme en cada paso del camino, por ser mis pilares y enseñarme la importancia del esfuerzo y la perseverancia.

Con gran respeto y admiración, le agradezco al Dr. Luis Marat Álvarez Salas por otorgarme mi primera oportunidad, por creer en mí y por haberme inspirado a seguir creciendo como profesional, además de haberme brindado los recursos y el ambiente necesarios para desarrollar esta investigación. Fue un honor formar parte del LTG.

Agradezco al Dr. Miguel Ángel Melendez Lira por permitirnos trabajar en su laboratorio de Ablación Láser, una experiencia vital para el desarrollo de este proyecto que además contribuyó significativamente a mi formación profesional.

Este logro no hubiera sido posible sin el Dr. Luis Alberto Hernández Hernández, por su constante apoyo académico y personal, por guiarme con sabiduría durante todo este proceso y por su invaluable experiencia que ha sido fundamental para la realización de este trabajo.

Mis más sinceros agradecimientos a todos y cada uno de mis profesores por su guía y enseñanzas, en especial al Dr. Arturo Hernández Hernández por desempeñar un excelente papel como coordinador académico del programa.

Y finalmente, le agradezco a mis amigos, ahora colegas, por hacer de mi experiencia universitaria un recuerdo memorable que atesoraré en mi corazón. Su amistad, ánimo y apoyo han sido una fuente de energía e inspiración. Sé que a todos nos esperan grandes cosas y estaré muy feliz de ver como todos cumplimos nuestros sueños, iniciando por este.

Resumen

En los últimos años, los materiales nanoestructurados se han posicionado como uno de los focos de mayor interés por sus propiedades fisicoquímicas únicas. La aplicación de la nanotecnología y su papel en el área biomédica abre las puertas hacia el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, tratamiento y control de diversas enfermedades.

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es una infección de transmisión sexual que afecta a millones de personas en el mundo. Existen más de 100 tipos de VPH, y algunos de ellos se clasifican como de alto riesgo por su potencial de transformar a las células infectadas en células cancerígenas. Entre los tipos de alto riesgo, se reporta que el VPH-16 es el principal precursor de cáncer cérvico-uterino (CaCU), relacionado con alrededor del 70% de los casos.

El propósito de este trabajo es estudiar la interacción entre Nanopartículas de Oro (AuNPs) y las proteínas de la cápside viral del VPH-16. Utilizando una de las propiedades ópticas de las AuNPs, conocida como Resonancia de Plasmón Superficial (RPS). Se propone emplear suspensiones de AuNPs como elemento de reconocimiento para identificar la presencia o ausencia de las proteínas estructurales del VPH. Se sugiere que la presencia del virus en un medio de solución salina afectará las interacciones entre AuNPs, generando una señal óptica detectable por inspección visual o mediante lecturas de absorbancia. Con base en lo anterior, se propone un sensor colorimétrico basado en AuNPs como una prueba de diagnóstico innovadora, rápida y económica para la detección temprana del VPH.

Abstract

In recent years, great interest has been focused on nanostructured materials due to their unique physicochemical properties. The application of nanotechnology and its role in the biomedical area opens the door to the development of new methods for the diagnosis, treatment, and control of various diseases.

The Human Papillomavirus (HPV) causes a sexually transmitted infection that affects millions of people worldwide. There are more than 100 HPV types, and some of them are classified as high-risk due to their potential to transform infected cells into cancer cells. Among the high-risk types, HPV-16 is reported to be the main precursor to cervical cancer (CaCU), associated to around 70% of cases.

The purpose of this work is to study the interaction between Gold Nanoparticles (AuNPs) and the viral capsid proteins of HPV-16. Using one of the optical properties of AuNPs, known as Surface Plasmon Resonance (SPR), it is proposed to use AuNP suspensions as a recognition element to identify the presence or absence of HPV structural proteins. It is suggested that the presence of the virus in a saline solution will affect the interactions between AuNPs, generating an optical signal detectable by visual inspection or through absorbance measurements. Based on the above, a colorimetric sensor based on AuNPs is proposed as an innovative, rapid, and cost-effective diagnostic test for the early detection of HPV.

Índice

Agradecimientos	
Resumen	
Abstract	
Índice	
Planteamiento del problema	
Justificación	
Objetivos	
Hipótesis	
	<i>pág</i>
➤ Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Estado del arte	1
1.2 Virus del Papiloma Humano (VPH)	3
1.2.1 Estructura del genoma viral del VPH-16	4
1.2.2 Proteína L1	6
1.3 Sistemas biológicos virales como modelos de estudio	6
1.4 Pseudovirus (PVs)	8
1.5 Nanopartículas de Oro (AuNPs)	8
1.5.1 Fenómenos plasmónicos	9
1.5.2 Modulación de efectos plasmónicos: Factores físicoquímicos	10
1.5.3 Estabilidad coloidal y agregación	14
1.5.4 Biocompatibilidad	15
1.6 Sensores	16
1.6.1 Sensores colorimétricos basados en AuNps	17
➤ Capítulo 2: Metodología de síntesis y caracterización	19
2.1 Métodos de síntesis de AuNPs	19
2.2 Síntesis de AuNPs por Ablación Láser Pulsado en medio líquido (ALPL)	19
2.3 Parámetros de control	21
2.4 Instrumentación y obtención de soluciones de AuNPs	23
2.5 Ensayos de agregación	24
2.6 Espectrometría UV-Vis	25
2.7 Microscopía Electrónica de Transmisión	26
2.7.1 Preparación de la muestra	26
2.8 Producción de Pseudovirus de VPH-16	27

2.8.1 Propagación de los plásmidos	27
2.8.2 Cultivo celular de la línea celular 293TT	30
2.8.3 Transfección de los plásmidos	31
2.8.4 Monitoreo por Microscopía de Fluorescencia	32
2.8.5 Lisado celular, separación y purificación	32
2.9 Caracterización de los Pseudovirus	34
2.9.1 Inmunotransferencia	34
2.9.2 Microscopia Electrónica de Transmisión	35
2.9.2.1 Preparación de las muestras: tinción negativa	36
2.10 Ensayos de agregación en ausencia y presencia de pseudovirus	36
➤ Capítulo 3: Resultados y discusiones	39
3.1 AuNPs obtenidas por ALP	39
3.2 Absorbancia de AuNPs	40
3.3 Imágenes de TEM de AuNPs	42
3.4 Ensayos de agregación	46
3.5 Microscopía de fluorescencia	49
3.6 Bandas de pseudovirus tras ultracentrifugación en gradiente de densidad	50
3.7 Caracterización de la proteína L1 por Inmunotransferencia	52
3.8 Caracterización TEM de los pseudovirus	53
3.9 Espectros UV-Vis: interacción entre AuNPs y PVs	55
➤ Capítulo 4: Conclusiones	58
4.1 Perspectivas futuras	59
Referencias	62
Listado de figuras y tablas	66

Planteamiento del problema

Los Virus de Papiloma Humano (VPH) producen una infección de transmisión sexual relativamente común¹. Estudios recientes en la población mexicana han identificado que en las mujeres los genotipos de VPH con mayor prevalencia son el VPH-16 y el VPH-18, encontrados globalmente en dos de cada tres pacientes con infecciones genitales². Se reporta que alrededor del mundo millones de personas están infectadas por VPH y que el resto de la población tiene un riesgo de contraer la infección superior al 50% considerándose un problema de salud pública³.

Por otro lado, se estima que el 70% de los casos de cáncer cérvico-uterino (CaCu) son desencadenados por infecciones de VPH-16 y VPH-18 considerándose un problema de salud pública. Además, el CaCu es una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial, con cifras que alcanzan 342,000 fallecimientos de mujeres cada año, en su mayoría en países de ingresos bajos y medios².

Si bien las tasas de CaCu en países desarrollados han descendido en las últimas décadas gracias a la aplicación de vacunas profilácticas contra la infección por VPH y una intervención ginecológica oportuna, en un gran número de países subdesarrollados los casos de CaCu han permanecido sin cambios e incluso han aumentado⁴.

Justificación

Una encuesta realizada a 237 mujeres comprendidas entre los 22 y 72 años, reporta las diversas razones por las cuales las mujeres no se realizan valoraciones ginecológicas con regularidad. Entre las principales respuestas se encuentran: ignorancia, miedo, vergüenza, incomodidad, falta de tiempo, estigmatización social e idiosincrasia cultural⁵.

Dicha evidencia estadística alarma a la comunidad médica y científica, motivando a generar nuevas líneas de investigación cuyos avances y resultados permitan proponer alternativas innovadoras de prevención, diagnóstico y tratamiento contra las infecciones por VPH. Las aplicaciones de la nanotecnología permiten desarrollar métodos de diagnóstico más precisos, sensibles y específicos en contraste con las técnicas convencionales utilizadas en la actualidad. Al aprovechar las propiedades únicas de los materiales nanoestructurados, se propone una metodología de diagnóstico versátil y económica que posibilita la identificación oportuna de personas infectadas y, por consiguiente, permita que los usuarios VPH positivos inicien una terapia temprana con el fin de reducir el número de casos con cuadros oncológicos así como los fallecimientos relacionados.

Objetivo general

Análisis de la interacción espontánea de suspensiones de Nanopartículas de Oro (AuNPs), como propuesta de elemento de reconocimiento de pseudovirus (PVs) de VPH-16 como prueba de concepto para el desarrollo de un biosensor colorimétrico para la detección temprana y oportuna de infecciones causadas por VPH.

Objetivos específicos

- Síntesis de AuNPs por el método de Ablación Láser Pulsado en medio líquido (ALPL).
- Producción de PVs derivados de la cepa VPH-16 utilizando la línea celular 293TT.
- Evaluación de las interacciones de las dispersiones de AuNPs en presencia de los PVs, mediante ensayos de agregación en gradientes de concentración de solución salina y volumen de PVs.
- Análisis e interpretación de la caracterización de las soluciones de AuNPs, los PVs y AuNPs-PVs (mediciones UV-Vis, TEM).

Hipótesis

Se sugiere que existirá una interacción espontánea entre las AuNPs y las proteínas estructurales presentes en la cápside de los PVs de VPH-16.

Esta interacción podrá comprobarse al inducir agregación de las soluciones de AuNPs en un medio salino (NaCl), ocasionando un cambio en el color de la solución, el cual será empleado como control negativo.

Por otro lado, se propone que las AuNPs serán adsorbidas en la cápside viral al entrar en contacto con las proteínas estructurales de los PVs, como consecuencia las AuNPs no se agregarán en presencia de medio salino, por lo que no se inducirá un cambio evidente en el color de la solución.

El estudio comparativo de las interacciones de las AuNPs en solución salina, en ausencia o presencia de PVs de VPH-16, permitirá justificar su aplicación como material de reconocimiento para el desarrollo de un sensor colorimétrico.

Capítulo 1: Introducción

1.1 Estado del arte

En los últimos años, el estudio y aplicación de los materiales nanoestructurados se han posicionado como uno de los tópicos de mayor interés para la comunidad científica y diversos sectores industriales. La capacidad de modular la variedad de propiedades fisicoquímicas de un material, proporciona una visión innovadora y prometedora para un gran número de aplicaciones, posibilitando el progreso científico y tecnológico.

La nanotecnología y su papel dentro de la medicina abre las puertas para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, tratamiento, monitoreo y control de sistemas biológicos. La nanomedicina es la rama emergente que agrupa tres áreas principales: el nanodiagnóstico, la liberación controlada de fármacos y la medicina regenerativa⁶.

En este trabajo se estudia la posible interacción entre un sistema nanoestructurado (AuNPs) con un sistema biológico de carácter viral (PVs), aportando nueva información a una línea de investigación que busca proponer nuevos métodos de diagnóstico así como de tratamiento para una problemática de salud pública.

- En un artículo realizado por Mateo et al., 2013⁷, se describe acertadamente cómo las excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas del oro a escala nanométrica han despertado un particular interés en multitud de campos, pero especialmente en el sector biomédico. Las AuNPs pueden ser producidas en distintos tamaños y formas, y pueden ser fácilmente funcionalizadas con una gran variedad de ligandos (aptámeros, anticuerpos, polímeros, fármacos, material genético, etc.), lo que las vuelve ideales para las novedosas perspectivas de la medicina.
- Otro aspecto fundamental dentro del proyecto, es la producción de un sistema biológico que mimetice el comportamiento de interacción por contacto del VPH de

manera eficaz y segura. La elección de los PVs como dicho sistema biológico se fundamenta en que son partículas estructuralmente indistinguibles de los viriones nativos con capacidades infectivas semejantes, pero portadores de un genoma no viral. Se consideran herramientas relevantes que proporcionan una plataforma ideal para el estudio y monitoreo *in cellulo* de infecciones generadas por VPH⁸.

- Los métodos que se han desarrollado para el diagnóstico de las infecciones por VPH genital fueron estudiados detenidamente por Marcela Concha R et al, 2007⁹.

Entre de ellos se destacan a las pruebas de citología vaginal, ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección específica del ADN de VPH y el procedimiento de colposcopia. Adicionalmente, se evaluaron las desventajas que presentan cada uno de estos métodos: la citología reporta una baja sensibilidad para la detección de lesiones de bajo grado; el elevado costo de pruebas PCR y su deficiencia en la identificación de un estado transitorio o persistente de la lesión por VPH; y, por supuesto, lo invasivo que resulta someter a una paciente a un procedimiento de colposcopia.

- En un artículo publicado por Li et al., 2020¹⁰, los autores proporcionan una visión general sobre los sensores basados en nanomateriales. Estos dispositivos combinan un elemento biológico con un componente físico de reconocimiento, en nuestro caso específico AuNPs. Cuando el analito objetivo se une al elemento de reconocimiento, se produce un cambio físicoquímico que puede ser detectado y cuantificado. Además, se enlistan una serie de ventajas propias esta nueva generación de sensores, entre ellas la sensibilidad, aumento en la especificidad, rapidez de detección, reducción de costos y la fácil reproducibilidad.
- La aplicación de sistemas nanoestructurados en esta línea de investigación también resultó ser de interés para Palomino-Vizcaino et al 2017¹¹, quienes reportan por primera vez la interacción espontánea entre las partículas similares a virus (VLPs) del VPH-16 y AuNPs no funcionalizadas. Esto se demostró implementando un mecanismo de detección colorimétrico cuyo objetivo fue identificar si las AuNPs

tienen la capacidad para inhibir la infección por VPH. Los resultados de sus experimentos de pseudoinfección demostraron que las AuNPs, en efecto, pueden inhibir significativamente el proceso de entrada del VPH-16 sin afectar la viabilidad celular.

1.2 Virus del Papiloma Humano (VPH)

Perteneciente a la familia *Papillomaviridae*, el VPH es un virus de ADN bicatenario circular con un diámetro aproximado de 52-60 nm. Caracterizados por una cápside de morfología icosaédrica compuesta por las proteínas estructurales virales L1 y L2 que se organizan en 72 capsómeros. Este virus cuenta con tropismo por el epitelio escamoso, es decir, que tiene afinidad por infectar las células epiteliales basales (queratinocitos) presentes en el tejido epitelial escamoso estratificado del tracto genital bajo (como vagina, vulva, cuello uterino y ano), así como epitelio oral y nasal¹².

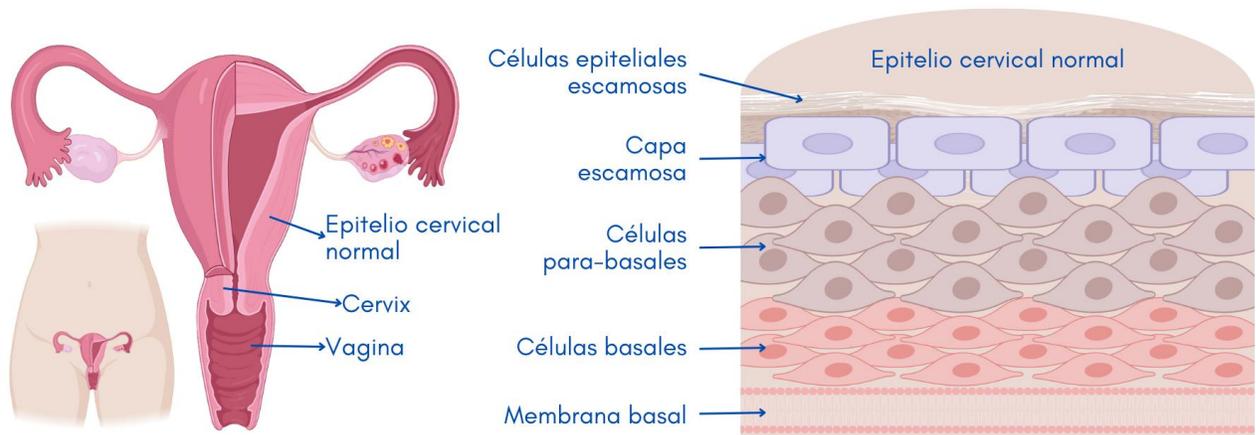


Figura 1. Ilustración histológica del tejido epitelial cervical que infecta el VPH

La infección genital por el VPH es una enfermedad de transmisión sexual (ETS) de alta incidencia mundial que juega un papel importante en la génesis de lesiones precancerosas y cáncer de cuello uterino invasivo¹². Es por lo que se ha profundizado en su comportamiento

tanto como una enfermedad de transmisión sexual, así como en su potencialidad de producir la transformación de células infectadas en células malignas.

Se conocen más de 100 diferentes tipos de VPHs y estos son clasificados de alto riesgo o de bajo riesgo según su potencial de desarrollar cuadros clínicos oncológicos (*véase tabla 1*). Las cepas de alto riesgo pueden causar cambios celulares que generan lesiones precancerosas que pueden conducir al desarrollo de cáncer, mientras que las cepas de bajo riesgo, rara vez causan cambios celulares graves¹³. Al menos 58 diferentes VPH han sido identificados usando técnicas moleculares, estableciendo su relación con tipos particulares de tumores.

Tabla 1. Clasificación oncológica de cepas de VPH (Ebscohost, 2017)¹³

Tipo de VPH	Cepas
Alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 68, 73, 82
Bajo riesgo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 62, 64, 69, 70, 72, 81, 83, 84

A pesar de que más del 90% de las infecciones por VPH son controladas por el sistema inmune en menos de 2 años, aquellas causadas por los tipos de alto riesgo pueden persistir y eventualmente evolucionar a lesiones precursoras malignas y, en caso más severos, desencadenar una metástasis.

El principal factor etiológico del cáncer CaCu es la infección por VPH y se reporta que el 70% de los casos son causados principalmente por los tipos 16 y 18, acorde con las cifras reportadas por la Gaceta Mexicana de Oncología en el año 2019.

1.2.1 Estructura del genoma viral del VPH-16

El genoma del VPH consiste en una molécula de ADN circular de doble cadena, con un rango de tamaño entre 7600 - 8000 pb, como se observa en la *figura 2*. Además este virus tiene la capacidad de replicarse en el núcleo de las células infectadas como un plásmido de múltiples copias¹⁴.

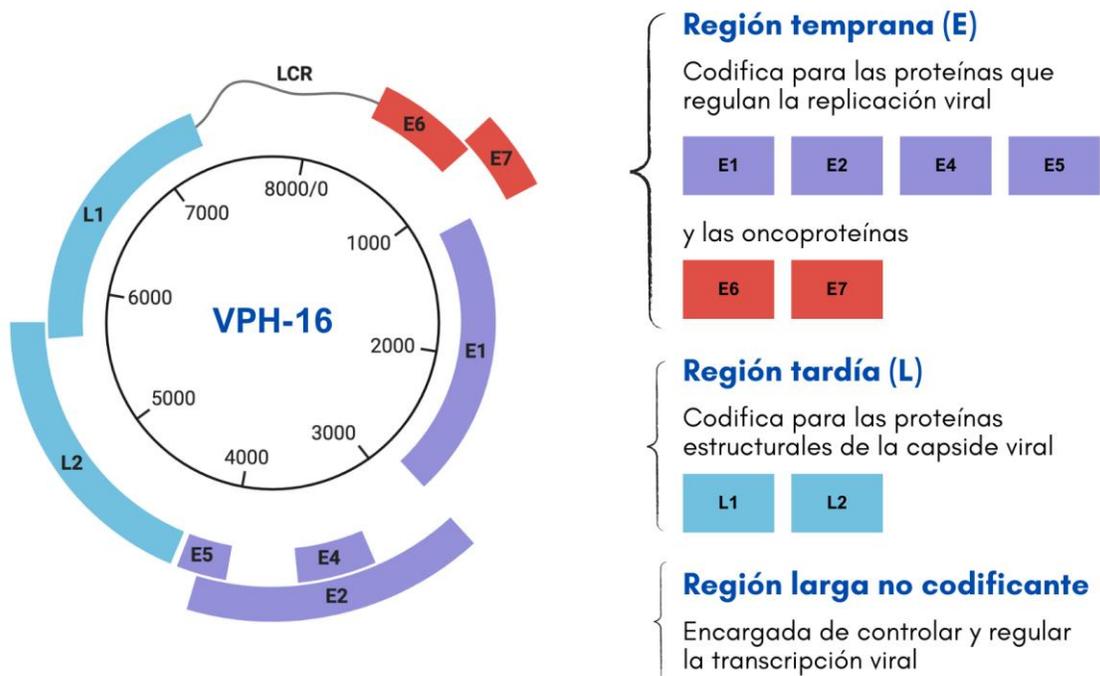


Figura 2. Esquema del genoma viral del VPH-16, adaptado de (Haręza, Wilczyński and Edyta Paradowska, 2022)¹⁵.

El ciclo vital del VPH se inicia con la infección de la capa basal de las células epiteliales, donde el virus expresa los genes tempranos E1, E2, E4 y E5 que codifican para proteínas que regulan la replicación y transcripción viral. En tanto que los genes E6 y E7 son capaces de inducir la proliferación de las células basales y para-basales, además de codificar para las oncoproteínas que participan en la transformación de la célula hospedera. Por último, los genes tardíos L1 y L2 codifican para la producción y ensamblaje de las proteínas estructurales de la cápsida viral.^{9, 16}

El potencial oncogénico de los VPH de alto riesgo reside en las oncoproteínas E6 y E7, que son las responsables de perturbar el control del ciclo celular y de iniciar una serie de alteraciones asociadas con la transformación celular como la capacidad de causar lesiones persistentes en las células, cambios genéticos que afectan la regulación del crecimiento celular, la apoptosis y la supresión tumoral.¹⁷

En el caso de VPH-16 y VPH-18 la proteína E6 tiene la capacidad de degradar otras proteínas, entre ellas la proteína p53,¹⁸ cuya misión es proteger la integridad del genoma de las células durante el ciclo celular natural, impidiendo que se propaguen mutaciones a las células hijas que pueden evolucionar hacia lesiones de mayor severidad. La proteína E7 coopera con la E6 en la inmortalización de los queratinocitos, interactuando con proteínas reguladoras del crecimiento celular.⁹

1.2.2 Proteína L1

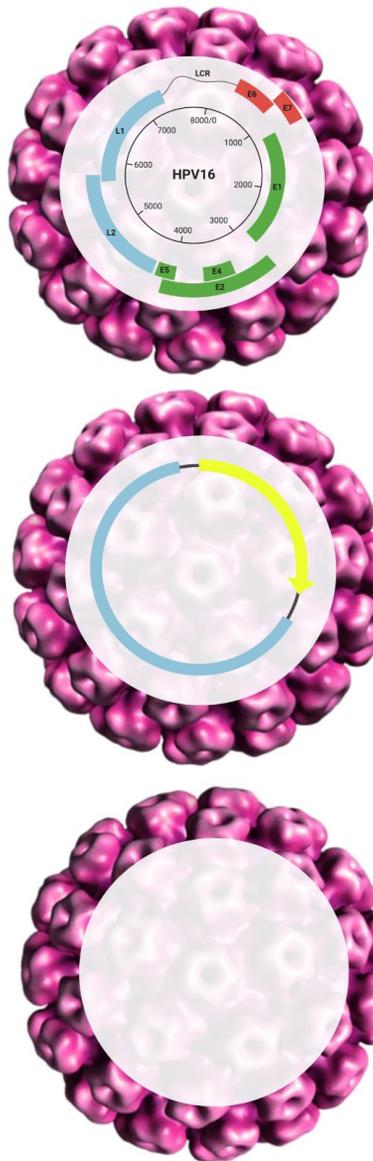
L1 es la proteína estructural por la cual está compuesta toda la superficie exterior del virión maduro estabilizado, lo que la vuelve responsable de la primera interacción con la superficie celular y de mediar la unión inicial a los tejidos.¹⁷ Se compone de 531 aminoácidos y es el gen más conservado dentro de los genomas de los VPHs que se ha utilizado como indicador para la identificación y clasificación de nuevos tipos de VPH.¹⁸ La estructura de la proteína L1 del VPH es importante porque confiere estabilidad a la cápside mediante el establecimiento de interacciones intra- e inter- capsoméricas lo que asegura la integridad viral y antigénicamente porque contiene los epítomos que inducen una respuesta inmune protectora.¹⁹ Las proteínas L1 recombinantes, al igual que en la replicación celular normal, pueden autoensamblarse espontáneamente en una estructura que imita estrechamente la superficie natural de los viriones nativos del VPH.²⁰

1.3 Sistemas biológicos virales como modelos de estudio

Cuando se busca estudiar un sistema *in vivo* de infecciones generadas por el VPH se vuelve complicado, pues es un virus complejo cuyo ciclo de replicación involucra múltiples etapas, además de ser altamente transmisible. Esto complica el estudio de un modelo experimental aislado que mimetice las condiciones de replicación naturales del virus.

Es por lo que en este proyecto uno de los objetivos fue utilizar un modelo alternativo del virus nativo de VPH-16, como los pseudovirus, que conserve fielmente las características estructurales de la cápside viral. De esta manera se podrá analizar su comportamiento al interactuar con las AuNPs e idear una plataforma de estudio para proponer una nueva metodología de detección y diagnóstico.

La elección del sistema biológico es de vital importancia debido a las diferencias inherentes en su naturaleza y aplicaciones. Cada uno de los sistemas ofrece ventajas y desafíos específicos que deben considerarse cuidadosamente según los objetivos de la investigación. En este contexto, se enlistan las características de las tres plataformas utilizadas para investigaciones de la interacción de la cápside viral del VPH, *véase figura 3*.



Virus nativo

- Cápside viral con L1 y L2
- Material genético ADN bicatenario
- Tiene capacidad infecciosa
- Requieren células huésped para su replicación

Pseudovirus

- Cápside viral con L1 y L2
- Material genético modificado: pseudogenoma
- Capacidad de producir pseudo infecciones
- Artificial

Partícula Similar a Virus

- Cápside viral con L1 y L2
- No cuenta con material genético en su interior
- Artificial

Figura 3. Características de los sistemas biológicos virales (Pseudoviruses, a safer toolbox for vaccine development against enveloped viruses, 2024)²⁰

1.4 Pseudovirus (PVs)

Los PVs son partículas virales recombinantes, incompetentes para replicarse, diseñadas para imitar las características de la superficie de los virus con envoltura nativa que estructuralmente son indistinguibles entre sí.²¹

Estudiar las interacciones de las cápsides virales y la función de las proteínas con el modelo biológico de PVs ofrece una variedad de ventajas sobre los viriones nativos y las VLPs, entre ellas:

- Se introducen a la célula únicamente las secuencias que codifican para las proteínas que son de interés según el objetivo de cada proyecto.
- Al no ser partículas infecciosas son seguras de manipular.
- El pseudogenoma puede ser complementado de manera estratégica dependiendo de los controles de monitoreo disponibles.
- Su estabilidad estructural es mayor por lo que pueden ser almacenados durante períodos de tiempo más prolongados.
- Son útiles para estudiar la entrada viral, la patogénesis y la respuesta inmune.

1.5 Nanopartículas de Oro (AuNPs)

Las AuNPs son estructuras sólidas de tamaño nanométrico que poseen propiedades físicas y químicas que contrastan con el oro a macroescala, a pesar de estar compuestos por el mismo tipo de átomos.

Hay tres factores clave que explican el éxito de las AuNPs en el campo de la nanociencia y la nanotecnología:

- Su alta estabilidad química y física, lo que también contribuye a su biocompatibilidad intrínseca.

- La facilidad con la que se puede funcionalizar su superficie con una gran variedad de moléculas orgánicas y biológicas (grupos funcionales, polímeros, ácidos nucleicos, enzimas, proteínas, etc).
- La diversidad de propiedades asociadas a los plasmones superficiales.

Este comportamiento del Au a escala nanométrica se presenta como consecuencia de fenómenos físicos propios de los materiales nanoestructurados:

- **Confinamiento cuántico:** Se produce cuando los electrones de una partícula están confinados a un espacio más pequeño que su longitud de onda de De Broglie y su movimiento se ve limitado en una o más de sus dimensiones. Estos efectos pueden influir en las propiedades electrónicas y ópticas, como la conductividad eléctrica y la absorción de luz.²²
- **Relación de aspecto superficie-volumen:** A medida que las partículas disminuyen de tamaño, la proporción de átomos en la superficie en comparación con los átomos en el volumen aumenta drásticamente. Esto significa que una fracción considerable de los átomos de la nanopartícula se encuentra en la superficie, lo que puede alterar propiedades como la reactividad química, la estabilidad y las características ópticas. Estos nuevos comportamientos hacen de esta relación un parámetro clave en el diseño y aplicación de las AuNPs en la ciencia y tecnología.²³

1.5.1 Fenómenos plasmónicos

La resonancia de plasmón superficial (RPS) es un fenómeno óptico que se asocia a una vibración de la nube electrónica confinada superficialmente al interactuar con radiación electromagnética (luz) a una frecuencia característica, un comportamiento propio de los materiales nanoestructurados.²⁴ La radiación electromagnética induce una oscilación colectiva de los electrones libres en la superficie de las partículas nanométricas generando dos fenómenos principales: la absorción y la dispersión. La absorción ocurre cuando parte de la energía de la radiación electromagnética incidente se transfiere a la nanopartícula,

incrementando su temperatura.²⁴ Por otro lado, la dispersión es el proceso por el cual la luz se desvía en diferentes direcciones al interactuar con la nanopartícula. En consecuencia de estos fenómenos es que las NPs exhiben tonalidades en longitudes de onda características, ocasionando un efecto óptico distintivo en el rango visible.

La excitación de plasmones no se presenta en la materia a macroescala, esto se debe a que en las nanopartículas metálicas los electrones se encuentran altamente deslocalizados o menos confinados, pues la separación entre la banda de conducción y la banda de valencia desaparece, habilitando así la absorción de una amplia gama de energías, incluido el espectro visible y el ultravioleta.²⁵

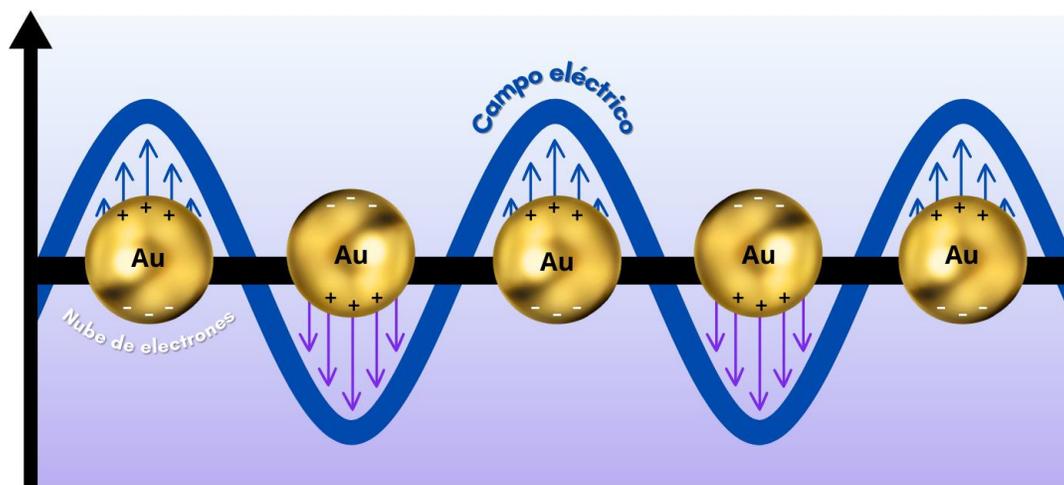


Figura 4. Oscilación colectiva de los electrones de la superficie de AuNPs en respuesta a un campo eléctrico externo

1.5.2 Modulación de Efectos Plasmónicos: Factores Físico-Químicos

Tras exhaustivas investigaciones sobre los fenómenos ópticos de las nanoestructuras, se logró postular que la banda de absorción generada por una nanoestructura metálica dependerá de factores fisicoquímicos como el tamaño, la morfología, la composición química, la constante dieléctrica producida por el medio que las rodea y las posibles interacciones que ocurran entre ellas.²⁶

- **Tamaño:** Cuando el tamaño del oro a nanoescala se aproxima a la longitud de onda de Fermi, los niveles de energía se vuelven lo suficientemente discretos como para afectar sus propiedades electrónicas²⁷. Se ha reportado ampliamente en la literatura que, para AuNPs con diámetros de alrededor de 20 nm, la banda de absorción se presenta alrededor de los 520 nm, un máximo que se encuentra en el rango visible del espectro electromagnético lo que produce la tonalidad roja característica. Por otro lado, cuando el diámetro de las AuNPs crece a longitudes superiores, la banda de RPS exhibe un comportamiento diferente, pues comienza a desplazarse hacia longitudes de onda mayores, lo que se conoce como ‘corrimientos al rojo’. Esto se debe a un aumento en la dispersión de la luz sobre la absorción, esta se vuelve más dominante a medida que las partículas se hacen más grandes. Además, su banda en el espectro se ensancha debido a la heterogeneidad de los modos de oscilación plasmónica, lo que significa que las oscilaciones de los electrones libres ya no son tan homogéneas en contraste con partículas más pequeñas.²⁷
- **Morfología:** Los avances en la síntesis y caracterización de nanoestructuras plasmónicas han hecho posible obtener AuNPs con diversas formas, como nanoshells, nanohilos, nanocubos, nanoprismas, por mencionar solo algunas. Estos cambios en la morfología afectan la forma en que los electrones libres en la superficie de las nanopartículas interactúan con la luz, lo cual influye en las propiedades ópticas, resultando en un comportamiento de la RPS sorprendente. En el caso de los nanoshells, la RPS dependerá del grosor de la capa metálica de oro y el tamaño del núcleo, ya que el campo eléctrico se limita a interactuar con los electrones presentes en el *shell*, es decir, la coraza de oro. Los nanohilos tienen una estructura cilíndrica alargada y la RPS se verá afectada por la longitud y el diámetro del hilo. A diferencia de las esferas, los nanohilos presentan resonancias en distintas direcciones debido a la anisotropía de su forma, lo que lleva a múltiples bandas de absorción o dispersión en el espectro de luz. En los nanocubos y los nanoprismas, la RPS se ve influenciada por la orientación, posición y ángulos de sus caras, exhibiendo picos de absorción en distintas longitudes de onda por la geometría anisotrópica en comparación con las partículas esféricas.²⁸

- **Composición química:** Las AuNPs pueden estar constituidas únicamente por oro de alta pureza, estar recubiertas o dopadas con diferentes materiales, o bien, pueden estar aleadas con otros metales. Si se modifica la composición del núcleo o se recubre la AuNPs, esto puede cambiar su banda de absorción, ya que la interacción entre el núcleo y la capa metálica afectará la resonancia en función de factores como el espesor y el tipo de material. En el caso de las aleaciones con metales como la plata (Ag) y el cobre (Cu); o dopajes con elementos como el platino (Pt) y níquel (Ni), su comportamiento puede ser ajustado en función de la proporción de cada elemento presente, pues cada uno exhibe conductas características que pueden aportar a la mejora de las propiedades ópticas, magnéticas, catalíticas y/o de biocompatibilidad de las AuNPs.²⁹
- **Medio de síntesis:** El comportamiento de la resonancia de las AuNPs puede sufrir cambios significativos según las características del medio que las rodea, pues recordemos que las partículas están en contacto directo y prolongado con los componentes de la solución, por lo cual es importante tomar en cuenta el papel del medio circundante para asegurarnos que se mantenga la estabilidad coloidal. Factores como el medio dieléctrico, el pH, la presencia de iones, electrolitos y/o agentes estabilizantes, modifican el ambiente de las AuNPs. Por ejemplo, en medios ácidos o básicos, o bien, ante la presencia de iones y electrolitos, la carga superficial de las AuNPs puede alterarse, lo que influye en la repulsión o agregación entre partículas.³⁰
- **Interacción entre AuNPs:** El fenómeno de agregación de las AuNPs indica que la distancia entre ellas se reduce, por lo que sus campos eléctricos interactúan entre sí, causando un desplazamiento en la longitud de onda de resonancia hacia longitudes de onda mayores y un ensanchamiento en la curva. Las AuNPs agregadas crean modos de resonancia adicionales de mayor complejidad.³¹ Por otro lado, cuando existe repulsión debido a las fuerzas electrostáticas entre las AuNPs que no permiten su aglomeración y, al contrario, fomentan su dispersión en el medio, la

banda de resonancia se mantiene estable en una longitud de onda específica y la curva en el espectro tiende a ser más estrecha ya que no hay interacciones plasmónicas que provoquen modos de resonancia adicionales.

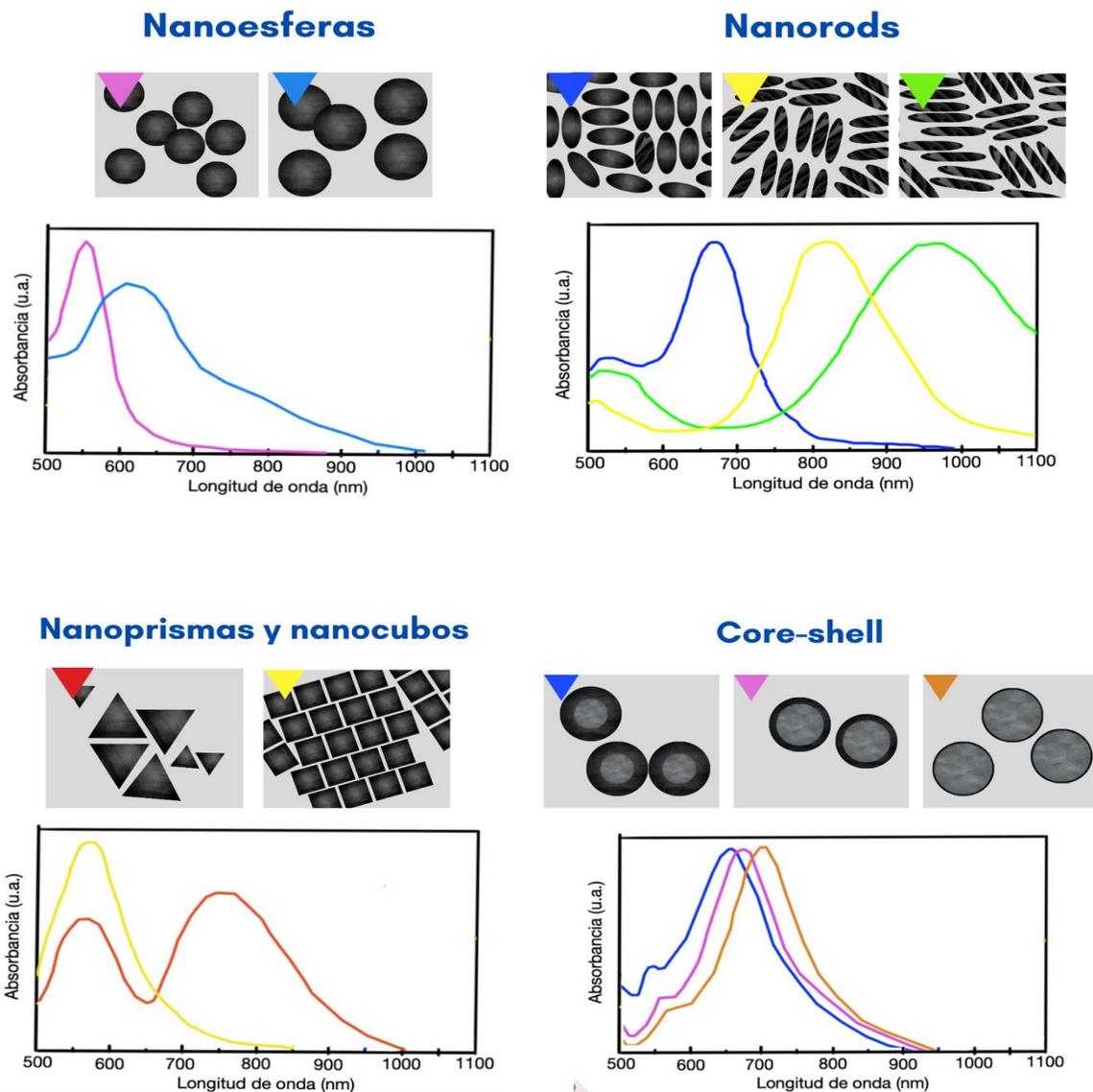


Figura 5. Representación cualitativa de espectros UV-Vis en el modo de absorbancia para diferentes nanoestructuras donde se identifican variaciones de la RPS dependientes de factores fisicoquímicos como se establece en la sección 1.5.2.

1.5.3 Estabilidad coloidal y agregación

La estabilidad coloidal de una dispersión de nanopartículas (NPs), es un parámetro dependiente del tiempo que se relaciona con la capacidad de emplear las NPs como elementos discretos individualmente. Desde un punto de vista cinético, la agregación del coloide se describe como la facilidad que tendrán las NPs para colisionar entre sí, esto debido a que las NPs son inestables y tienden a aglomerarse, como consecuencia de interacciones atractivas de tipo Van der Waals, electrostáticas y/o magnéticas. Así pues, una variación en las condiciones del coloide, como un cambio en la polaridad del disolvente o de la fuerza iónica, o la introducción de un reactivo puede provocar la agregación de las NPs en el mismo.³²

- ***Debilitamiento de la capa eléctrica:*** Cuando las AuNPs se encuentran dispersas en agua, el solvente al presentar fenómenos de autoionización, naturalmente genera una repulsión electrostática entre las moléculas presentes en el medio. La adición de NaCl aumenta la concentración de iones en la solución, lo que reduce la fuerza de la capa eléctrica propias de las AuNPs y posibilita una interacción atractiva entre de ellas.³²
- ***Apantallamiento de las cargas superficiales:*** Los iones de sodio (Na^+) de la solución salina se pueden unir a las AuNPs, neutralizando parcialmente las cargas negativas en su superficie. Esto reduce la repulsión electrostática entre las AuNPs, facilitando su aglomeración. No es necesaria la pérdida total de la carga superficial, sino la suficiente cantidad para que las fuerzas de van der Waals superen la repulsión electrostática.³³

Por otro lado, la posibilidad de modular este comportamiento resulta especialmente interesante en el empleo de NPs de metales nobles, como son las AuNPs, debido a las propiedades que exhiben como consecuencia de fenómenos plasmónicos. En este sentido, la superficie de las NPs puede ser funcionalizada, a fin de inducir estabilidad electrostática, estérica o electroestérica.

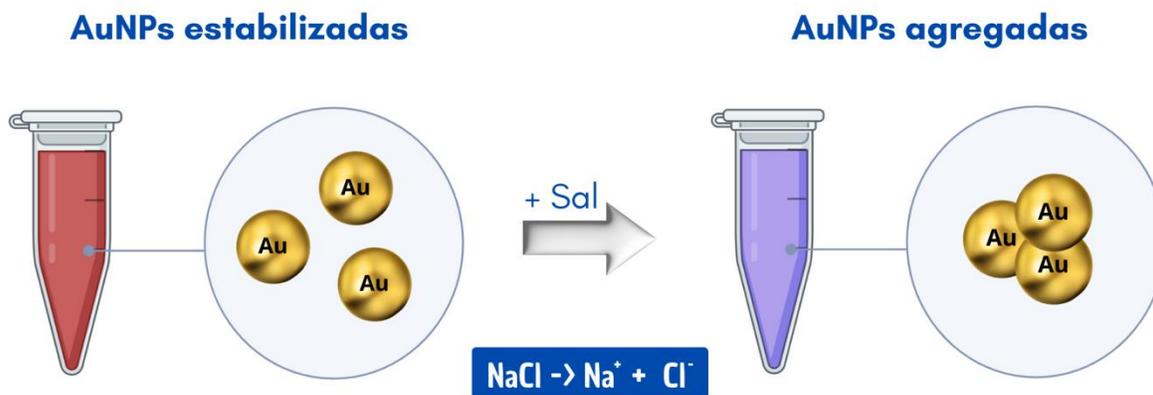


Figura 6. Agregación de las soluciones coloidales de AuNPs en presencia de una solución salina de NaCl

La estabilización estérica se relaciona con el proceso mediante el cual se previene la agregación de NPs coloidales, como consecuencia de la adsorción superficial de macromoléculas, lo que favorece la formación de una capa protectora que contrarresta el efecto de aglomeración.⁴⁴ Dicho efecto se considera fundamental para el empleo de las AuNPs como elemento de reconocimiento, ya que se espera tenga un efecto colorimétrico en la solución como respuesta a la interacción de las AuNPs con los PVs, más específicamente con las proteínas de L1 de la cápside.

1.5.4 Biocompatibilidad

Investigar y analizar cuidadosamente los materiales utilizados en el área biomédica es de suma importancia debido a que interactúan íntimamente con tejidos y células del cuerpo, por lo que es esencial garantizar que sean seguros, biocompatibles y eficaces. Una comprensión profunda de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los materiales es fundamental para desarrollar dispositivos y tratamientos confiables como una alternativa para la medicina moderna.

Las AuNPs se han sometido a una amplia gama de estudios *in vitro* e *in vivo*, donde se ha reportado que, idealmente, estas interactúan de manera segura con sistemas biológicos sin causar daño, rechazo o efectos adversos, lo que les permite interactuar con células vivas.²⁶ Este hecho se debe a que el oro es un metal noble que no reacciona fácilmente con las

moléculas biológicas y por su tamaño, las AuNPs pueden ingresar a casi todas las áreas del cuerpo incluidas células y orgánulos, lo que las hace ideales para un gran número de aplicaciones biomédicas.

No obstante, cabe mencionar que la toxicidad de las AuNPs es influenciada significativamente por factores como el método de síntesis, tamaño y forma de partícula, propiedades fisicoquímicas del medio de síntesis y, por supuesto, la presencia de residuos contaminantes. Esto pueden afectar la biodistribución, la capacidad para inducir respuestas inmunes y el potencial para causar daño o alteraciones en la viabilidad celular.

Por ejemplo, existen métodos de síntesis que, al integrar estabilizantes o agentes no aglutinantes, generan una delgada capa en la superficie de la AuNPs que, incluso en concentraciones nanomolares, pueden causar daños en un entorno biológico. En contraste, métodos de síntesis 'verdes' que utilizan extractos de plantas o biopolímeros tienden a producir AuNPs menos tóxicas debido a la biocompatibilidad de los estabilizantes naturales.

1.6 Sensores

Un sensor es un dispositivo de detección de eventos y transductor de señales que proporciona cierto tipo de respuesta directamente relacionada con la presencia o ausencia de un analito objetivo.

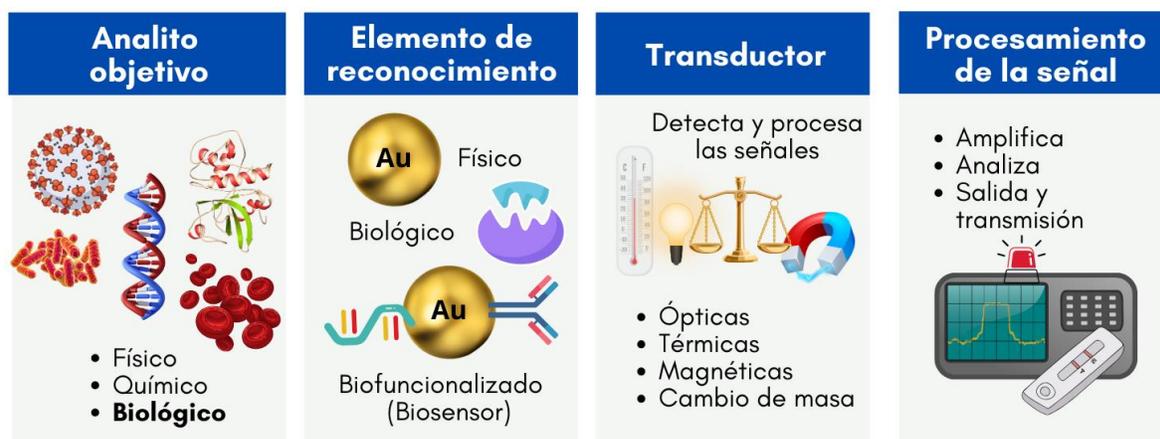


Figura 7. Elementos que componen a un sensor

Las ventajas que ofrece la tecnología de sensores respecto del resto de técnicas analíticas son claras y se citan a continuación:

- Permiten controlar el parámetro analítico de forma continua y en tiempo real.
- Los resultados pueden ser visualizados directamente por el usuario y, además, simultáneamente en una plataforma informática que puede crear bases de datos para un procesamiento estadístico.
- Se trata de una tecnología de bajo costo y confiable que permite realizar análisis de forma rápida y sin necesidad de personal altamente especializado.
- Los sensores son dispositivos portátiles, de fácil manejo caracterizados por brindar resultados de manera sencilla y simplificada.

Esencialmente la función de un sensor es ser el puente entre las enfermedades y padecimientos, y las señales cuantificables; lo cual permitirá el estudio y análisis de diversos fenómenos biológicos.

En una perspectiva biomédica, donde se involucran organismos vivos y elementos biológicos, un sensor puede convertir parámetros físicos (ej. movimientos corporales, temperatura), químicos (ej. ácido úrico, glucosa, gases) y biológicos (ej. enzimas, proteínas, bacterias, virus) en una señal que se puede medir óptica o eléctricamente.³⁴

1.6.1 Sensores colorimétricos basados en AuNPs

Como lo hemos mencionado a lo largo de este trabajo de investigación, las propiedades ópticas únicas de las AuNPs, combinadas con su facilidad de funcionalización y alta sensibilidad, las vuelve elementos prometedores con alto potencial de aplicación en el desarrollo de aplicaciones biomédicas, como se muestra en la *Figura 8*.

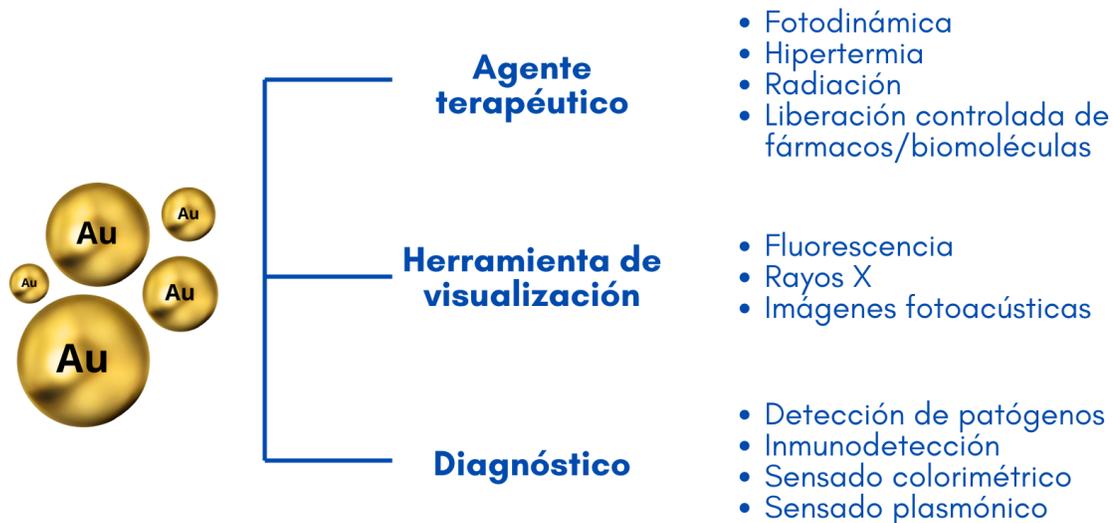


Figura 8. Aplicaciones biomédicas de las AuNPs con un panorama prometedor en una amplia gama de procedimientos médicos de vanguardia

Particularmente en este trabajo, las AuNPs se consideran componentes clave para el desarrollo de sensores colorimétricos que son propuestos como efectivos, simples y económicos para la detección rápida y específica de una amplia gama de analitos. Es por lo que ante la diversidad de materiales nanoestructurados, la capacidad de las AuNPs para funcionar como elemento de reconocimiento y, simultáneamente generar una señal óptica cuantificable, hacen a las AuNPs los elementos más utilizados en diversos sistemas de sensado y biosensado. Particularmente, los ensayos colorimétricos son una buena alternativa ya que son métodos de detección y diagnóstico más directos, los cuales proporcionan una plataforma para evaluar la presencia del analito objetivo sin necesidad de instrumentación compleja, con un tiempo de respuesta menor y con sistemas de identificación más sencillos.



Capítulo 2: Metodología de síntesis y caracterización

2.1 Métodos de síntesis de AuNPs

Existen diversas maneras de obtener AuNPs y la elección de la metodología debe ser cuidadosamente planeada teniendo en cuenta las necesidades del proyecto u objeto de estudio, sin dejar de lado aspectos ambientales, económicos y éticos. Los avances en los procesos de síntesis permiten el control preciso sobre los parámetros estructurales que gobiernan la formación de las nanopartículas, y nos otorgan la posibilidad de adaptar las propiedades de acuerdo con su uso específico.

Los métodos de síntesis de nanopartículas suelen agruparse en dos categorías, las aproximaciones “top-down” y las “bottom-up”. La primera consiste en la división de sólidos en fracciones más pequeñas; involucran procesos como la molienda o abrasión, métodos químicos, y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados. Mientras que los “bottom-up”, consisten en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución.³⁵

2.2 Síntesis de AuNPs por Ablación Láser Pulsado en medio líquido (ALPL)

Las soluciones coloidales de metales se conocen desde hace mucho tiempo, y hoy día se dispone de una gran variedad de métodos para su preparación, entre ellas la Ablación láser pulsado en medio líquido. Para el desarrollo de este trabajo de tesis se eligió emplear el método de ALPL (*véase figura 9*), considerando que nos posibilita producir soluciones coloidales en la que se puede modular la morfología y diámetro de las AuNPs mediante el control de algunos parámetros.

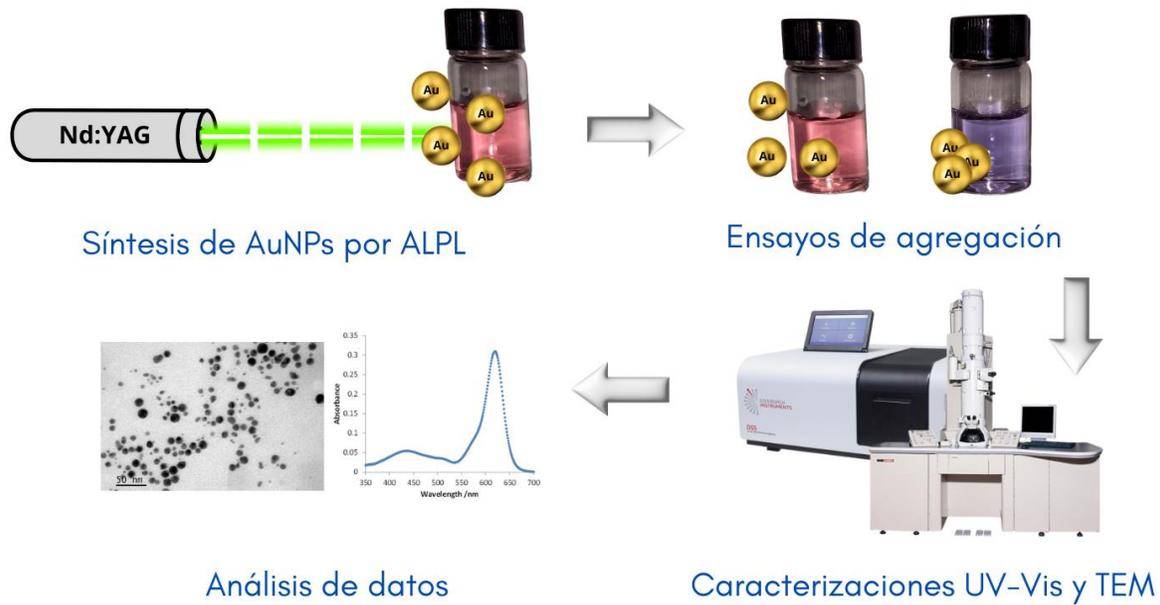


Figura 9. Metodología de la síntesis ALPL y caracterización de las AuNPs

Frente a otras técnicas, la ALPL se destaca por una serie de ventajas:

- Facilidad de montaje experimental.
- Sostenibilidad ambiental.
- Síntesis libre de contaminantes.
- Alta tasa de producción.
- Control sobre los parámetros de síntesis.
- Versatilidad en empleo de solventes.

La síntesis convencional por Ablación Láser Pulsado (ALP) consiste en hacer incidir pulsos de un láser de alta potencia con una longitud de onda específica sobre un blanco del metal precursor; acorde con la línea del láser que sea empleada, la longitud de onda puede encontrarse en el infrarrojo hasta el cercano ultravioleta. La síntesis por ALPL es una variación de la técnica original donde el blanco se encuentra inmerso en un medio líquido. Como el pulso del láser atraviesa una capa del líquido antes de irradiar al blanco, el medio acuoso debe ser elegido de manera tal que posea propiedades ópticas que permitan una eficiente interacción con el blanco.

Cuando la fuente metálica es irradiada por los pulsos, los electrones libres de la superficie absorben la energía. Si la energía del láser y el punto de focalización son adecuados, la densidad de la energía depositada sobre el blanco es absorbida y eleva la temperatura en varios miles de grados centígrados. Los electrones de mayor temperatura comienzan a desprenderse debido a procesos de calentamiento, fundición y evaporación. El resto de ellos calienta el volumen irradiado mediante colisiones y vibraciones con átomos vecinos de la red cristalina. Una vez absorbido el pulso láser por el blanco, el material en la superficie se evapora hasta llevarlo al estado del plasma que termina por propagarse en el medio líquido con una dirección ortogonal a la superficie del blanco. Los electrones libres, con su carga negativa, interactúan con los iones metálicos del plasma generado, creando una nube electrónica en la zona de incidencia del láser. Esta nube atrae más iones metálicos donde se van formando pequeños núcleos y, a medida que el blanco se irradia con los pulsos, se forman las nanopartículas.^{36,38}

2.3 Parámetros de control

El proceso de ALPL conlleva complejos fenómenos físicoquímicos que se evidencian al producir soluciones de NPs en diferentes solventes, donde se exhiben diferentes características y propiedades a pesar de utilizar el mismo blanco y que su producción haya sido bajo las mismas condiciones experimentales y parámetros de síntesis.

A fin de mejorar la eficiencia y ejecución de la técnica, se deben de tener en cuenta los siguientes parámetros de síntesis:

- ***Longitud de onda del láser:*** Determina la profundidad de penetración y la eficiencia con la que el material del blanco absorbe la energía del láser. La absorción óptima ocurre cuando la longitud de onda coincide con la banda de absorción del material.³² Longitudes de onda más cortas generalmente producen partículas más pequeñas debido a la mayor densidad de energía y la ablación más localizada.

- ***Energía de los pulsos del láser:*** La energía determina la cantidad material que se ablaiona en el blanco y, por lo tanto, la cantidad de vapor de oro que se produce. Mayor energía del láser conduce a una mayor tasa de ablación, es decir, a la formación de un mayor número de nanopartículas.
- ***Frecuencia de repetición del láser:*** Recordemos que cuando hablamos de la frecuencia nos referimos a la rapidez de disparo, por lo que la velocidad a la cual las nanopartículas son producidas depende de cuántas veces por segundo se irradie el blanco con el láser. Una frecuencia de repetición más alta permitirá producir AuNPs en un menor tiempo, obteniendo así una alta tasa de producción.
- ***Ambiente:*** Las nanopartículas comúnmente son sintetizadas en condiciones de temperatura y presión estándar, pero si se llegarán a modificar estos parámetros, podrían afectar a la morfología y la distribución de tamaño de las nanopartículas. Otro aspecto que también es considerado como ambiente es el tipo de solvente utilizado, pues las características propias de cada líquido conferirán una estabilidad coloidal diferente a las partículas formadas.
- ***Composición y pureza del blanco:*** Las propiedades que presentan las nanopartículas sintetizadas estarán dadas por el comportamiento a escala nanométrica de los elementos presentes en la muestra, por lo que la pureza y composición química del blanco son cruciales para cumplir los objetivos de la aplicación.
- ***Umbral de ablación del blanco metálico:*** Es un parámetro crítico en la síntesis de nanopartículas por ablación láser. Su valor determina las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas, como su tamaño, morfología, cristalinidad, pureza y propiedades ópticas. El objetivo es encontrar el umbral de ablación que maximice la eficiencia de la síntesis de nanopartículas y minimice la formación de subproductos no deseados. Cabe mencionar que un blanco de oro reporta un valor de fluencia umbral de $1,65 \pm 0,09 \text{ J/cm}^2$ con pulsos de un láser de 1064 nm.³⁶

Tabla 2. Importancia del umbral de ablación en la síntesis de nanopartículas metálicas por ALPL (adaptado de N. Chichkov, C. Momma et. al)³⁷

	Mecanismo de ablación	Eficiencia de síntesis	Propiedades fisicoquímicas
<Valor del umbral	No se produce ablación	No se generan nanopartículas	Pueden tener defectos y ser de baja cristalinidad
=Valor del umbral	Se produce ablación por evaporación	Se genera la cantidad mínima de nanopartículas	Menos defectos y mayor cristalinidad
>Valor del umbral	Se produce ablación por desintegración explosiva	Se genera una mayor cantidad de nanopartículas, pero con mayor probabilidad de formación de subproductos no deseados	La nanopartícula puede presentar defectos y una estructura cristalina amorfa

2.4 Instrumentación y obtención de soluciones de AuNPs

Para la fabricación de las soluciones coloidales de AuNPs, se utilizaron los siguientes equipos y materiales:

- Láser pulsado de alta energía modelo EKSPLA NL 303HT, clase IV Nd:YAG, con un ancho de pulso de 5 ns, una energía de salida de mJ para la línea de 532 nm y una frecuencia de repetición de 10 Hz.
- Hilo de oro de 0.25mm de diámetro de la marca Alfa Aesar con pureza de 99.998%.
- Solventes: Etanol (Alcohol Etílico Absoluto, J.T. Baker, Grado ACS, 99.5%), Isopropanol (2-Propanol, J.T. Baker, Grado ACS, 99.5%), agua desionizada y agua destilada.

El blanco de oro de alta pureza se introdujo en los frascos de 15ml vidrio de fondo y fue llenado al 95% de su capacidad con alguno de los solventes. Este fue colocado a una

distancia de 1.25m de la salida del láser en un soporte que permite modificar manualmente los ejes x, y, z; de tal manera que se pudiese ajustar el punto incidente del láser sobre el blanco, con el fin de optimizar la formación de AuNPs.

Se utilizó el láser de Nd:Yag en su segunda configuración que corresponde al módulo armónico que emite una longitud de onda de 532nm con una energía de 360mJ. Cada solución preparada se sometió a 2 rondas de irradiación durante 5 minutos. Las AuNPs producidas fueron almacenadas a temperatura ambiente y se monitorearon continuamente para identificar cambios en su coloración o en su estabilidad coloidal.

2.5 Ensayos de agregación

Las AuNPs requieren un análisis extenso para comprender su comportamiento natural y establecer patrones referenciales que permitan la comparación al interactuar con el sistema biológico de interés. Es por ello que se llevaron a cabo múltiples ensayos a fin de identificar la concentración óptima y el volumen mínimo de solución de NaCl necesaria para inducir la agregación entre las AuNPs. En este proceso no sólo se buscó una evaluación mediante los espectros de absorción UV-Vis, sino que principalmente, por inspección visual se tuviera la capacidad de identificar el cambio de colorimetría de la solución; de tal manera que exhiba un cambio evidente en la solución siendo lo suficientemente contrastante para revelar la agregación.

Se comenzó por preparar 3 soluciones de NaCl en diferentes concentraciones molares: 0.1M, 0.5M y 1M, usando como solvente agua desionizada. Con ayuda de una micropipeta, por cada solución coloidal de AuNPs se incorporaron 3ml en recipientes cilíndricos estériles de vidrio rotulados del 1 al 4. En seguida, las muestras 1 de cada solvente, que funcionaron como control, recibieron únicamente 500µl de agua desionizada. Las muestras 2, 3 y 4 recibieron 500µl de las soluciones a 0.1M, 0.5M y 1M de NaCl, respectivamente.

Se tomó evidencia fotográfica de las soluciones inmediatamente y a las 24 hrs posteriores al ensayo, *véase figura 13*. Además, se realizaron análisis cuantitativos de dichas soluciones por medio de caracterizaciones por espectroscopia de absorción UV-Vis.

Con el fin de determinar el volumen mínimo necesario, se procedió a agregar gradualmente microlitros de soluciones de NaCl, comenzando por 100 μ l hasta llegar a los 300 μ l. Este cambio se manifiesta como la transición de la solución de nanopartículas desde su color rojo característico hacia tonalidades violetas, relacionadas con un desplazamiento a mayores longitudes de onda de la RPS.

2.6 Espectrometría UV-Vis

Un espectrofotómetro UV-Vis es un instrumento empleado para medir la absorbancia, la transmitancia y la reflectancia de un material en un intervalo de longitudes de onda que va desde el espectro ultravioleta hasta el infrarrojo (200-1100 nm). La radiación incidente sobre la muestra se encuentra caracterizado por una intensidad, al comparar la intensidad de la radiación transmitida a través de la muestra, se pueden realizar mediciones de transmitancia y absorbancia. En este trabajo se empleó un espectrofotómetro Perkin Elmer® Inc. Waltham MA modelo Lambda 25, a fin de realizar mediciones de absorbancia, ya que estas nos permiten identificar la longitud de onda de RPS característica de las AuNPs. La absorción de las AuNPs en la región visible del espectro electromagnético es altamente sensible al tamaño de partícula, por lo que permite detectar cambios sutiles en el tamaño, siendo una herramienta ideal para monitorear el comportamiento de agregación.

Se realizó la caracterización de las soluciones (etanol, isopropanol, agua destilada y agua desionizada) en los distintos solventes, esto para muestras puras de AuNPs, así como para las que se les incorporo solución salina con dependencia de la concentración de NaCl (0.1M, 0.5M y 1M). Esto posibilita identificar el desplazamiento de la longitud de onda del SPR inducido por fenómeno de agregación.

2.7 Microscopía Electrónica de Transmisión

La Microscopía Electrónica de Transmisión es una técnica de caracterización que proporciona imágenes de alta resolución que permite realizar la observación directa de materiales a escala nanométrica, lo que es crucial para visualizar la morfología, sus características estructurales y cristalinas. Este microscopio utiliza un haz de electrones, con elevada energía y pequeña longitud de onda (del orden de distancias interatómicas), el cual incide sobre la muestra a fin de generar imágenes con elevadas magnificaciones. El haz incidente permite que exista la transmisión de electrones, los cuales se analizan como función de onda, a fin de obtener la información de interacción (dispersión y difracción) con la muestra y así generar las imágenes.

Inicialmente se caracterizaron 4 muestras, las correspondientes a las soluciones de AuNPs suspendidas en etanol, isopropanol, agua destilada y agua desionizada. La caracterización se realizó en el Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica del CINVESTAV-IPN con un microscopio electrónico de transmisión modelo JEM-ARM200F de la marca JEOL® con una diferencia de potencial de 80 kV.

2.7.1 Preparación de la muestra

Se utilizaron rejillas de cobre de 200 líneas/pulgada (Electron Microscopy Sciences Inc., Hatfield PA) que fueron recubiertas por una película delgada de Cloroformo y Polivinil 3%. Posteriormente, se cargaron 5µl de la suspensión de AuNPs sobre el recubrimiento de la rejilla y se dejó reposar la gota durante 3 minutos. Pasado este tiempo, se retiró cuidadosamente con un papel filtro Whatman 1 mm tocando la parte superior de la gota de tal manera que no entrara en contacto con la membrana para evitar contaminaciones. Este proceso se repitió 3 veces con cada suspensión de AuNPs para asegurarnos que gran parte de las nanopartículas se pudieran sedimentar y adherir correctamente sobre la membrana.

2.8 Producción de PVs de VPH-16

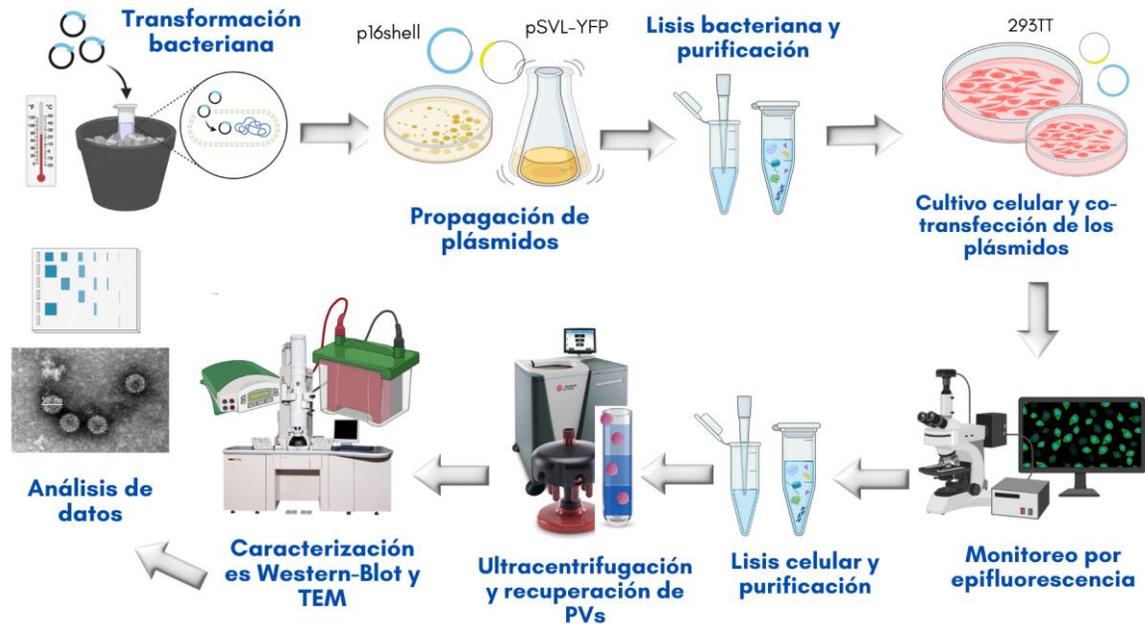


Figura 10. Metodología de la producción de PVs de VPH-16 en la línea celular 293TT

Como ya se ha mencionado, los PVs son una excelente herramienta biológica que nos permite estudiar el comportamiento de primer contacto de los viriones nativos con considerables ventajas. En este proyecto, se produjeron PVs de VPH-16 por el método de transfección implementando un modelo *in vitro* bidimensional: placas de cultivo de la línea celular 293TT.

La metodología hace uso de células transfectadas con un pseudogenoma del virus del VPH-16, en el cual existen regiones que contienen secuencias de nucleótidos que codifican para que la maquinaria celular traduzca y forme la cápside viral del VPH compuesta por las proteínas estructurales L1 y L2. Cada paso se detalla a continuación.

2.8.1 Propagación de los plásmidos

Para aumentar las probabilidades de éxito en la formación de los PVs, es fundamental que los plásmidos utilizados en el proceso de transfección sean de calidad, estén concentrados, que el ADN sea de alta pureza, libre de contaminantes y que cuenten con estabilidad

estructural para evitar interferencias con la transfección, expresión de las proteínas y, por supuesto, minimizar la posibilidad de mutaciones o degradación del material genético. Es por lo que la metodología de obtención de PVs de VPH-16 comienza por la propagación de los plásmidos: p16shell y pSVL-YFP. Esta técnica de biología molecular nos permite obtener plásmidos “frescos” que aumentan la eficiencia de transfección y mejora la tasa de éxito para la obtención de PVs.

El plásmido p16shell codifica a las proteínas L1 y L2 que tiene la capacidad de autoensamblarse y formar la cápside viral de morfología icosaédrica característica del VPH. Por otro lado, el plásmido pSVL-YFP actuará como pseudogenoma, este plásmido contiene el promotor de SV40 con su origen de replicación de ADN y codifica a la proteína del gen reportero. El pSVL-YFP expresa una proteína globular derivada de la medusa *Aequorea victoria*, que bajo excitación fotónica presenta fenómenos de fluorescencia, permitiendo monitorear fácilmente el proceso de formación y replicación de los PVs.

La propagación de los plásmidos se hizo por medio de transformación de bacterias *Escherichia coli* DH5 α competentes con el método de choque térmico. Para ello, las bacterias competentes se mezclan con el ADN del plásmido a propagar para, posteriormente, someter la mezcla a cambios bruscos de temperatura. Primero, la mezcla de transformación se incubó a 4°C durante 30 minutos, en seguida, fue calentada súbitamente en un baño a 42°C durante 2 minutos y, finalmente, fue colocada sobre hielo por 5 minutos. Este choque térmico induce la desestabilización de la membrana bacteriana permitiendo la entrada de ADN exógeno, en este caso los plásmidos p16shell y pSVL-YFP. Cuando los plásmidos de interés ya están dentro de la bacteria, se replican utilizando los mecanismos de replicación del ADN propios de la bacteria, formando un considerable número de copias (>1000 copias por célula).

Posteriormente se prepararon dos cajas petri con LB agar sólido (Peptona de caseína (1%), Extracto de levadura (0.5%), NaCl (1%), Agar (1.5%)) como medio de cultivo y fue suplementado con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antibiótico Ampicilina, para que el crecimiento y reproducción de las DH5 α transformadas con los plásmidos de interés, fuera selectivo. En

un área estéril, un asa bacteriológica fue sumergida en la mezcla de las bacterias ya transformadas de tal manera que una alícuota por cada vial fuera espatulada cuidadosamente por toda la placa. Ambas cajas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.

Pasado este tiempo, se visualizaron e identificaron aquellas colonias aisladas correspondientes a cada plásmido y, nuevamente en condiciones de esterilidad, fueron recolectadas y llevadas a una solución LB líquido (Peptona de caseína (1%), Extracto de levadura (0.5%), NaCl (1%)) e incubadas bajo agitación vigorosa (200rpm) durante 17 horas a una temperatura de 37°C, que le brindan las condiciones a las bacterias para poder replicarse de forma exitosa.

Los plásmidos son recuperados por medio de un lisado bacteriano y purificados de restos celulares, material genético y cualquier otro contaminante residual para su uso posterior. La muestra fue centrifugada a 500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C, de tal manera que, por fuerza centrífuga, el plásmido pudiera separarse del resto de los componentes. Se decantó el medio y el pellet bacteriano se resuspendió en 4 ml de buffer P1 (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) y se utilizó el vórtex para homogenizar. Enseguida se añadieron 4 ml de buffer P2 (NaOH 0.1 M y SDS al 1%), esto se mezcló por inversión 6 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posterior a esto se agregaron 4 ml de buffer P3 frío (Acetato de potasio 1.5 M, pH 5.5), se mezcló por inversión 6 veces y luego se incubó 20 minutos en refrigeración a 4°C.

Para obtener los plásmidos se siguieron las instrucciones del fabricante. Primeramente, se clarificó el sobrenadante haciéndolo pasar por un filtro (QIAfilter Midi Cartridges), el sobrenadante eluido de la columna fue recolectado en un tubo cónico de 15 ml, enseguida se precipitó el ADN añadiendo 0.7 volúmenes de isopropanol absoluto frío, se mezcló y fue dividido en microtubos de 1.5mL para una posterior centrifugación a 13,500 rpm durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, se decantó el sobrenadante y se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70% centrifugando a 13,500 rpm por 10 minutos por lavado, después se decantó el etanol para dejar secar el pellet a temperatura ambiente el cual fue resuspendido en 200 µL de agua libre de nucleasas (H₂OLN).

2.8.2 Cultivo celular de la línea celular 293TT

La línea celular 293TT es una versión modificada de la línea HEK293T, esta es una línea celular epitelial humana derivada del riñón embrionario, que fue diseñada y genéticamente modificada específicamente para sobreexpresar el antígeno T grande del virus simio SV40. Esta modificación permite una alta eficiencia en la producción de partículas virales, lo que la hace particularmente útil en estudios relacionados con la biología de virus como VPHs, debido a que se trata de células inmortalizadas, altamente transfectables y con una tasa de proliferación elevada.³⁹

Estas características las convierten en un sistema modelo de gran valor para la investigación biomédica. Su fácil cultivo, rápido crecimiento y alta eficiencia en la producción de proteínas las hacen idóneas para la generación de vacunas de adenovirus destinadas a terapia génica, profilaxis y oncología.³⁹ Además, su capacidad para amplificar vectores virales y replicar partículas víricas de manera eficiente, junto con su baja inmunogenicidad y alta actividad terapéutica, las posicionan como la herramienta ideal para este proyecto de investigación. Para trabajar correctamente, las células debían estar en buen estado fisiológico, por lo que fue importante cumplir estrictamente con sus condiciones de cultivo descritas en la *figura 11*.



**Línea celular
293TT**

Medio de cultivo

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS), penicilina (50 µg/ml), estreptomycin (50 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) (PAA Laboratories, Inc., ON, Canadá) y 200 µg/ml de higromicina (Thermo Fisher Scientific).

Subcultivo

- Pases generalmente cada 2-3 días cuando alcanzan un 80-90% de confluencia
- Uso de tripsina-EDTA 0.25% para la disociación de las células
- Rangos de división 1:10 para mantenimiento y 1:3 para transfección

Condiciones de incubación

- Temperatura: 37°C
- Atmósfera: 5% CO₂

Figura 11. Condiciones de cultivo de la línea celular 293TT utilizadas en el procedimiento experimental para la producción de pseudovirus

Después de monitorear las condiciones de cultivo mediante pases de mantenimiento, se sembraron 3 platos de cultivo de 100 mm de diámetro (Corning 430167) en un rango de dilución 1:3 y fueron colocadas en incubación. Pasadas 24 horas se pudo observar un estado de crecimiento activo obteniendo una confluencia aproximada del 70%, lo que nos indicó que se encontraban listas para comenzar. Los cultivos se sometieron a 2 rondas de lavado de 5ml con buffer PBS (NaCl 0.8%, Na₂HPO₄ 0.14%, KH₂PO₄ 0.024%, agua desionizada al aforo) para retirar cualquier resto de medio que pudiese intervenir con la transfección.

2.8.3 Transfección de los plásmidos

Se realizó una co-transfección de los plásmidos p16shell y del pseudogenoma pSVL-YFP en las células 293TT, es decir, se transfectaron los dos plásmidos de manera simultánea dentro de la célula. Se agregaron 6.5 µl del plásmido p16shell y 5.10 µl del pseudogenoma pSVL-YFP, estos volúmenes corresponden a concentraciones aproximadas de 6529.2 y 7105.8 ng/µl, respectivamente. Ambos fueron incorporados a la mezcla sustituto del medio de cultivo de las células junto con 25 µl del agente Lipofectin de la marca Invitrogen® (Thermo-Fisher) y 430 µl de medio Opti-MEM para asegura una preparación homogénea y estable de los complejos para la entrega eficiente del material genético a las células. El Lipofectin es una mezcla de fosfolípidos que se unen a los ácidos nucleicos y cuando entra en contacto con las células, los fosfolípidos se fusionan con las membranas celulares, permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen en el citoplasma de la célula.

Una vez dentro, las secuencias de ácidos nucleicos son transportados al núcleo donde son expresados por la maquinaria celular. Cada 30 minutos por 5 horas, se mezclaron suavemente para que los plásmidos y el Lipofectin se distribuyeran homogéneamente sobre el cultivo. Posteriormente, la mezcla fue neutralizada con 2.5 ml de medio DMEM completo y se dejaron reposar por las siguientes 24 horas.

2.8.4 Monitoreo por Microscopía de Fluorescencia

Las células post-transfectadas fueron visualizadas detalladamente en un microscopio invertido con epifluorescencia. Nuestro objetivo fue observar el color brillante característico de la proteína YFP expresada por el pseudogenoma para controlar y monitorear con mayor facilidad el proceso de producción de los PVs. Se monitoreó que la expresión de YFP aumentara en función del tiempo y, con base a ello, analizar la intensidad de luz emitida para determinar la eficiencia de transfección. Después de haber sido monitoreadas a las 17, 30 y 55 horas post-transfección (*véase figura 17*), se puede inferir que las células introdujeron exitosamente los plásmidos pues se está expresando correctamente la proteína fluorescente del plásmido pSVL-YFP y, teóricamente en este punto, la maquinaria de las células 293TT también debió de haber producido y ensamblado las proteínas L1 y L2 correspondientes al plásmido p16shell.

2.8.5 Lisado celular, separación y purificación

Como los PVs se produjeron y formaron dentro de las células, se llevó a cabo un proceso de lisado celular para romper sus membranas y recuperar el contenido. Esto se logró recolectando las células transfectadas cuidadosamente en viales estériles y añadiendo una solución de MgCl₂ 0.5M y detergente Brij58 a una concentración final de 0.25%, e incubando a 37°C por 24 horas. Estos dos compuestos ayudan a romper la membrana celular de forma suave y eficiente.

Como era de esperarse, después de la lisis el resto de los componentes celulares también se incorporaron en la muestra. Pasadas 22 horas de haber comenzado el proceso de lisis, se trató con una solución de Benzonasa durante 120 minutos, la cual se encarga de degradar componentes celulares residuales (ADN y el ARN), evitando así que estos interfieran con los ensayos posteriores. Adicionalmente, para precipitar los residuos proteícos contaminantes, se agregó un volumen del orden de microlitros de NaCl. Esto vuelve insolubles las proteínas presentes, aglomerándolas en la superficie, lo que facilitó su extracción. La muestra restante fue clarificada a través de centrifugación durante 15

minutos a 2000 rpm a 4°C. De esta forma, se pudo recuperar el sobrenadante correspondiente al volumen donde se encuentran suspendidos los PVs.

Para purificar la muestra y asegurarnos de obtener la mayor cantidad de PVs con una cápside estructuralmente estable, se procedió a ultracentrifugación isopínica. En un tubo para ultracentrífuga se añadió medio de separación Optiprep™ de la marca Sigma Aldrich® en un gradiente escalonado de concentración de 27%, 33% y 39%. Las muestras de los PVs obtenidas de los lisados, fueron cuidadosamente colocadas por la pared superior del tubo, de manera que estas quedan suspendidas en el gradiente. Después, los tubos fueron llevados a una ultracentrífuga XPN-100 (Beckman Coulter Inc., La Brea CA) en un rotor de columpio Beckman SW40 Ti durante 20 horas a 170,000 rcf a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se observó un bandeo perpendicular a lo largo de los tubos que, una vez identificados, se recuperaron delicadamente con una jeringa a través del tubo para obtener las muestras de los PVs.

A partir de aquí, las muestras se manipularon con materiales de baja adherencia para evitar que los PVs se quedaran pegados al plástico a lo largo del proceso.

En este punto, cabe recalcar que la muestra fue separada en base a su densidad, por lo que muchas otras partículas pudieron coincidir en la misma banda, pero ser de diferente tamaño a 50-60nm, intervalo característico de los PVs. Es por ello que se utilizaron columnas de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), a fin de separar las biomoléculas según su tamaño en función de su capacidad para difundirse a través de una matriz porosa. Un mecanismo donde las moléculas más pequeñas se pudieron difundir a través de los poros, mientras que las moléculas más grandes quedaron excluidas. Finalmente, las muestras fueron cargadas en columnas de la marca Sephadex™ G-25-M y con un buffer DPBS (NaCl 137mM 0.81%, KCl 2.7mM 0.02%, Na₂HPO₄ 8.1mM 0.12%, KH₂PO₄ 1.5mM 0.02%, CaCl₂ 0.9mM 0.013%, MgCl₂ 0.5mM 0.01%) + NaCl 0.5M se hicieron 12 rondas de recuperación de fracciones de 500µl las cuales fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

2.9 Caracterización de los PVs

2.9.1 Inmunotransferencia

La inmunotransferencia, coloquialmente conocida como *Western-Blot*, es una técnica de biología molecular de múltiples pasos utilizada para la detección y semi-cuantificación de proteínas, que permite separar e identificar una proteína de interés específica. En este caso nuestro objetivo fue detectar la presencia de la proteína que forma mayoritariamente la cápside viral: L1, para identificar las fracciones donde se encontraban los PVs.

El primer paso constó de la preparación de un gel de acrilamida al 8%, el cual fue introducido en una cámara de electroforesis con buffer Tris-Glicina (Tris(hidroximetil)aminometano 10%, ácido glicina 10%). Se cargaron 20µl de las muestras de los PVs y 20µl de buffer Laemmli 2x (Tris-HCl: 0.125 M, pH 6.8, glicerol 20%) en los pozos disponibles, es decir, un volumen total de 40µl por pozo y se incluyó un marcador de peso molecular como referencia. Posteriormente, la cámara se conectó a una fuente de poder la cual aplica un campo eléctrico donde el gel se sometió a una corriente constante de 30mA durante 4 horas.

Después de observar la migración de las proteínas a través del gel, este fue limpiado y colocado en un equipo especializado de transferencia, Transfer-Blot Turbo® Bio-Rad. Se colocó un paquete compacto, compuesto por esponja delgada, papel filtro, membrana, gel, papel filtro y esponja delgada, en ese orden específico; de tal manera que el gel quedó en contacto directo y a presión con una membrana especializada de transferencia, en un medio con buffer de transferencia (Tris-base 25 mM, Glicina: 192 mM, Metanol: 20%, pH 8.3). El equipo indujo una corriente de 6.3A durante 3 minutos.

En seguida, esta membrana fue tratada con diferentes sustancias en agitación a temperatura ambiente:

- Solución bloqueadora: Evita la unión no específica de anticuerpos y mejora la sensibilidad del ensayo. En este caso 5ml de una solución al 15% de leche desnatada en polvo por 2 horas. (Preparada con buffer PBS)
- Anticuerpo primario: Se incubó la membrana con 1.2ml de anticuerpo monoclonal en un rango de dilución de 1:1000 con una solución 10% de la leche desnatada en polvo durante 24 horas. Se utilizó el anticuerpo VPH-16-L1 de ratón IgG2a.
- Lavados: La membrana se sometió a 3 rondas de lavado durante 10 minutos con buffer PBS-Tween20 0.2% (Tween 20 0.2%, NaCl 0.8%, Na₂HPO₄ 0.14%, KH₂PO₄ 0.024%, agua desionizada al aforo) y 1 ronda con PBS puro (NaCl 0.8%, Na₂HPO₄ 0.14%, KH₂PO₄ 0.024%, agua desionizada al aforo). Esto para eliminar el anticuerpo presente que no se unió a la membrana.
- Anticuerpo secundario: Se incubó la membrana con 1.2ml en un rango de dilución de 1:2000 con una solución 10% de la leche desnatada en polvo durante 2 horas. Se utilizó el anticuerpo anti-ratón que tiene afinidad por el anticuerpo primario y, además, está marcado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP).
- Lavados: Nuevamente la membrana se sometió a 3 rondas de lavado durante 10 minutos con buffer PBS-Tween20 y 1 ronda con PBS puro. Esto para eliminar el anticuerpo secundario presente que no se unió al anticuerpo primario.
- Reactivo de revelado: Con ayuda de una micropipeta se distribuyó homogéneamente por toda la membrana 120 µl del reactivo Luminata.

Cuidadosamente la membrana se colocó en el equipo C-Digit Blot Scanner procurando que la cara que estuviera expuesta al reactivo de revelado se posicione directamente sobre el escáner. Las imágenes fueron procesadas y visualizadas por un equipo de cómputo.

2.9.2 Microscopía Electrónica de Transmisión

2.9.2.1 Preparación de las muestras: tinción negativa

Sobre las rejillas de cobre ya tratadas, recubiertas con la membrana delgada de Cloroformo y Polivinil 3% y con el sombreado de carbono; empleando una micropipeta utilizando

puntas de baja adherencia, se colocó un volumen de 20µl perteneciente a las fracciones donde el *Western-Blot* reveló la presencia de la proteína L1 (*véase figura 23*).

Esta gota de 20µl se mantuvo sobre la rejilla durante 5 minutos y se retiró cuidadosamente sin tocar la membrana para evitar contaminaciones y daños estructurales. Posteriormente, se preparó una solución de Acetato de Uranilo al 2% con todas las medidas de seguridad necesarias y se colocaron 3 rondas de gotas de 20µl. La primera se retiró inmediatamente al hacer contacto con la rejilla, la segunda se dejó reposar durante 30 segundos y la tercera se dejó reposar por 3 minutos.

2.10 Ensayos de agregación en ausencia y presencia de pseudovirus

Los experimentos más importantes de este proyecto son los ensayos de agregación de las suspensiones de AuNPs en ausencia y presencia de PVs. Estos nos brindarán información para determinar si las AuNPs pueden ser empleadas como elemento de reconocimiento, evaluando la respuesta óptica inducida por fenómenos de agregación de AuNPs, centrándose en la sensibilidad a la interacción con PVs, en dependencia de las concentraciones de solución salina y los volúmenes de PVs.

En este punto de la investigación, ya se tienen establecidos los siguientes criterios:

- Las AuNPs sintetizadas en agua destilada tiene una mejor estabilidad coloidal; el tamaño y la forma cumplen con el diámetro y morfología esperada; no existen conglomerados en la muestra, por lo que su comportamiento óptico es el deseado.
- Al incorporar un volumen de solución salina de 1M de NaCl a la suspensión de AuNP, se logra observar un cambio drástico del rojo característico a una tonalidad violeta, lo que nos permite determinar esta concentración como la óptima para visualizar el cambio de colorimetría.

En una placa estéril de 96 pozos de fondo plano con capacidad volumétrica de 360 µl, se realizaron los ensayos de ausencia y presencia de pseudovirus en la solución de AuNPs

sintetizadas en agua destilada. La metodología del experimento se ilustra en la *figura 12*, donde se observa la disposición de las muestras y los controles que se utilizaron en el experimento para establecer líneas referenciales que nos permitan evaluar el comportamiento y la respuesta óptica de la interacción entre las AuNPs y los PVs.

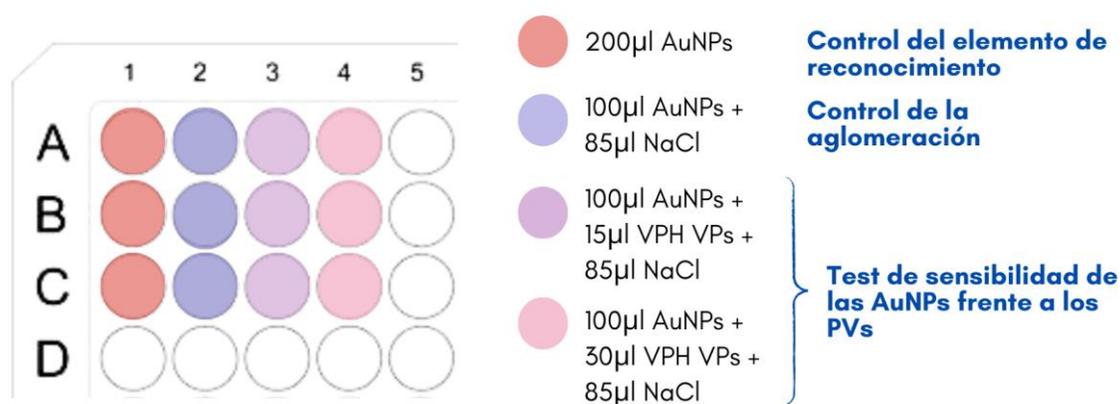


Figura 12. Metodología experimental de los ensayos de agregación en ausencia y presencia de los PVs, solución de AuNPs sintetizadas en agua destilada.

Dichas muestras fueron sometidas a un análisis (por triplicado) UV-Vis en un rango de longitud de onda entre los 200-800 nm utilizando el lector de microplacas Agilent BioTek® Synergy H4 Hybrid. Los espectros resultantes de esta caracterización se reportan en la *sección 3.7*.

Capítulo 3: Resultados y discusiones

3.1 AuNPs obtenidas por ALP



Figura 13. AuNPs producidas por ALPL en a) etanol, b) isopropanol, c) agua destilada y d) agua desionizada.

Por inspección visual, las muestras obtenidas se pueden describir cualitativamente como soluciones que exhiben una tonalidad en la gama del violeta para aquellas en las que los solventes son grupos hidroxilos: etanol e isopropanol, en tanto que, las que soluciones en agua destilada y agua desionizada exhiben una tonalidad en la gama del rojo.

Esta característica de tonalidad de la solución se ha descrito previamente en la [sección 1.5.2](#) y se puede relacionar con las dimensiones de las AuNPs, de manera que las soluciones con tonalidades en la gama del rojo se asume deben tener menor dimensión en comparación con aquellas en la gama del violeta. Asumiendo AuNPs con una morfología esférica y/o cuasiesférica se podría sugerir que sus diámetros podrían encontrarse en el rango de los 20-30 nm.

Adicionalmente, las soluciones no exhibieron un cambio perceptible en tonalidad o sedimentación después de un periodo de cuatro meses posterior a ser sintetizadas, lo que se sugiere como un indicador de su estabilidad coloidal.

3.2 Absorbancia de AuNPs

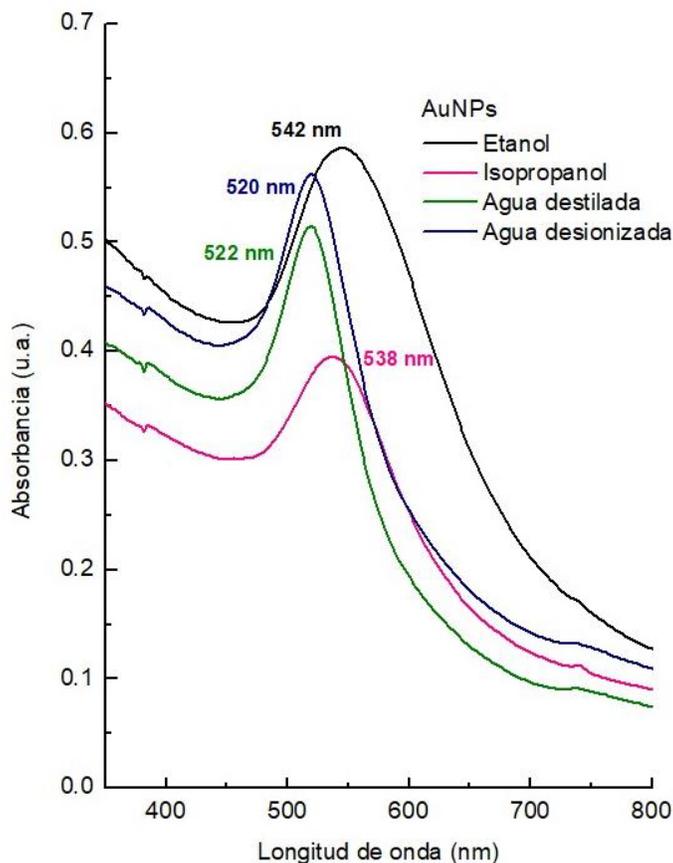


Figura 14. Espectro de absorción obtenido al caracterizar las AuNPs en diferentes solventes por espectrofotometría UV-Vis

La caracterización UV-Vis revela valiosa información sobre las propiedades de las muestras bajo estudio al analizar sus espectros de absorción. En esta discusión, exploramos detalladamente los patrones obtenidos, identificando tendencias significativas y destacando las características distintivas de las soluciones de AuNPs sintetizadas.

En la *figura 14* visualizamos el espectro de absorción donde se comparan las curvas de las AuNPs en los diferentes solventes. Asumiendo que las soluciones de AuNPs sintetizadas poseen una morfología esférica y/o cuasiesférica, se sugiere que el tamaño de la partícula es directamente proporcional a λ_{RPS} , de manera tal que el tamaño de la nanopartícula aumentará conforme aumente la longitud de onda RPS. Es por ello que podemos destacar

que para las soluciones de agua destilada y agua desionizada, la RPS se presenta a 522nm y 520nm respectivamente, sugiriendo AuNPs de menor tamaño. Por otro lado, las soluciones de etanol e isopropanol donde la RPS se observa a longitudes de onda mayores: 542nm y 538nm respectivamente, delata la presencia de AuNPs de mayor tamaño o bien, la formación de pequeños clusters.

Con el propósito de brindar una estimación del tamaño de las AuNPs se emplearán dos modelos propuestos por Haiss et al.⁴⁰ así como por Iqbal et al.⁴¹. Estas estimaciones son dependientes, respectivamente, de la magnitud de la absorbancia (A_{RPS}) y de la longitud de onda (λ_{RPS}) asociada a resonancia del plasmón de superficie. Las expresiones asociadas a los modelos mencionados son las siguientes:

$$\text{Modelo de Haiss: } d_{Haiss}(A_{RPS}) = \exp\left(B_1 \frac{A_{RPS}}{A_{450}} - B_2\right)$$

Donde $B_1 = 3.00$, $B_2 = 2.20$ y A_{450} corresponde a la magnitud de la absorbancia medida a 450 nm.

Y,

$$\text{Modelo de Iqbal: } d_{Iqbal}(\lambda_{RPS}) = 2.511\lambda_{RPS} - 1294.8$$

Por lo que a partir del análisis de los espectros y haciendo uso de dichos modelos se realiza la estimación del tamaño de partícula, magnitudes que se condensan en la *tabla 3*.

Tabla 3. Estimación de los tamaños de AuNPs producidas en distintos solventes utilizando las expresiones propuestas por Haiss et al (2007)⁴⁰ e Iqbal (2016)⁴¹

		$d_{Haiss}(A_{RPS})$	$d_{Iqbal}(\lambda_{RPS})$
Solvente	$\lambda_{SPR}(nm)$	$d(nm)$	$d(nm)$
Etanol	542	6.9	66.1
Isopropanol	538	5.7	56.1
Agua destilada	522	7.0	15.9
Agua desionizada	520	8.2	10.9

Adicionalmente se puede comentar que por comparación entre los perfiles asociados a la resonancia del plasmón de superficie, se sugiere que existe un ensanchamiento en las

curvas correspondientes a etanol e isopropanol, lo que se sugiere puede relacionarse con la agregación de AuNPs y la polidispersión de tamaños acorde con lo comentado en la [sección 1.5.3](#). Todos estos aspectos serán corroborados con un análisis completo a las micrografías por TEM.

3.3 Micrografías TEM de AuNPs

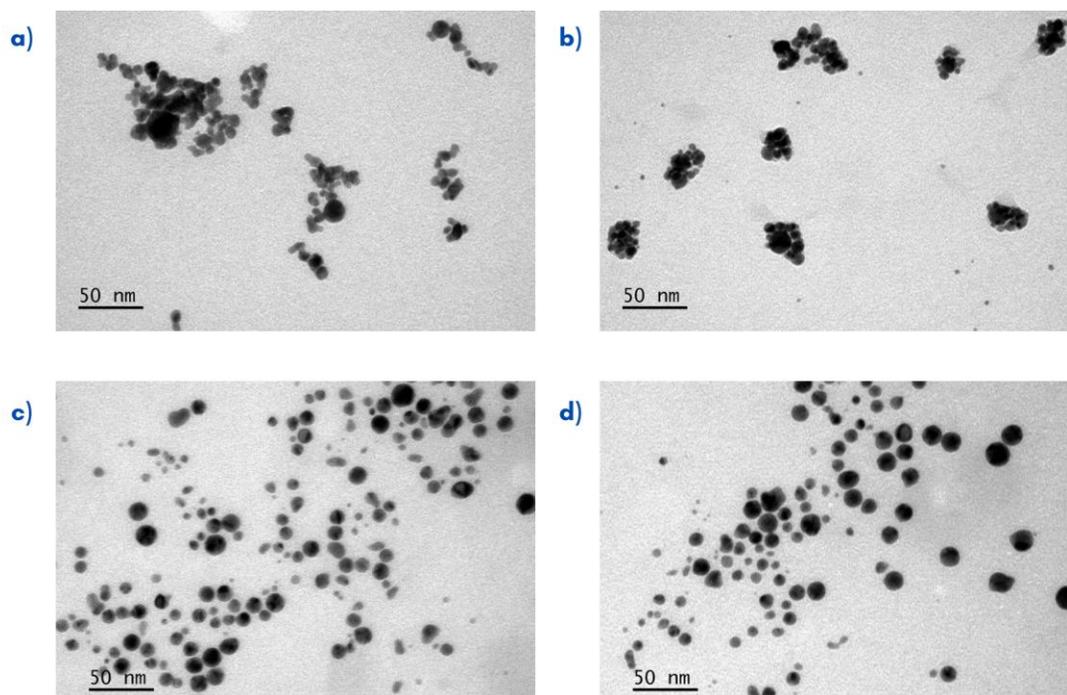


Figura 15. Micrografías TEM 250k de las AuNPs obtenidas por ALPL en a) etanol, b) isopropanol, c) agua destilada, d) agua desionizada

A primera vista, se aprecian imágenes de campo claro, donde las zonas contrastantes corresponden a la presencia de las AuNPs. Como naturalmente estas son electrodensas, su visualización no representa mayor complejidad y se logran identificar AuNPs de morfología esférica y/o cuasiesférica que son polidispersas, es decir, que no tienen un tamaño homogéneo.

En la [figura 15a\)](#) se muestran las AuNPs que fueron sintetizadas en etanol. Su comportamiento, como se había teorizado al observar la tonalidad de la solución y

sustentado por el pico de absorción en el espectro de la caracterización por UV-Vis, confirma la existencia de una aglomeración entre las AuNPs.

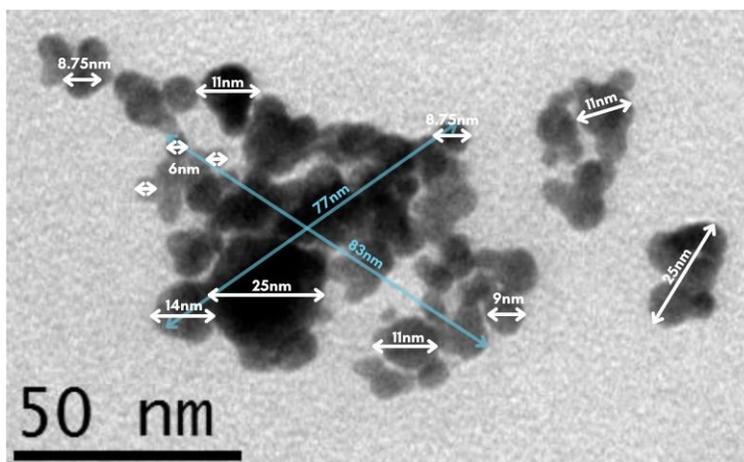


Figura 16. Análisis de tamaños de las AuNPs producidas en etanol

Si analizamos en la *figura 16* detenidamente uno de los clusters formados en etanol, podemos confirmar que las partículas presentan una amplia dispersión de tamaños, en los intervalos de entre los 6 nm, 8.75 nm, 9 nm, 11 nm e incluso diámetros de 14 nm y 25 nm, representativamente.

Un comportamiento similar es evidente en la *figura 15b)* para las AuNPs sintetizadas en isopropanol, pero estas se visualizan más dispersas a través de la rejilla y se agrupan en clusters más pequeños. Se logran identificar en la *figura 17* que las AuNPs forman aglomerados de 31.5 nm y 48 nm, conformados por partículas con tamaños de 5.7 nm, 9 nm y 15 nm, aproximadamente.

Este análisis resulta congruente con los espectros de absorción previamente analizados, pues el ancho de la curva del etanol es mayor al de todos los demás, seguido por la curva de isopropanol. Este comportamiento confirma nuevamente la naturaleza de polidispersión de tamaños y, por supuesto, la presencia de los clusters visualizados.

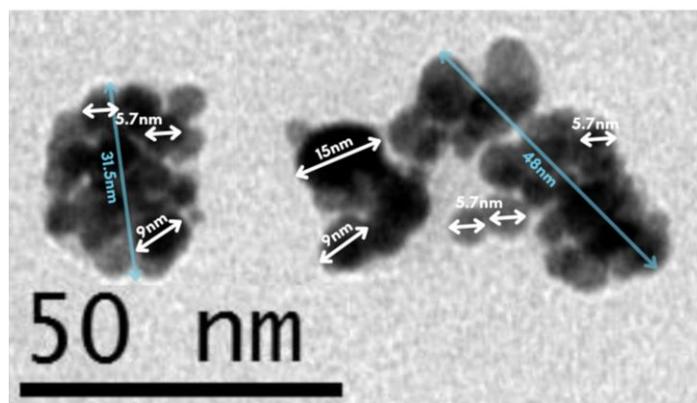


Figura 17. Análisis de tamaños de las AuNPs producidas en isopropanol

Por otro lado, en la *figura 15d)* y *15e)* encontramos a las AuNPs sintetizadas en agua destilada y desionizada, respectivamente. La morfología esférica y la dispersión entre partículas son más evidentes en estas micrografías. No existe la presencia de clusters dentro de la muestra, lo que es un gran indicador de que las partículas sintetizadas específicamente en estos dos solventes satisfacen mejor las condiciones de morfología, tamaño y dispersión.

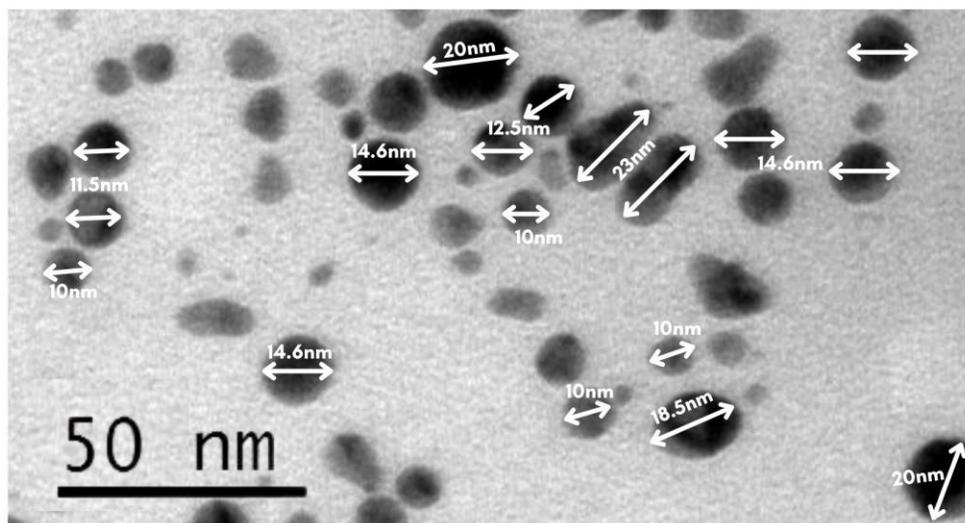


Figura 18. Análisis de tamaños de las AuNPs producidas en agua destilada

No obstante, se observa que las AuNPs no cuentan con un tamaño homogéneo, pues se detecta la presencia de partículas con diámetros menores a 20 nm. En el caso de las sintetizadas en agua destilada, se visualiza en la *figura 18* una gran cantidad de partículas

con diámetros menores a 9 nm y, representativamente, AuNPs de 10 nm, 11.5 nm, 12.5 nm, 15 nm y 20 nm.

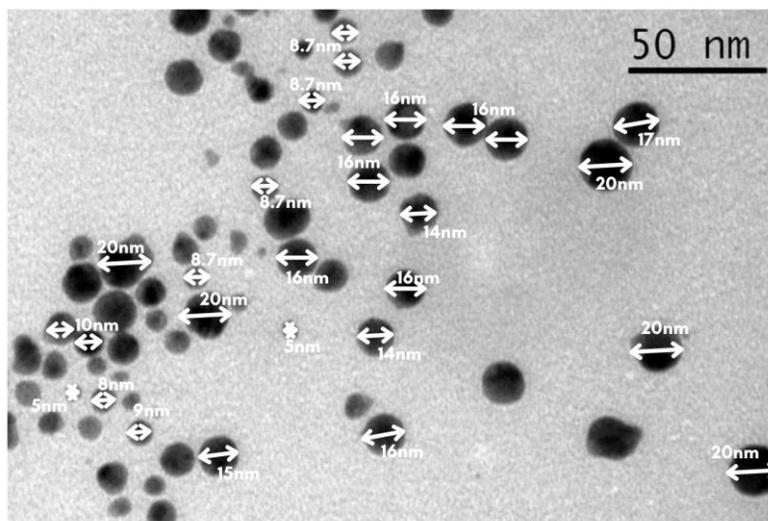


Figura 19. Análisis de tamaños de las AuNPs producidas en agua desionizada

Al analizar la micrografía de AuNPs sintetizadas en agua desionizada se logra apreciar una distribución más homogénea y una menor polidispersión de tamaño. Particularmente en la [figura 19](#) se pueden apreciar AuNPs con diámetros de 8 nm, donde a su vez existe una elevada cantidad de partículas de 16 nm, 17 nm y 20 nm. Además, se podría destacar que, incluso en las zonas donde las AuNPs se encuentran a una menor distancia una de la otra, estas no entran en contacto. Este comportamiento podría revelar una repulsión electrostática entre partículas, como se estableció en la [sección 1.5.3](#).

En adición, si se cotejan los datos obtenidos en el análisis de tamaños de AuNPs con la [tabla 3](#), podemos señalar que los propuestos por Haiss et al.⁴⁰ e Iqbal et al.⁴¹ de nos prmiten calcular estimaciones en intervalos semejantes a los datos recopilados por TEM.

Finalmente, cabe mencionar que estas caracterizaciones nos ha dado valiosa información la cual nos incentiva a realizar análisis, estudios y mejoras posteriores para complementar esta línea de investigación, entre ellas:

- Reducir la polidispersión de tamaños. Este aspecto podría corregirse al estandarizar cuidadosamente el proceso de síntesis por ALPL e identificar los parámetros a modificar para obtener mejores resultados respecto a la homogeneidad de tamaños; ya que, en cuestión a la morfología, se lograron sintetizar AuNPs esféricas exitosamente.
- Identificar los factores fisicoquímicos que evitan que las AuNPs sintetizadas en agua destilada y desionizada formen clúster y contrastarlos con las propiedades de los solventes etanol e isopropanol. Idealmente, también se podría estudiar la naturaleza de la repulsión entre las AuNPs que les permiten una mayor dispersión.
- Complementar estos estudios con un análisis estadístico para reducir la desviación estándar de los datos experimentales con las estimaciones teóricas de los métodos de Haiss et al.⁴⁰ e Iqbal et al.⁴¹

3.4 Ensayos de agregación

Recordemos que los ensayos de agregación de las AuNPs en presencia de una solución salina de NaCl tienen como objetivo identificar un cambio en la interacción entre las AuNPs en los distintos solventes. Lo anterior se establece como consecuencia de un cambio fisicoquímico en el medio de la solución derivado de la presencia de iones de Na⁺ y Cl⁻, lo que se sugiere puede promover la agregación de las AuNPs, en congruencia con lo establecido en la *sección 1.5.3*.

Dado que se busca proponer a las AuNPs como elemento de reconocimiento para la fabricación de un sensor colorimétrico que sea sensible a la presencia o ausencia de las proteínas estructurales del VPH, es deseable que las soluciones exhiban una alta sensibilidad en la detección del analito objetivo. Los resultados de estos ensayos permiten identificar cuál de las soluciones puede ser empleada como material de reconocimiento, estableciendo como criterio que se induzca un cambio evidente y detectable a simple vista en la tonalidad de la suspensión al incorporar una concentración de solución salina modulable para reproducibilidad experimental.

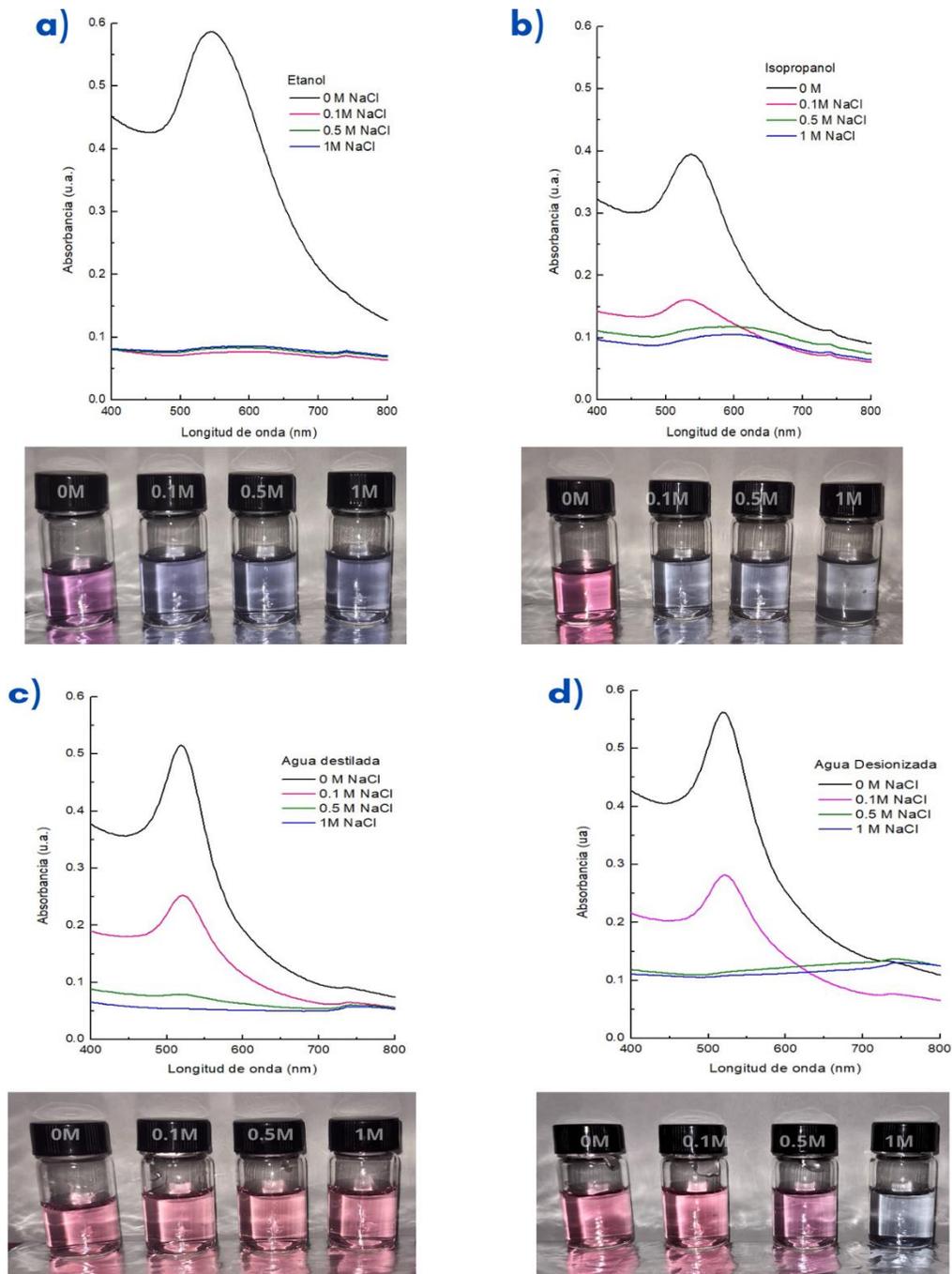


Figura 20. Espectros de absorbancia e imágenes de las soluciones de AuNPs en los ensayos de agregación. Se muestra el cambio inducido como consecuencia de la variación de la concentración de NaCl a 0 M, 0.1M, 0.5M y 1M incorporado a las soluciones de AuNPs en a) etanol, b) isopropanol, c) agua destilada y d) agua desionizada

Gracias a esto, será posible obtener una metodología sencilla de detección con un tiempo de respuesta bajo. En la *figura 20*, se logran distinguir los cambios de tonalidad que provoca someter a las soluciones a ensayos de agregación que, junto con las curvas de absorción, nos permitirán decidir qué solvente se alinea más con las necesidades de este proyecto para obtener buenos resultados.

En el espectro de absorbancia correspondiente a la figura 20a) se logra identificar que la intensidad de la señal disminuye abruptamente como consecuencia de la incorporación de la solución salina aún en pequeñas concentraciones, lo que nos indica que la aglomeración de las AuNPs en etanol ocurre a partir del 0.1 M. Un aspecto a considerar ya que la modulación de concentraciones tan bajas resultaría en complicaciones experimentales.

Por otro lado en los incisos b), c) y d) este comportamiento es evidente hasta que se incorporan soluciones de mayor concentración, donde la formación de pequeños clústers ocurre a partir de 0.5 M. Este comportamiento es observado cualitativamente al identificar un cambio gradual en las tonalidades de las suspensiones del rojo característico hacia los tonos violetas y azulados.

El comportamiento obtenido es un resultado esperado para ensayos de agregación, pues la distancia entre las AuNPs disminuye cuando se aglomeran y el diámetro de los clusters que se forman generan un cambio en la interacción entre los electrones en la superficie de las partículas que altera la RPS propia de las nanoestructuras, fenómenos ópticos que se confirman en las curvas de los espectros de absorción.

Sin embargo, debe recordarse que en los tejidos así como en los fluidos humanos existe la presencia de electrolitos (destacando Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^+), lo cual puede inducir agregación de las AuNPs. De esto, se establece que el efecto de la concentración de NaCl en la agregación de las soluciones de AuNPs es un parámetro a considerar para determinar la selección del material de reconocimiento.

Sorprendentemente, las soluciones de agua destilada en presencia de los gradientes de concentración de iones Na^+ y Cl^- , a simple vista no exhiben cambios en su tonalidad, por lo que se descarta el uso de estas muestras debido a que no permiten establecer una relación de cambio. Este fenómeno podría ser estudiado posteriormente a mayor profundidad para identificar el papel que tienen las características y/o procesos fisicoquímicos de los solventes en la síntesis por ALPL. Finalmente, en el inciso d) se presenta un cambio de tonalidad en gradiente, donde fácilmente se puede establecer una relación concentración-tonalidad sin necesidad de análisis complementarios por espectroscopía UV-Vis.

Las AuNPs sintetizadas en agua desionizada cumplen con el tamaño requerido determinado por su pico de absorción en 522 nm. La micrografía TEM confirma el tamaño, muestra su morfología esférica y evidencia la ausencia de clústers o aglomerados que puedan modificar el comportamiento óptico deseado; por lo que son las muestras ideales para realizar los experimentos finales y comprobar la interacción de la superficie de las AuNPs con las proteínas L1 y L2.

3.5 Microscopía de fluorescencia

La configuración del microscopio invertido con epifluorescencia, nos permite obtener imágenes donde de manera simultánea la población de células es visualizada al igual que la señal emitida por el gen reportero.

En la *figura 21* se muestran imágenes representativas de tres cultivos celulares de la línea 293TT, que fueron tomadas 17, 33 y 50 horas posteriores al proceso de co-transfección. Las imágenes muestran un aumento en la intensidad de la señal de la proteína fluorescente YFP con el tiempo, lo que indica la proliferación celular y la correcta transfección de los plásmidos. Se observa un incremento evidente en la señal desde las primeras imágenes hasta las últimas de cada caja de cultivo, confirmando la producción de una gran cantidad de proteína YFP por parte de las células. Esto corrobora la exitosa transfección de los plásmidos.

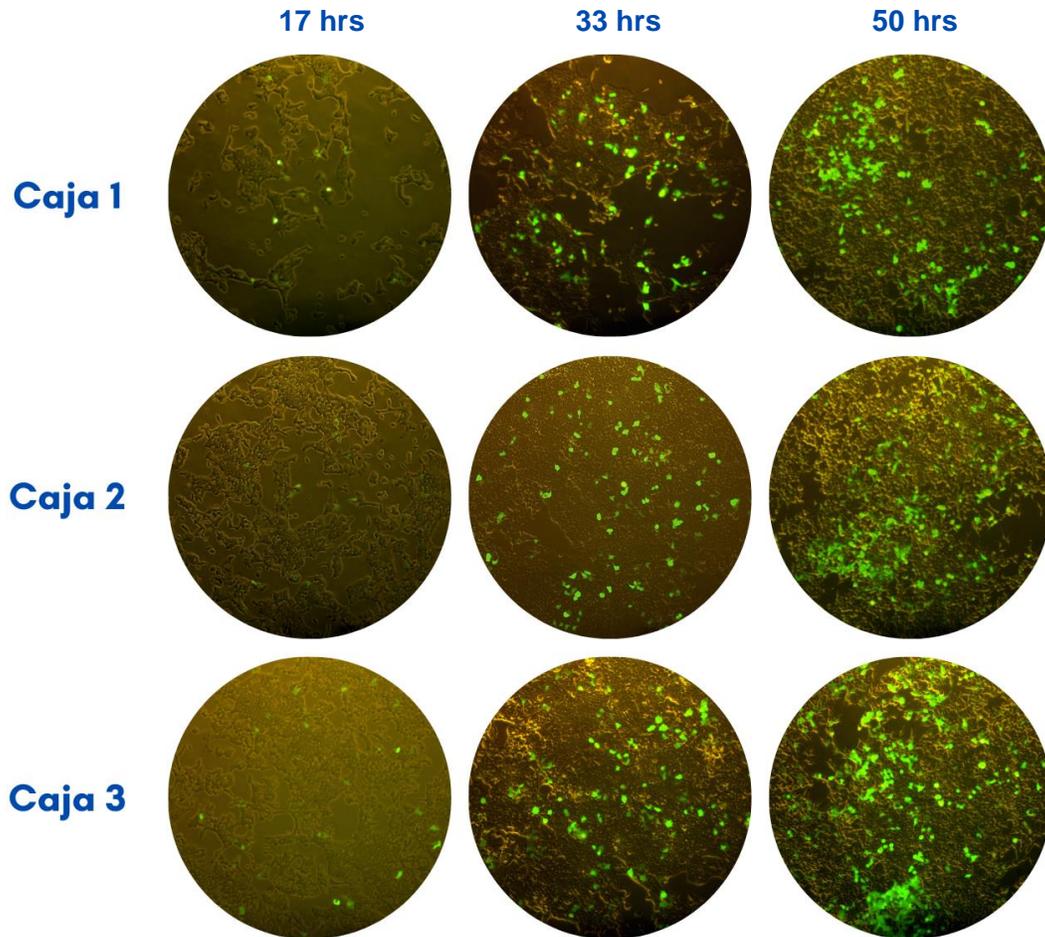


Figura 21. Monitoreo post-transfección con de los plásmidos p16shell y pSVL-YFP en la línea celular 293TT.

3.6 Bandas de pseudovirus tras ultracentrifugación en gradiente de densidad

La técnica de bandeo con separación de gradiente de densidad es una herramienta valiosa para el análisis de pseudovirus. Al utilizar un rotor de columpio para ultracentrifugar la muestra, el vector de la fuerza centrífuga actúa de manera ortogonal al eje de rotación permitiendo que la muestra se distribuya homogéneamente a lo largo del gradiente, lo que permite separar los diferentes componentes en la muestra en función de su densidad.

En la *figura 22*, se logran visualizar 3 bandas principales donde se revelan las densidades de cada población lo cual coincide con el bandeo reportado por Grady et al (1970)⁴². En este artículo detalla que las muestras de pseudovirus presentan 3 bandas características:

- *Banda superior*: Contiene pseudovirus con baja densidad, que probablemente correspondan a partículas no encapsuladas o con una envoltura incompleta y restos celulares que no fueron eliminados en la purificación.
- *Banda media*: Contiene pseudovirus con densidad intermedia, que probablemente correspondan a partículas encapsuladas con una envoltura completa.
- *Banda inferior*: Contiene elementos de alta densidad, que probablemente correspondan a partículas agregadas o con vesículas de mayor tamaño.



Figura 22. Bandas obtenidas en la separación por gradiente de densidad en medio de Optiprep™ Sigma Aldrich® en gradientes de concentración de 29%, 33% y 36%, resultado de una ultracentrifugación a 170,000 rfc durante 20 hrs a 4°C

3.7 Caracterización de la proteína L1 por Inmunotransferencia

A la izquierda de la *figura 23*, se identifica el bandeo correspondiente al marcador de peso molecular (MPM) junto con una muestra de control de la proteína L1. La caracterización de la proteína L1 del VPH-16 reporta un peso molecular de aproximadamente 55 kDa⁴³, que resulta consistente con los resultados observados, pues la migración de las proteínas a lo largo del gel se encuentra en la región próxima de los 55 kDa del MPM.

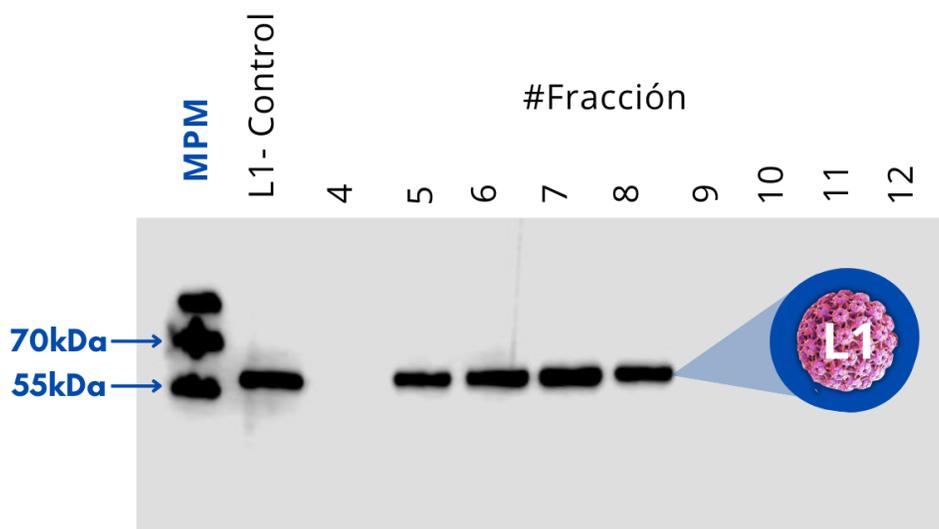


Figura 23. Caracterización por Inmunodetección de la proteína L1 de la banda intermedia recuperada del gradiente en un gel de acrilamida al 8% a 30mA durante 3 horas

En este experimento se comprueba que las fracciones 5, 6, 7 y 8 de la banda intermedia recuperada, contienen una elevada concentración de proteína L1 que se asocia a la presencia de pseudovirus.

3.8 Caracterización TEM de los PVs

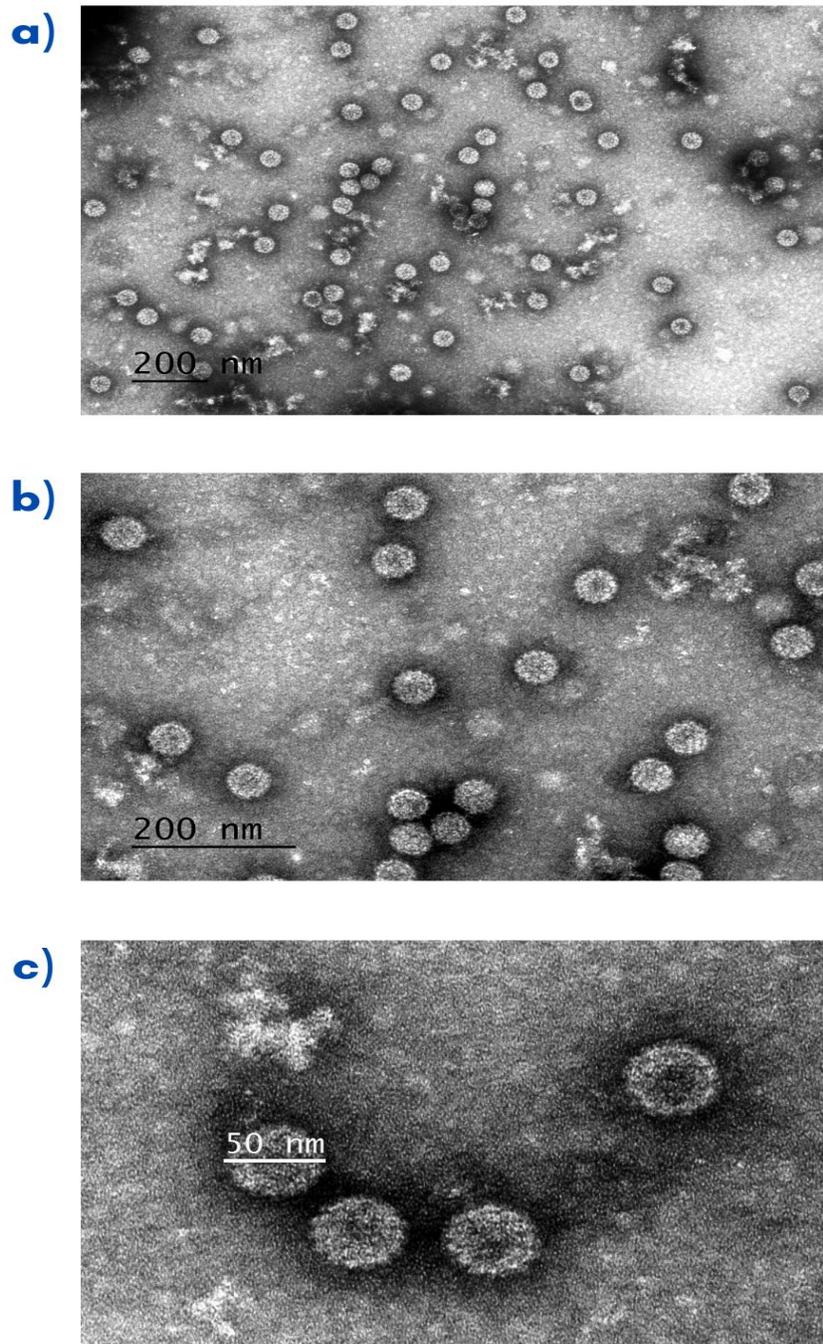


Figura 24. Micrografías TEM obtenidas a) 50K, b) 100K y c) 250K de los PVs de VPH-16 producidos. Realizadas en el Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica del CINVESTAV-IPN TEM modelo JEM-ARM200F, JEOL® con una diferencia de potencial de 80 kV

En la *figura 24*, se logran identificar partículas esféricas cuya estructura revelada muestra la organización icosaédrica típica de la proteína L1, lo que comprueba que las proteínas recombinantes sí tienen la capacidad de autoensamblarse espontáneamente para formar capsómeros que resultan en cápsides virales que logran mimetizar la estructura de los viriones nativos.

La cantidad de pseudovirus observados en la micrografía del inciso a) nos revela una producción eficiente con la metodología empleada, pues se pueden observar una gran cantidad de pseudovirus. Adicionalmente, en el inciso b) nos permite reportar cápsides íntegras y estables en su estructura lo que nos indica que los procesos de purificación y la manipulación de las muestras fueron los adecuados. Finalmente, en el inciso c) se comprueba que las estructuras icosaédricas cuentan con un diámetro ~50 nm, lo cual concuerda con el diámetro de los viriones nativos de VPH.

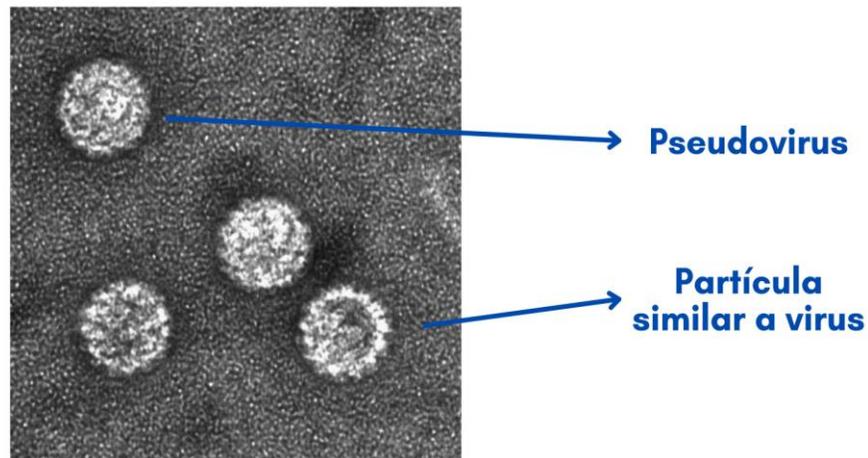


Figura 25. Diferencia entre un PVs y una VLP. Ampliación de micrografía TEM obtenida a 100K. Realizada en el Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica del CINVESTAV-IPN TEM modelo JEM-ARM200F, JEOL® con una diferencia de potencial de 80 kV

Las micrografías previamente analizadas muestran evidencia de éxito en las técnicas utilizadas, aunque también se observan partículas similares a virus en pequeña cantidad que es un fenómeno común en la producción de pseudovirus. La diferenciación entre PVs y VLPs se puede apreciar en la *figura 25*, donde la ausencia de material genético en las VLPs

permite el paso de los electrones y genera imágenes donde la cápside viral se puede visualizar “hueca”, en congruencia con lo establecido en la [sección 1.3](#).

3.9 Espectros UV-Vis: interacción entre AuNPs y PVs

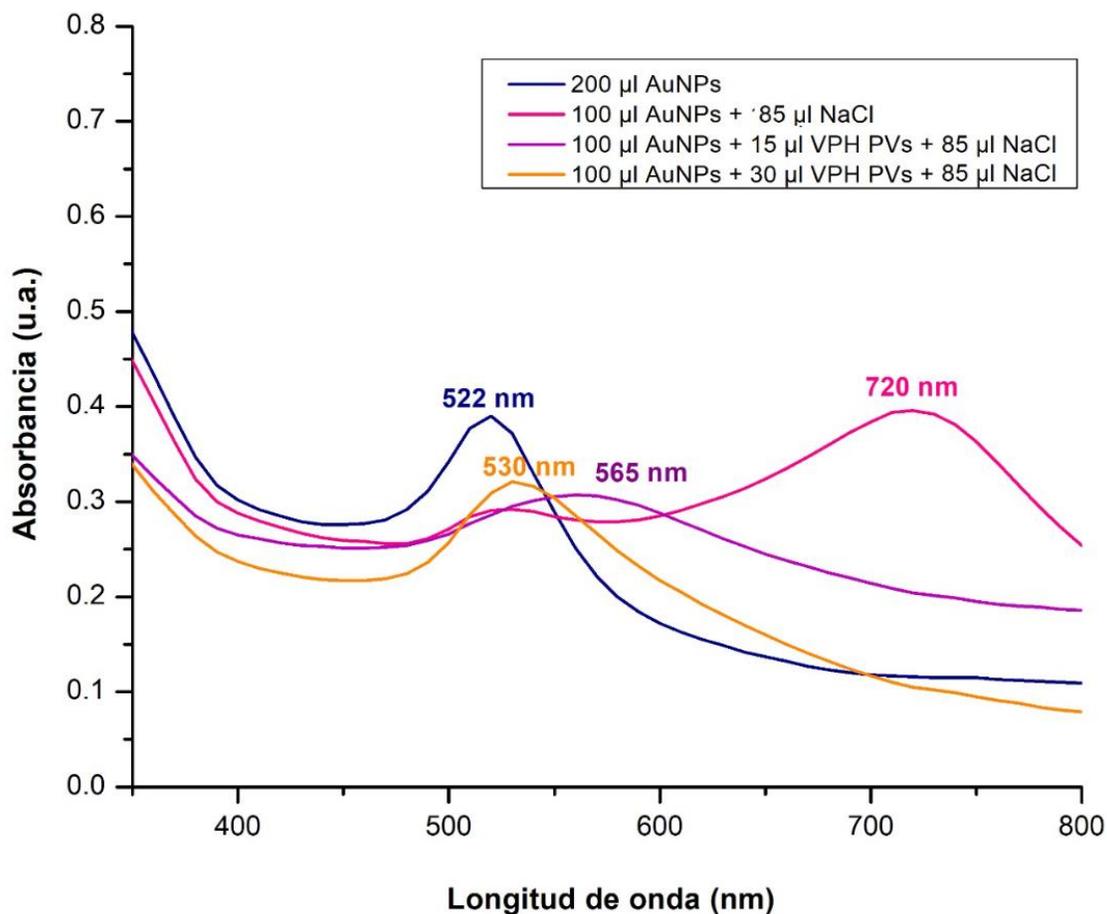


Figura 26. Espectro UV-Vis de los ensayos de ausencia y presencia de los PVs en la suspensión de AuNPs sintetizada en agua desionizada

Las curvas de absorbancia generadas por la caracterización UV-Vis permiten identificar el comportamiento de cada una de las muestras. La línea azul representa el control de AuNPs, donde el pico de la curva será la referencia de un comportamiento de partículas dispersas, sin aglomerar y con un diámetro aproximado de 20 nm. En contraste, el comportamiento de los conglomerados formados debido a la presencia de la solución salina se puede visualizar

en la línea rosa, mostrando un desplazamiento en la RPS que genera un proceso de absorción en longitudes de onda mayores.

La finalidad del presente proyecto de investigación se reduce al análisis del comportamiento de las muestras 3 y 4, que son aquellas donde se incorporan los PVs producidos a la suspensión de AuNPs. Recordemos rápidamente que la hipótesis planteada se centra en el papel inhibitorio de los PVs ante la agregación inducida de las AuNPs, dinámica que es corroborada evaluando las líneas púrpura y naranja de la *figura 26*. Sus máximos de absorción se ubican en 565 nm para la muestra con únicamente 15 μ l de PVs y 530 nm para la muestra con 30 μ l de PVs. Si estos datos se comparan contra la línea referencial en color rosa, se detecta que la banda plasmónica en presencia de los PVs aún aparece en la región entre los 520-570 nm, estando significativamente alejadas de una conducta de agregación, lo que nos indica que los PVs inhiben efectivamente la formación de conglomerados de AuNPs bajo las mismas condiciones de NaCl, aceptando así la hipótesis.

Adicionalmente, se aprecia que la respuesta inhibitoria está directamente relacionada con la cantidad de PVs presentes, es decir, que la carga viral también es una variable a considerar para desarrollar posteriores de experimentos que permitan monitorear la sensibilidad del sensor.

Explotando una de las propiedades ópticas de las AuNPs, como lo es la RPS, se logra proponer un método de detección alternativo que es capaz de identificar la presencia o ausencia de las proteínas estructurales presentes en la cápside viral del VPH.

El sistema colorimétrico se describe en la *figura 27* como un semáforo con 3 comportamientos: el color rojo característico de las AuNPs, un resultado positivo a la presencia de VPH en color rosado y un resultado negativo a VPH en color violeta.



Figura 27. Sistema de identificación por cambio colorimetría para la detección del VPH con un biosensor basado en AuNPs

Dicho sistema presenta una gran variedad de ventajas, se enlistan a continuación:

- Gracias al doble papel de las AuNPs como elemento de reconocimiento y de transducción, el resultado puede ser identificado a simple vista por un observador humano con una metodología sencilla.
- Los resultados pueden ser corroborados a través de ensayos UV-Vis, donde además puede obtenerse información complementaria relacionada a la carga viral presente en la muestra analizada.
- El tiempo de respuesta es bajo, un sistema altamente eficiente que permite recopilar información sobre la infección en cuestión de segundos.
- Esta prueba no es de carácter invasivo, lo que la hace más amigable con el público en general que podría brindar mayor confianza a los usuarios.
- El bajo costo de producción de las AuNPs a través de un método de síntesis que no genera desechos tóxicos, abre una ventana de oportunidad para el escalamiento e introducción al sector industrial.

Capítulo 4: Conclusiones

- ◆ La síntesis de nanopartículas metálicas mediante ALPL en medio líquido se presenta como una alternativa excelente para la obtención de AuNPs. Este método físico permite modular los parámetros de síntesis para obtener la morfología y el tamaño deseados de las partículas según los objetivos del proyecto. Sus principales ventajas incluyen la ausencia de residuos tóxicos y la simplicidad del montaje experimental, destacándose como una técnica eficiente y sostenible.
- ◆ La producción de pseudovirus de VPH-16 en la línea celular 293TT mediante la transfección de plásmidos ha demostrado ser un proceso eficiente y reproducible, ofreciendo resultados consistentemente favorables y confiables.
- ◆ El fenómeno óptico de Resonancia de Plasmón Superficial que presentan las nanopartículas plasmónicas permite que las AuNPs se propongan como elementos de reconocimiento y transducción para sensores colorimétricos. Este doble papel facilita la obtención de cambios de señales cuantificables mediante análisis UV-Vis y cambios de colorimetría visibles a simple vista.
- ◆ El sensor colorimétrico propuesto puede ser diseñado, ya que la agregación de las AuNPs inducida por la presencia de una solución salina es inhibida por los pseudovirus. Esto demuestra que las AuNPs poseen sensibilidad para detectar la presencia o ausencia de las cápsides virales del VPH-16 y tienen la capacidad de generar una respuesta óptica visible ante un observador sin necesidad de herramientas de monitoreo, por lo que se acepta la hipótesis propuesta de este trabajo de investigación.

4.1 Perspectivas futuras

A pesar de los avances logrados en este estudio, aún existen diversas áreas que podrían beneficiarse de una investigación más profunda. En particular, la optimización de los parámetros experimentales para mejorar la síntesis de AuNPs, para que posteriormente puedan ser producidas a mayor escala. Además, sería altamente benéfico complementar con nuevas técnicas de caracterización monitorear la polidispersión de tamaños.

Otro aspecto fundamental es la implementación de experimentos que nos permitan identificar la especificidad y sensibilidad de las AuNPs, esto nos permitiría adquirir mayor información sobre las condiciones particulares en las que este elemento de reconocimiento puede brindar los mejores resultados. Propondría ensayos de cuantificación de proteína para identificar las concentraciones de los PVs producidos y, a través de ensayos de gradiente de concentración, reducirlo gradualmente para identificar el punto dónde la presencia de las cápsides virales sigue siendo perceptible ante las AuNPs. Por otro lado, realizar ensayos de especificidad introduciendo arbitrariamente otra variedad de proteínas para estudiar si el carácter de la interacción únicamente se presenta con PVs de VPH o no se presenta como un evento aislado.

Por supuesto, otra de las más grandes incógnitas que deja este trabajo de tesis es la naturaleza de interacción entre las AuNPs y las cápsides virales de VPH, pues sigue siendo fundamental profundizar en los fenómenos físicoquímicos con el objetivo de establecer cimientos sólidos para el desarrollo de un prototipo físico.

Para caracterizar esta interacción, propondría utilizar una combinación de técnicas experimentales y simulaciones, entre ellas:

- La espectroscopía de resonancia plasmónica de superficie se utiliza comúnmente para medir interacciones moleculares directas, como la cinética y especificidad de unión, especialmente en biomoléculas. Esta técnica podría ayudar a identificar si la interacción es de carácter electromagnético, debido a las propiedades ópticas de las AuNPs, o si intervienen otros mecanismos.

- El análisis por calorimetría de titulación isotérmica (CTI) ofrecería información sobre los perfiles térmicos, ya que mide directamente el calor liberado o absorbido durante la interacción entre las AuNPs y la cápside. En diversos estudios se ha establecido que las interacciones hidrofóbicas suelen liberar calor, mientras que las interacciones electrostáticas o de van der Waals pueden absorber o liberar calor en función del entorno.
- La técnica DLS en conjunto con el potencial Zeta, además de calcular el tamaño de AuNPs, nos brindaría información sobre su carga superficial y su estabilidad en el medio. Cambios en el potencial Zeta de las AuNPs podrían indicar interacciones de carácter electrostático.
- Hacer uso de las herramientas computacionales como la simulación de dinámica molecular (MD) nos brindaría una perspectiva más completa para entender las interacciones a nivel atómico. Se podrían ajustar una diversidad de parámetros, especialmente la composición de los solventes para lograr comprender el papel que juega en la síntesis de AuNPs. Adicionalmente, podría evaluar la estabilidad y especificidad de la interacción y brindar más información.

Estas líneas de investigación futuras no solo contribuirían a la investigación de la interacción AuNPs-VPH, sino que también tendrían un impacto significativo en aplicaciones prácticas para el desarrollo del sensor que permitirá la detección temprana y oportuna de infecciones por VPH.

"El mayor beneficio de la ciencia es contribuir a la felicidad y el bienestar de la humanidad." – Marie Curie

Referencias

- [1] D.A. Hareža, J.R. Wilczyński, E. Paradowska, “Human Papillomaviruses as Infectious Agents in Gynecological Cancers. Oncogenic Properties of Viral Proteins”, *Int. J. Mol. Sci.*, **23(3)**, 1818 (2022).
- [2] F.J.O. Carrillo, D. B.G. de Regil, M.T.V. Jiménez, “Infección por virus del papiloma humano en mujeres y su prevención”, *GAMO*, **14(3)**, 157 (2015).
- [3] W. Chan-Acón, L. Aguilar-Morales, C. Soley, A. Arguedas-Mohs, “Estado actual de la vacuna recombinante contra el virus del papiloma humano”, *Acta Médica Costarricense*, **50(4)**, 203 (2008).
- [4] M.T. Urrutia, L. Poupin, X. Concha, D Viñales, C. Iglesias, V. Reyes, “¿Por qué las mujeres no se toman el papanicolau?: Barreras percibidas por un grupo de mujeres ingresadas al programa de cáncer cervicouterino AUGE”, *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.*, **73(2)**, 98 (2008).
- [5] M.T. Urrutia, L. Poupin, X. Concha, D Viñales, C. Iglesias, V. Reyes, “¿Por qué las mujeres no se toman el papanicolau?: Barreras percibidas por un grupo de mujeres ingresadas al programa de cáncer cervicouterino AUGE”, *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.*, **73(2)**, 98 (2008).
- [6] Y. Mejias-Sánchez, N. Cabrera-Cruz, A.M. Toledo-Fernandez, O.J. Duany-Machado, “La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico-tecnológico”, *Rev. Cub. Salud Publica*, **35(3)**, (2009).
- [7] D. Mateo, P. Morales, A. Ávalos, A.I. Haza, “Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro”, *Acta Toxicol. Argent.*, 21(2), 102 (2013).
- [8] P.M. Day, C.D. Thompson, R.M. Schowalter, D.R. Lowy, J.T. Schiller, “Identification of a role for the trans-Golgi network in human papillomavirus 16 pseudovirus infection”, *J. Virol.*, **87(7)**, 3862 (2013).
- [9] M. Concha, “Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano”, *Rev. Chil. Infectol.*, **24(3)**, 208 (2007).
- [10] L. Li, T. Wang, Y. Zhong, R. Li, W. Deng, X. Xiao, Y. Xu, J. Zhang, X. Hu, Y. Wang, “A review of nanomaterials for biosensing applications”, *J. Mater. Chem. B*, 12(5), 1168 (2024).
- [11] G. Palomino-Vizcaino, D.G. Valencia-Reséndiz, M.L. Benítez-Hess, N. Martínez-Acuña, J.V. Tapia-Vieyra, D. Bahena, M. Díaz-Sánchez, O.P. García-González, B.A. Alvarez-Sandoval, L.M. Alvarez-Salas, “Effect of HPV16 L1 virus-like particles on the aggregation of non-functionalized gold nanoparticles”, *Biosens. Bioelectron.*, **100**, 176 (2018)

- [12] J.K. Hathaway, "HPV: Diagnosis, Prevention, and Treatment. Clinical Obstetrics and Gynecology", **55(3)**, 671 (2012).
- [13] J.E. Rengifo-Rodríguez, J.C. Osorio, H.A. García-Perdomo, "Virus del papiloma humano (VPH): microbiología, relación con el cáncer de pene y características de la vacuna", *Rev. Mex. Urol.*, **80(4)**, (2020).
- [14] A. Álvarez-Aldana, J.C. Sepúlveda-Arias, F. Siller-López, "Carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano", *Investigaciones Andina*, **14(24)**, 438 (2012).
- [15] D.A. Hareża, J.R. Wilczyński, E. Paradowska, "Human Papillomaviruses as Infectious Agents in Gynecological Cancers. Oncogenic Properties of Viral Proteins", *Int. J. Mol. Sci.*, **23(3)**, 1818 (2022).
- [16] A.I. Toro-Montoya, L.J. Tapia-Vela, "Virus del papiloma humano (VPH) y cáncer", *Medicina & Laboratorio*, **25(2)**, 467 (2023)
- [17] N. Mistry, C. Wibom, M. Evander, "Cutaneous and mucosal human papillomaviruses differ in net surface charge, potential impact on tropism", *Virol. J.*, **5(1)**, 1 (2008).
- [18] V. Vallejo-Ruiz, N. Velázquez-Márquez, P. Sánchez-Alonso, G. Santos-López, J. Reyes-Leyva, "Human papillomavirus E7 oncoprotein and its role in the cell transformation", *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.*, **53**, S172 (2015).
- [19] C.B. Buck, P.M. Day, B.L. Trus, "The papillomavirus major capsid protein L1", *Virology*, **445(1–2)**, 169 (2013).
- [20] V.A. Vanegas, A.I. Rubio, A.M. Bedoya, G.I. Sánchez, "Estructura Molecular Y Antigenica De La Vacuna Contra El Virus Del Papiloma Humano 16 (Vph 16)", *Acta Biol. Colomb.*, **13(3)**, 37 (2008)
- [21] S.R. Thimmiraju, J.T. Kimata, J. Pollet, "Pseudoviruses, a safer toolbox for vaccine development against enveloped viruses", *Expert Rev. Vaccines*, **23(1)**, 174 (2024).
- [22] N.B. Sogaard, M. Bondesgaard, A.D. Bertelsen, B.B. Iversen, B. Julsgaard, "Synthesis of Ge 1– x Sn x nanoparticles under non-inert conditions", *Dalton Trans.*, **51(45)**, 17488 (2022).
- [23] J. Zhang, L. Mou, X. Jiang, "Surface chemistry of gold nanoparticles for health-related applications", *Chem. Sci.*, **11(4)**, 923 (2020)

- [24] D.B. Sanchez, “The surface plasmon resonance of supported noble metal nanoparticles: Characterization, laser tailoring, and SERS application”, *J. Phys. Madrid*, **59**, 240 (2007),
- [25] J.B. Vines, J.H. Yoon, N.E. Ryu, D.J. Lim, H. Park, “Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy”, *Frontiers in Chemistry*, **7**, 167 (2019).
- [26] A.V.S. Gómez-Castelán, M.T. Castañeda-Briones, M.R. Cruz-Colín, M. Ávila-Jiménez, C. Haro-Pérez, M. Espinoza-Castañeda, “Síntesis, caracterización y funcionalización de nanopartículas de oro para su uso en biosensores”, (2016).
- [27] S.A. Bansal, V. Kumar, J. Karimi, A.P. Singh, S. Kumar, “Role of gold nanoparticles in advanced biomedical applications”, *Nanoscale Adv.*, **2(9)**, 3764 (2020).
- [28] W. Li, X. Chen, “Gold nanoparticles for photoacoustic imaging”, *Nanomedicine*, **10(2)**, 299 (2015).
- [29] S.A. Bhat, S.A. Pandit, M.A. Rather, G.M. Rather, N. Rashid, P.P. Ingole, M.A. Bhat, “Self-assembled AuNPs on sulphur-doped graphene: a dual and highly efficient electrochemical sensor for nitrite (NO₂⁻) and nitric oxide (NO)”, *New J. Chem.*, **41(16)**, 8347 (2017)
- [30] C. Domingo, M.V. Cañamares, Z. Jurasekova, E. del Puerto, S. Sánchez-Cortés, J.V. García-Ramos, “Aplicaciones de la espectroscopía SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) a la detección de pigmentos orgánicos naturales en objetos del Patrimonio Cultural”, (2010)
- [31] R. Pamies, J.G.H. Cifre, V.F. Espín, M. Collado-González, F.G.D. Baños, J.G. de la Torre, “Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous media”, *J. Nanoparticle Res.*, **16**, 1 (2014).
- [32] D. Ghosh, N. Chattopadhyay, “Gold nanoparticles: acceptors for efficient energy transfer from the photoexcited fluorophores”, *Optics and Photonics Journal*, **3(01)**, 18 (2013).
- [33] A. Artiga, I. Serrano-Sevilla, L. De Matteis, S.G. Mitchell, J.M. de la Fuente, Current status and future perspectives of gold nanoparticle vectors for siRNA delivery, *J. Mater. Chem. B*, **7(6)**, 876 (2019).
- [34] J.M.C. Panduro, R.P. Gotor, “Estudio de las interacciones de nanopartículas aniónicas de oro con ADN y sus monómeros constituyentes”, (2017)
- [35] L. Meng, “Tailoring Conducting Polymer Interface for Sensing and Biosensing” (Vol. 2094). Linköping University Electronic Press.
- [36] B.S. Hettiarachchi, Y. Takaoka, Y. Uetake, Y. Yakiyama, H.H. Lim, T. Taira, M. Maruyama, Y. Mori, H.Y. Yoshikawa, H. Sakurai, “Uncovering gold nanoparticle

synthesis using a microchip laser system through pulsed laser ablation in aqueous solution”, *Ind. Chem. Mater.*, **2(2)**, 340 (2024).

[37] R. Zanella, “Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. Mundo nano”, *Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, **5(1)**, 69 (2012)

[38] B.N. Chichkov, C. Momma, S. Nolte, F. Von Alvensleben, A. Tünnermann, Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids, *Appl. Phys. A*, **63**, 109 (1996).

[39] J.N. Agreda-Paredes, J.F. Agreda-Delgado, C.W. Aldama-Reyna, “Fotoacústica pulsada aplicada a la determinación de umbrales de ablacion laser en metales”, *Momento*, 59, 49 (2019)

[40] W. Haiss, N.T. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, “Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra”, *Anal. Chem.*, **79(11)**, 4215 (2007)

[41] M. Iqbal, G. Usanase, K. Oulmi, F. Aberkane, T. Bendaikha, H. Fessi, N. Zine, G. Agusti, E.S. Errachid, A. Elaissari, Preparation of gold nanoparticles and determination of their particles size via different methods, *Mater. Res. Bull.*, **79**, 97 (2016)

[42] L. Grady, D. Axelrod, D. Trilling, “The SV40 pseudovirus: its potential for general transduction in animal cells”, *PNAS*, 67(4), 1886 (1970).

[43] Q. Zhao, H.H. Guo, Y. Wang, M.W. Washabaugh, R.D. Sitrin, “Visualization of discrete L1 oligomers in human papillomavirus 16 virus-like particles by gel electrophoresis with Coomassie staining”, *J. Virol. Methods*, **127(2)**, 133 (2005).

[44] A. Carone, S. Emilsson, P. Mariani, A. Désert, S. Parola, “Gold nanoparticle shape dependence of colloidal stability domains”, *Nanoscale Adv.*, **5(7)**, 2017 (2023)

Listado de tablas y figuras

Tabla 1. Clasificación oncológica de cepas de VPH (Ebscohost, 2017)¹³

Tabla 2. Importancia del umbral de ablación en la síntesis de nanopartículas metálicas (adaptado de N. Chichkov, C. Momma et. al)³²

Tabla 3. Estimación de los tamaños de AuNPs producidas en distintos solventes utilizando las expresiones propuestas por Haiss et al (2007)⁴⁰ e Iqbal (2016)⁴¹

Figura 1. Ilustración histológica del tejido epitelial cervical que infecta el VPH

Figura 2. Esquema del genoma viral del VPH-16, adaptado de (Hareża, Wilczyński and Edyta Paradowska, 2022)¹⁵.

Figura 3. Características de los sistemas biológicos virales (Pseudoviruses, a safer toolbox for vaccine development against enveloped viruses, 2024)²⁰

Figura 4. Oscilación colectiva de los electrones de la superficie de AuNPs en respuesta a un campo eléctrico externo

Figura 5. Representación cualitativa de espectros UV-Vis en el modo de absorbancia para diferentes nanoestructuras donde se identifican variaciones de la RPS dependientes de factores fisicoquímicos como se establece en la sección 1.5.2.

Figura 6. Agregación de las soluciones coloidales de AuNPs en presencia de una solución salina de NaCl

Figura 7. Elementos que componen a un sensor

Figura 8. Aplicaciones biomédicas de las AuNPs con un panorama prometedor en una amplia gama de procedimientos médicos de vanguardia

Figura 9. Metodología de la síntesis ALPL y caracterización de las AuNPs

Figura 10. Metodología de la producción de PVs de VPH-16 en la línea celular 293TT

Figura 11. Condiciones de cultivo de la línea celular 293TT utilizadas en el procedimiento experimental para la producción de pseudovirus

Figura 12. Metodología experimental de los ensayos de agregación en ausencia y presencia de los PVs, solución de AuNPs sintetizadas en agua destilada.

Figura 13. AuNPs producidas por ALPL en a) etanol, b) isopropanol, c) agua destilada y d) agua desionizada.

Figura 14. Espectro de absorbancia obtenido al caracterizar las AuNPs en diferentes solventes por espectrofotometría UV-Vis

Figura 15. Micrografías TEM 250k de las AuNPs obtenidas por ALPL en a) etanol, b) isopropanol, c) agua destilada, d) agua desionizada

Figura 16. Análisis de tamaños de las AuNPs producidas en etanol

Figura 17. Análisis de tamaños de las AuNPs producidas en isopropanol

Figura 18. Análisis de tamaños de las AuNPs producidas en agua destilada

Figura 19. Análisis de tamaños de las AuNPs producidas en agua desionizada

Figura 20. Espectros de absorbancia e imágenes de las soluciones de AuNPs en los ensayos de agregación. Se muestra el cambio inducido como consecuencia de la variación de la concentración de NaCl a 0 M, 0.1M, 0.5M y 1M incorporado a las soluciones de AuNPs en a) etanol, b) isopropanol, c) agua destilada y d) agua desionizada

Figura 21. Monitoreo post-transfección con de los plásmidos p16shell y pSVL-YFP en la línea celular 293TT.

Figura 22. Bandas obtenidas en la separación por gradiente de densidad en medio de Optiprep™ Sigma Aldrich® en gradientes de concentración de 29%, 33% y 36%, resultado de una ultracentrifugación a 170,000 rfc durante 20 hrs a 4°C

Figura 23. Caracterización por Inmunodetección de la proteína L1 de la banda intermedia recuperada del gradiente en un gel de acrilamida al 8% a 30mA durante 3 horas

Figura 24. Micrografías TEM obtenidas a) 50K, b) 100K y c) 250K de los PVs de VPH-16 producidos. Realizadas en el Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica del CINVESTAV-IPN TEM modelo JEM-ARM200F, JEOL® con una diferencia de potencial de 80 kV

Figura 25. Diferencia entre un PVs y una VLP. Ampliación de micrografía TEM obtenida a 100K. Realizada en el Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica del CINVESTAV-IPN TEM modelo JEM-ARM200F, JEOL® con una diferencia de potencial de 80 kV

Figura 26. Espectro UV-Vis de los ensayos de ausencia y presencia de los PVs en la suspensión de AuNPs sintetizada en agua desionizada

Figura 27. Sistema de identificación por cambio colorimetría para la detección del VPH con un biosensor basado en AuNPs