

Revista Médica de la Universidad Veracruzana

<https://doi.org/10.25009/rmuv.2025.1>

Volumen 2025-1

Enero-marzo

ARTÍCULO ORIGINAL

Digital Image Processing for the Quantification of Pneumonic Area in the Lungs of Chronically Lead-Exposed Wistar Albino Rats in an Intergenerational Model

Gerardo N. Rivera Rojas, Gerardo N. Galván Tejada, Carlos E. Galván Tejada, Irma E. González Curiel, Erika Acosta Cruz

ARTÍCULO ORIGINAL

Co-amorfo de Sulfasalazina:L-Arginina con propiedades de solubilidad y velocidad de disolución mejoradas para una mayor biodisponibilidad y eficacia terapéutica.

Javier Hernández Illescas , Oscar García Barradas , Fernando López Fentanes, Jorge G. Domínguez Chávez, Karina Mondragón Vásquez

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección de marcadores tumorales por biosensores colorimétricos basados en nanotriángulos de Plata

Daniela González Zarate, José Luis Zamora Navarro, Irma Yadira Izaguirre Hernández, Pablo Thomas Dupont, José María Remes Troche, Luis Zamora Peredo

ARTÍCULO ORIGINAL

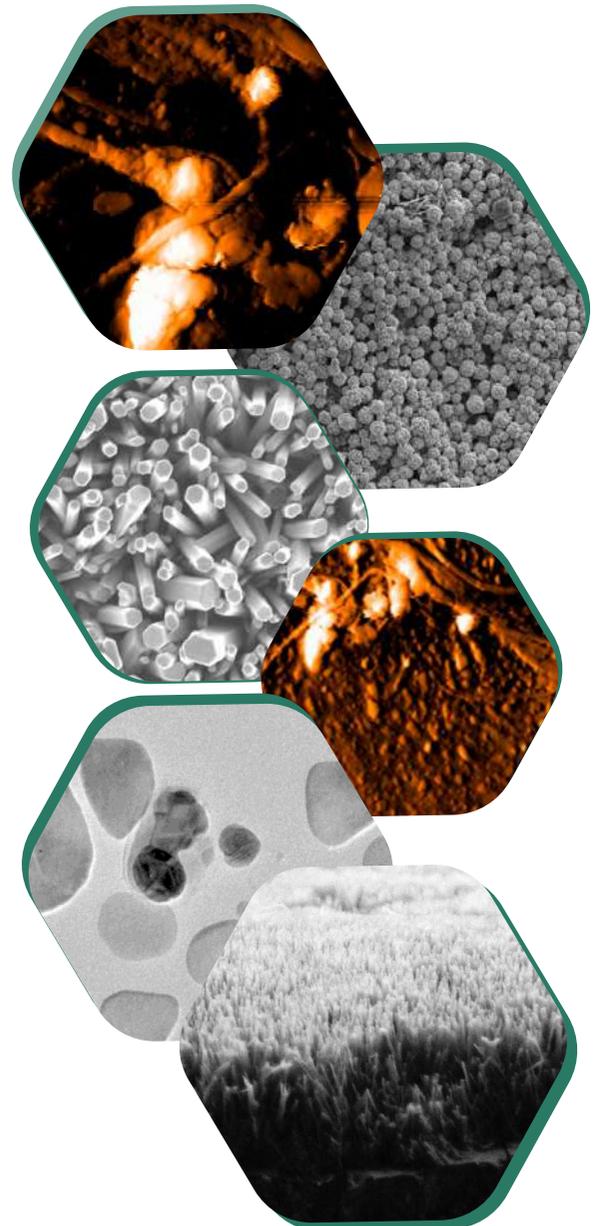
SERS y la Revolución en la Detección Temprana del Cáncer: Nuevas Tecnologías para Identificar Biomarcadores Clave en Tumores Digestivos

Marcos Luna Cervantes, Luis Zamora Peredo

ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN

Microscopía de Fuerza Atómica en el análisis de espermatozoides

Héctor Pérez Ladrón de Guevara, Adalberto Zamudio Ojeda, Santiago José Guevara-Martínez



Versión digital

2683 2879

Versión Impresa

1870 3267

Indizada en LATINDEX

REVISTA MÉDICA DE LA
UNIVERSIDAD VERACRUZANA
Vol.2025-1. Enero-marzo de 2025

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

Dr. Martín Gerardo Aguilar Sánchez

Rector

Dr. Juan Ortiz Escamilla

Secretario Académico

Agustín del Moral Tejeda

Director Editorial

Roberto Zenteno Cuevas

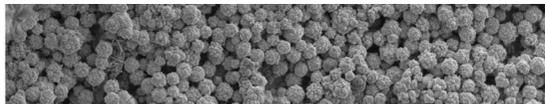
Director General de Investigaciones

Revista Médica de la Universidad Veracruzana

Directora del Instituto de Ciencias de la Salud

Dra. María Gabriela Nachón García

<https://doi.org/10.25009/rmuv.2025.1.134>



Imágenes en portada:
Cortesía de los autores involucrados en
el presente Volumen.

Equipo Editorial

Patricia Pavón León

Directora

Xóchitl De San Jorge Cárdenas

Editora

Mayra Díaz Ordoñez

Co-Editora

Beatriz Velasco Muñoz Ledo

Correctora de Estilo

Víctor Olivares García

Responsable de la publicación electrónica

Marlen García Jiménez

Apoyo Tecnológico

COMITÉ EDITORIAL

Adicciones:

Betzaida Salas García

Jorge Luis Arellanez Hernández

María Elena Medina Mora

Biomedicina:

Fabio A. García

Roberto Zenteno Cuevas

Carlos Blanco Centurión

Medicina Clínica y Estudios Traslacionales

Mónica Flores Muñoz

María Luisa Moreno Cortés

Oscar Arias Carrión

Sistemas de Salud

Gaudencio Gutiérrez; José Alberto

Arturo Aguilar Ye

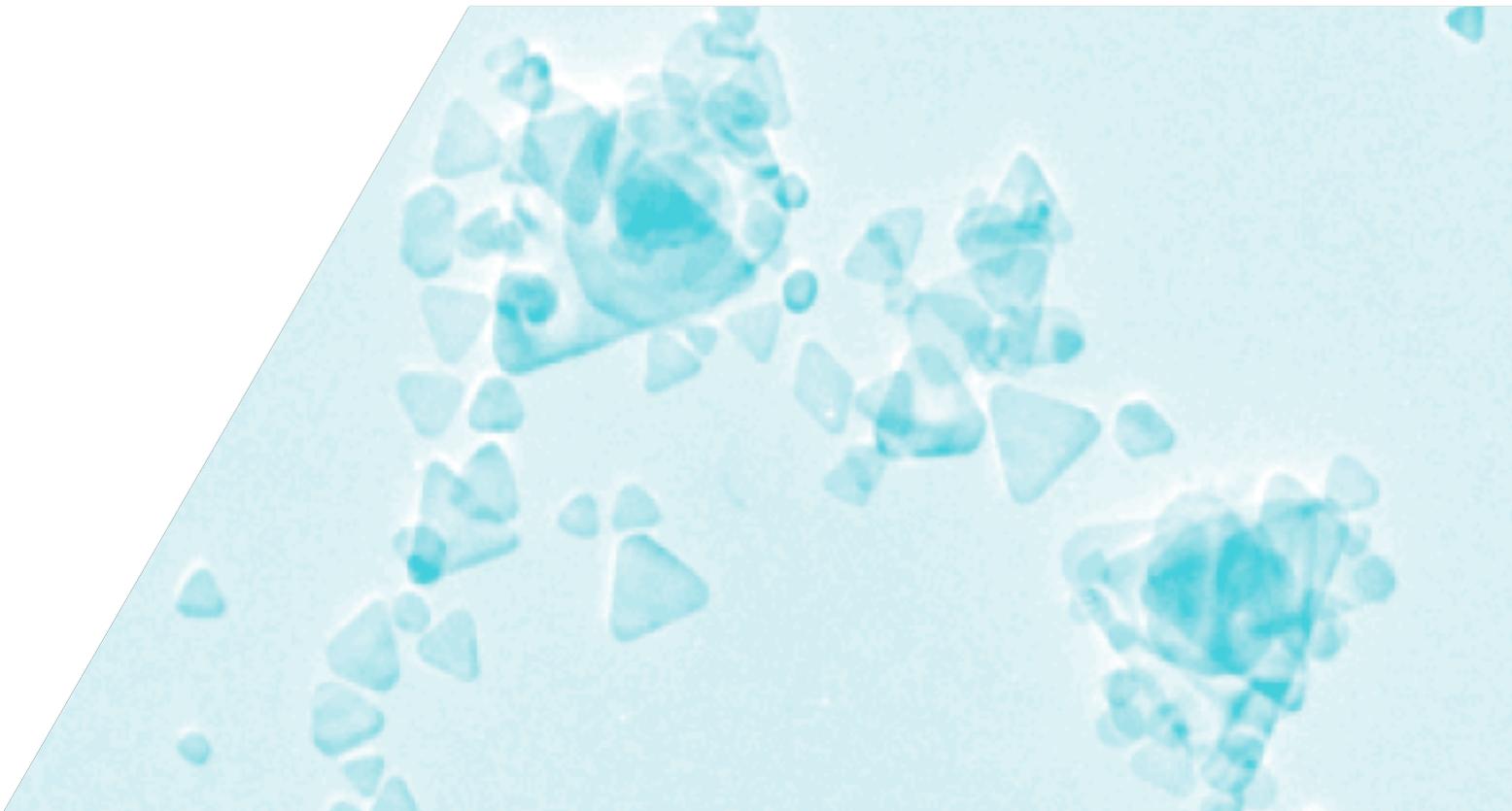
Hortensia Reyes Morales

Revista Médica de la Universidad Veracruzana Volumen 2025- 1. Enero-marzo de 2025, es una publicación periódica semestral publicada en julio y diciembre, con arbitraje estricto realizado por un comité de pares académicos a través de dictámenes doble ciego, editada por la Universidad Veracruzana (UV) a través del Instituto de Ciencias de la Salud (ICS), con domicilio en Fortín de las Flores Número 9, Fraccionamiento Pomona, C.P. 91040, Xalapa, Veracruz, México. Teléfono (52) 228 8426233, <https://rmuv.uv.mx/index.php/rmuv>; Editor responsable: Xóchitl De San Jorge Cárdenas. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04 - 2019 - 080112381100 - 203 y con ISSN Red de Cómputo 2683-2879, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la actualización de este número, Mtro. Víctor Olivares García. Fecha de última modificación, 1 de julio de 2025.

Esta obra está bajo una licencia CC BY-NC-ND 4.0 ES <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

EDITORIAL	5
ARTÍCULO ORIGINAL Digital Image Processing for the Quantification of Pneumonic Area in the Lungs of Chronically Lead-Exposed Wistar Albino Rats in an Intergenerational Model	7
Gerardo N. Rivera-Rojas, Carlos E. Galván Tejada, Irma E. González Curiel, Erika Acosta Cruz.	
ARTÍCULO ORIGINAL Co-amorfo de Sulfasalazina:L-Arginina con propiedades de solubilidad y velocidad de disolución mejoradas para una mayor biodisponibilidad y eficacia terapéutica.	29
Javier Hernández Illescas , Oscar García Barradas , Fernando López Fentanes, Jorge G. Domínguez Chávez, Karina Mondragón Vásquez.	
ARTÍCULO ORIGINAL Detección de marcadores tumorales por biosensores colorimétricos basados en nanotriángulos de Plata	45
Daniela González Zarate, José Luis Zamora Navarro, Irma Yadira Izaguirre Hernández, Pablo Thomas Dupont, José María Remes Troche, Luis Zamora Peredo.	
ARTÍCULO ORIGINAL SERS y la Revolución en la Detección Temprana del Cáncer: Nuevas Tecnologías para Identificar Biomarcadores Clave en Tumores Digestivos	53
Marcos Luna Cervantes, Luis Zamora Peredo.	
ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN Microscopía de Fuerza Atómica en el análisis de espermatozoides	65
Héctor Pérez Ladrón de Guevara, Adalberto Zamudio Ojeda, Santiago José Guevara-Martínez.	

El presente volumen fué realizado en Coordinación con el **Dr. Luis Zamora Peredo**, perteneciente al Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología de la Universidad Veracruzana y como resultado del primer Simposio Internacional *Nanotecnología en Medicina, Medio Ambiente y Energía* (SINAMEV),2024. De forma excepcional se admitió la citación Vancouver para dos de los artículos incluidos.



<https://doi.org/10.25009/rmuv.2025.1.129>

La nanotecnología se entiende como la ciencia y tecnología que se utiliza para fabricar y manipular materiales o dispositivos a escala nanométrica, donde se puede fabricar y estudiar materiales con dimensiones un millón de veces más pequeñas que un milímetro, conocidos como nanomateriales. Es una ciencia multidisciplinaria que así como es utilizada para el desarrollo de nuevos fármacos, biosensores para la detección de virus y para el estudio de cultivos celulares en el área médica, también es utilizada para el desarrollo de celdas solares más eficientes, de baterías con mayor tiempo de duración que ayudan al ahorro de energía, o para el desarrollo de dispositivos que evalúan y mejoran la calidad del agua o monitorean contaminantes en alimentos. En general se puede identificar que las tres áreas que más aprovechan los beneficios de la nanotecnología son medicina, medio ambiente y energía.

En este volumen de la Revista Médica de la Universidad Veracruzana, se presentan algunos artículos de investigaciones (en el área médica) presentadas en el primer Simposio Internacional Nanotecnología en Medicina, Medio Ambiente y Energía (SINAMEV), realizado en noviembre del 2024, con el objetivo de divulgar entre la comunidad estudiantil, académica y sociedad en general, los avances de proyectos de investigación que se realizan en universidades a nivel nacional e internacional.

El primer artículo es una investigación realizada en la Universidad Autónoma de Zacatecas enfocada al desarrollo de un software para evaluar imágenes microscópicas histológicas de tejido pulmonar dañado con la capacidad de proporcionar una interfaz fácil para el usuario final, permitiendo análisis rápidos y simples, que pueden ejecutarse en dispositivos con recursos limitados.

El segundo artículo está relacionado con una investigación que se realiza en la Facultad de Bioanálisis de la Universidad Veracruzana, en la cual se busca la optimización de la solubilidad y la velocidad de disolución de un fármaco antiinflamatorio, como la sulfasalazina.

En el tercer artículo se presenta un estudio realizado en el Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología de la UV, enfocado a sintetizar nanopartículas triangulares de plata para detectar anticuerpos específicos contra el antígeno CA19-9, el cual es utilizado para diagnosticar cáncer de páncreas y que se ha relacionado con otros tipos de cánceres.

Además, se presenta un artículo donde se analiza como los nanomateriales y la técnica de espectroscopía Raman se utilizan para el diseño de nuevos biosensores ópticos capaces de detectar biomarcadores asociados al cáncer en muy baja concentración, lo que permitiría la detección temprana de esta terrible enfermedad. Más específicamente, se identifican algunos estudios relacionados con el antígeno carcinoembrionario (CEA), la alfa-fetoproteína (AFP) y antígeno CA19-9.

Finalmente, investigadores de la Universidad de Guadalajara presentan un estudio de espermatozoides mediante la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM). Lo cual se visualiza como una excelente alternativa para este tipo de estudios, ya que con AFM solo se necesita fijar la muestra bajo estudio en un portaobjetos, no requiere tinción ni colorantes.

Luis Zamora Peredo

Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología
Universidad Veracruzana

Digital Image Processing for the Quantification of Pneumonic Area in the Lungs of Chronically Lead-Exposed Wistar Albino Rats in an Intergenerational Model

Procesamiento digital de imágenes para la cuantificación de áreas neumónicas en pulmones crónicamente expuestos a plomo en ratas Wistar en un modelo intergeneracional.

Rivera-Rojas, Gerardo N¹, Galván-Tejada, Carlos E^{2*}, González-Curiel Irma E³, Acosta-Cruz, Erika⁴.

ABSTRACT

The evaluation of lung tissue can be done by several approaches. While structural integrity is critical for accurate diagnosis of different pathologies, scientific research uses specific tools to facilitate evaluation based on the characteristics of the study, the needs of the researcher, and available resources. Most software tools lack versatility and are perceived as black boxes, requiring extensive knowledge of the subject and software functionality to fully utilize their capabilities. Additionally, these specialized tools, often from the private sector, are costly and require specific inputs. Thus, conducting quantitative analysis of morphological features in a qualitative manner requires substantial expertise or extensive training time to ensure accurate evaluations. Therefore, the proposed software for alveolar area quantification, developed using histological images of lung tissue stained with hematoxylin-eosin, aims to provide a user-friendly interface for the end user, enabling quick and simple analyses that can be executed on devices with limited resources. The images were obtained from different groups exposed to different concentrations of lead (5, 10, 15 mg/kg) administered intraperitoneally. This approach seeks to bridge the gap between the need for precise structural analysis and the accessibility of effective tools, enhancing the efficiency and accuracy of lung tissue evaluation in research requirements.

Keywords: Chronic Lead Exposure, Digital image processing, segmentation and pulmonary fibrosis

<https://doi.org/10.25009/rmu.2025.1.130>

Recibido: 07/03/25

Aprobado: 29/04/25

¹Licenciatura, Maestría en ciencias del procesamiento de la información, Universidad autónoma de zacatecas, Zacatecas, México.

²Doctorado, Centro de Investigación e Innovación en Biomédica e Informática, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, México.

*Autor de Correspondencia: ericgalvan@uaz.edu.mx 492 544 0968

³Doctorado, Laboratorio de inmunotoxicología y terapéutica experimental, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, México.

⁴Doctorado, Departamento de Biotecnología., Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México

RESUMEN

La evaluación del tejido pulmonar puede abordarse de diversas maneras. Si bien la integridad estructural es fundamental para un diagnóstico preciso de diferentes patologías, la investigación científica requiere herramientas específicas que faciliten la evaluación según las características del estudio, las necesidades del investigador y los recursos disponibles. La mayoría de las herramientas de software carecen de versatilidad y son percibidas como "cajas negras", ya que exigen un conocimiento extenso tanto del tema como del funcionamiento del software para aprovechar completamente sus capacidades. Además, estas herramientas especializadas, a menudo provenientes del sector privado, son costosas y requieren insumos específicos. Por todo esto, realizar análisis cuantitativos de características morfológicas de manera cualitativa requiere una experiencia considerable o un tiempo extenso de capacitación para garantizar evaluaciones precisas. Por lo tanto, el software propuesto para la cuantificación del área alveolar, desarrollado utilizando imágenes histológicas de tejido pulmonar teñidas con hematoxilina-eosina, tiene como objetivo proporcionar una interfaz fácil de usar para el usuario final, permitiendo análisis rápidos y simples que pueden ejecutarse en dispositivos con recursos limitados. Las imágenes fueron obtenidas de diferentes grupos expuestos a diversas concentraciones de plomo (5, 10, 15 mg/kg) administradas por vía intraperitoneal. Este enfoque busca cerrar la brecha entre la necesidad de análisis estructurales precisos y la accesibilidad a herramientas efectivas, mejorando la eficiencia y precisión de la evaluación del tejido pulmonar en los contextos de investigación.

Palabras clave: Exposición crónica a plomo, Fibrosis pulmonar, Procesamiento digital de imagen y Segmentación.

INTRODUCTION

Lead (Pb) is a significant anthropogenic toxic pollutant historically utilized in products such as gasoline, household goods, toys, paints, and ceramics (Hoover et al., 2023). Its extensive use was largely due to its favorable properties, including durability, malleability, and resistance to corrosion. However, the severe health consequences associated with Pb exposure prompted regulatory actions to restrict its use starting in the late 1970s. These restrictions have reduced exposure in some populations, yet Pb remains a global critical public health concern. This is largely attributed to its persistence in the environment and its ability to exert toxic effects even at low exposure levels (Charkiewicz & Backstrand, 2020).

One of the unique and concerning characteristics of Pb is its capacity to bioaccumulate within the human body. Unlike many other contaminants that are metabolized and excreted, Pb is predominantly stored in bones, where 90–95% of the body's Pb burden is sequestered. This bone-bound Pb can be gradually released into the bloodstream over time, especially during periods of increased bone turnover such as pregnancy, lactation, or aging, thereby maintaining elevated blood Pb levels long after external exposure has ceased (Yu et al., 2023)

Geochemically, Pb is the second most toxic metal after arsenic (As) and constitutes approximately 0.002% of Earth's crust (Tarragó & Brown, 2017). Human exposure to Pb occurs primarily through environmental and occupational pathways. Key sources include Pb salts and oxides present in atmospheric dust, emissions from automobile exhausts, residues in old paints, and contamination of food and water supplies (Kumar et al., 2020). These pathways highlight the widespread nature of Pb contamination, affecting populations across diverse regions and socioeconomic statuses.

The health impacts of Pb exposure are both acute and chronic, affecting multiple organ systems. Chronic exposure is particularly concerning as it has been strongly associated with a range of long-term health issues. For instance, it can impair cognitive function, leading to developmental delays and reduced IQ in children (X. Wang et al., 2018a). It also contributes to cardiovascular diseases, such as hypertension and heart disease, and is a known carcinogen linked to respiratory neoplasms, particularly in lung tissue (Ding et al., 2023). Elevated blood Pb levels during early development can disrupt postnatal growth (Jiang et al., 2022), deregulate the neuroendocrine system (Dos Santos et al., 2022), and impair auditory function, reducing hearing capacity in infants and children (Xu et al., 2020).

In adults, Pb exposure poses serious risks to the central nervous system, leading to neurological disorders, and can also impair renal function, contributing to chronic kidney disease (Kothapalli, 2021); (Jing et al., 2020). Furthermore, Pb exposure during pregnancy is particularly detrimental. Maternal Pb can cross the placental barrier, adversely affecting fetal development and growth, particularly during the early stages of gestation (X. Wang et al., 2018b). These wide-ranging and persistent effects underscore the critical need for ongoing efforts to mitigate Pb exposure and address its public health implications. Some approaches for determining morphological damage through pixel counting within texture ranges have been implemented with excellent results (D. Wang et al., 2020).

Oxidative stress plays a critical role in cellular damage, particularly following exposure to heavy metals such as lead (Pb). This stress disrupts macromolecules, including lipids, proteins, and DNA, triggering pathways involved in cell survival and programmed cell death. Pb exposure has been linked to neurological disorders, developmental abnormalities, and cardiovascular diseases due to its ability to generate reactive

oxygen species (ROS) that overwhelm antioxidant defenses, leading to sustained molecular damage (Paithankar et al., 2021).

Key signaling pathways mediate cellular responses to Pb-induced oxidative stress. The NF- κ B pathway modulates inflammation (L. Wang et al., 2021). While the NRF2 pathway regulates antioxidant defenses Pb exposure also affects the JAK-STAT pathway, which influences immune function and apoptosis (Li et al., 2023), and the JNK pathway, which is associated with stress-induced cell death (Fang et al., 2021). Additionally, Pb induces hypoxia-like responses via the HIF pathway (Aschner et al., 2023). Together, these pathways form a complex network, highlighting the multifaceted nature of cellular responses to oxidative stress and environmental insults like heavy metal exposure.

Lead (Pb) exposure has been shown to induce significant histopathological alterations in various organs, including the liver and lungs. While studies have extensively documented Pb-induced hepatic damage—ranging from vascular disruption to necrosis (Kou et al., 2020), the pulmonary effects of Pb exposure remain a critical area of investigation. The lungs, as a primary interface for gas exchange, are highly susceptible to oxidative stress and inflammatory responses triggered by Pb accumulation. Such exposure may lead to vascular congestion, alveolar damage, and pneumonic lesions, ultimately compromising respiratory function.

Histological analysis of lung tissue provides a crucial tool for identifying structural alterations associated with Pb toxicity. By quantifying pneumonic areas and assessing cellular damage, this study aims to contribute to a deeper understanding of Pb-induced pulmonary pathology, complementing findings from other organ systems and highlighting the systemic nature of heavy metal toxicity.

The lung, essential for gas exchange, depends on the integrity of its pulmonary alveolar architecture to maintain proper function. Inflammatory conditions like pneumonia, which can be persistent and fatal, significantly compromise lung performance (West et al., 2021), while limited research exists on the direct role of lead (Pb) exposure in triggering pneumonia, studies suggest that Pb disrupts immune system balance, favoring the production of pro-inflammatory cytokines that contribute to tissue damage (Dietert & Piepenbrink, 2006). Evidence from animal studies reinforces these findings. Mice exposed to Pb inhalation for six months exhibited reduced lung compliance, with pathological changes progressing from emphysema to fibrosis. Notably, their blood Pb levels mirrored those of humans occupationally exposed to heavy metals. Histological analysis further confirmed inflammation and significant collagen deposition, underscoring the profound impact of Pb on lung health (Lee & Lee, 2024).

Accurate assessment of such pathological changes often requires manual adjustments of thresholds by experienced analysts, a process that is both time-consuming and skill-dependent (Hübner et al., 2008). To address this challenge, the proposed software seeks to streamline preliminary quantitative analysis by semi-automating image processing tasks. Its primary objective is to determine potential differences in alveolar areas analyzed across experimental groups, enabling more precise comparisons. This innovative tool, described in detail below, aims to reduce the time and expertise required to obtain reliable results, making lung tissue evaluation more accessible and efficient.

MATERIALS AND METHODS

This section details the murine model used for obtaining tissue samples and photographs to observe the pulmonary area, followed by digital image processing methods for quantification.

2.1 Murine model methodology

An intergenerational murine model was generated to emulate and represent the levels of chronic lead exposure that humans may be subjected to. The project was approved by the Research Committee (COFEPRIS-19CI 32056045) and the Bioethics Committee (CEI-UAO/UAZ0002-R/2022).

Male Wistar albino rats were exposed during gestation and the first three months after weaning to different lead doses. A weekly intraperitoneal dose of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ was administered at 5, 10, and 15 mg/kg, respectively. The control group was administered a saline solution with NaNO_3 to rule

out any alterations induced by the nitrates themselves. All study specimens were housed in cages with *ad libitum* access to food and water in a reversed 12-hour light/dark cycle at a temperature of 25 °C until sacrifice.

2.2 Image acquisition

Rats were sacrificed by exsanguination via axillary cut. Subsequently, dissection was carried out for organ identification and extraction of the right lung, in accordance to NOM-062-ZOO-1999. After completing the histological technique and paraffin embedding, 4 µm sections of the embedded lung tissue were made and placed on albuminized slides for subsequent hematoxylin-eosin staining. The tissues were photographed using an inverted microscope, model Axio Vert A1 (Carl Zeiss) with an Olympus C-5060 Wide Zoom digital camera (5.1 megapixels).

Several photos of the slides of the lung tissue of the rats subjected to the different treatments were analyzed with software designed in collaboration with the Academic Unit of Electronic Engineering of the Autonomous University of Zacatecas.

This program can process the images to determine if there is a decrease or increase in the alveolar spaces. The software can transform the images obtained from the microscope into binarized images as shown in Figure 4, to subsequently provide pixels number values, as shown in Table 1.

2.3 Image preprocessing

The images obtained as described above were converted from Tag Image File Format (TIFF) to Joint Photographic Experts Group (JPEG) format. Subsequently, the color palette is changed to grayscale.

2.4 Image binarization

Binarization is a digital image processing technique that converts a grayscale image into a binary image with black and white pixels colors, commonly with values: 0 (black) or 1 (white). This process is important in order to segment regions of interest (ROI) and facilitates the subsequent quantification and analysis of image features.

The procedure for image binarization is described in the following steps:

1. Thresholding: After the color palette change to grayscale, a threshold value T is selected as cutoff point between pixels that will be classified as black or white. This value can be manually defined or automatically calculated using algorithms or given a specific task to be done.

2. Binary Value Assignment: Each pixel in the grayscale image is compared with the threshold T . If the pixel intensity $I(x,y)$ is greater than or equal to T , the pixel is assigned a value of 1 (white). Otherwise, it is assigned a value of 0 (black), as is presented in equation 1.

$$B(x,y) = \begin{cases} 1 & \text{if } I(x,y) \geq T \\ 0 & \text{if } I(x,y) < T \end{cases}$$

where $B(x,y)$ represents the binary value of the pixel at position (x,y) .

In this scenario, binarization allows the identification of edges, and detect areas within the image.

2.5 Quantification of Area

For each binarized image, the number of black and white pixels is obtained. Each number 1 in the image matrix is used to determine the number of white pixels, and in order to determine the number of black pixels, the complement of the image is obtained with the equation 2.

Number of black pixels = Total number of pixels - Number of white pixels

Similarly, the area of the pixels is calculated based on the size of the binarized image. This is expressed as presented in equation 3.

Area of white pixels = Number of white pixels \times pixel area

Where: *Pixel area* is determined by the physical dimensions of the image and the resolution at which the image was captured.



Fig. 1. Flowchart describing the image processing steps and the generated files.

2.6 Edge extraction

In this study, edge extraction was performed using the **Canny edge detection** method, which is widely known for its effectiveness in detecting boundaries while reducing noise. The Canny method involves several key stages to detect edges with high precision. The steps followed for its implementation in Python are outlined as follows:

1. Gaussian Smoothing: A Gaussian filter was applied to smooth the image and reduce noise. This step helps to prevent false edges that may arise due to small variations in pixel intensity. The amount of smoothing is controlled by the kernel size (usually 3x3, 5x5, etc.) and the standard deviation (sigma).

2. Gradient Calculation: The Canny algorithm calculates the gradient magnitude and direction to identify areas of high intensity change. This is done using the Sobel operator, which estimates the first derivatives in both the horizontal and vertical directions (x and y gradients). The gradients represent the rate of change in intensity, which highlights the edges.

3. Non-Maximum Suppression: After the gradient is calculated, non-maximum suppression is applied to thin out the edges, retaining only the most significant ones. This step reduces the number of spurious edges and provides a cleaner result.

4. Edge Tracking by Hysteresis: In this step, two thresholds (high and low) are used to identify strong and weak edges. Strong edges are directly accepted as part of the boundary, while weak edges are only included if they are connected to strong edges. This step ensures that the edges detected are continuous and relevant.

The Canny edge detection was implemented in Python using OpenCV's `cv2.Canny()` function, which allows for setting the low and high thresholds, as well as other parameters to fine-tune the edge detection process.

2.6.1 Extracted morphological metrics

After edge detection, the contours were extracted from the binary image to measure several morphological properties. These properties provide valuable insights into the shape and structure of the regions of interest. The following metrics were computed:

Average Length (Perimeter): The average length of the contours is the mean perimeter of the detected objects. It can be calculated using the following formula:

$$P = \sum_{i=1}^n \text{Length of contour}_i$$

Where: n is the number of contours and length of contour $_i$ is the perimeter of the i -th contour.

Average Area: The area of each contour is calculated using the formula for polygon area. The average area is then obtained by averaging the areas of all contours.

$$A = \sum_{i=1}^n \text{Area of contour}_i$$

Where area of contour $_i$ is the area of the i -th contour.

Average Circularity: Circularity measures how close the contour is to a perfect circle. It is calculated using the formula:

$$C = \frac{4\pi A}{P^2}$$

Where A is the area of the contour and P is the perimeter of the contour. A circularity value of 1 indicates a perfect circle.

Average Solidity: Solidity is the ratio of the area of the contour to the area of the convex hull of the contour. It is calculated as:

$$S = \frac{A}{A_{hull}}$$

Where A is the area of the contour, and A_{hull} is the area of the convex hull (the smallest convex shape that encloses the contour).

Average Aspect Ratio: The aspect ratio measures the elongation of the contour and is defined as the ratio of the width to the height of the bounding box that encloses the contour:

$$R = \frac{W}{H}$$

Where W is the width and H is the height of the bounding box.

Number of Contours: The total number of contours detected in the image is simply the count of the contours that were extracted from the binary edge-detected image.

These steps and equations allow to quantify and analyze the morphological properties of the structures detected in the histological images, aiding in a detailed understanding of their characteristics.

2.7 Development of the User Application with Tkinter

For the development of the user application, the Tkinter library is employed. Tkinter is the standard Python interface to the Tk GUI toolkit, and it provides a fast and easy way to create GUI applications. Tkinter is included with the standard Python distribution, making it readily accessible for Python developers.

Tkinter is utilized to design and implement the graphical user interface (GUI) of the application. The following features are integrated into the application using Tkinter:

- **Window Management:** The creation of the main application window and additional dialog boxes for user interaction.
- **Widgets:** The implementation of various widgets such as buttons, labels, text boxes, and menus to facilitate user input and control.
- **Event Handling:** The integration of event-driven programming to handle user actions like button clicks and menu selections, ensuring a responsive user experience.
- **File Handling:** The incorporation of file dialogs to enable users to open, save, and manage image files within the application.

The combination of these features provides a robust and user-friendly interface, allowing users to efficiently process and analyze the acquired images.

2.8 Development Methodology: Iterative and Incremental Approach

The development of the user application follows the Iterative and Incremental approach. This methodology is based on the repetition of a series of iterations to allow a continuous feedback and improvements from the final user. The main steps of this methodology as applied in this proposal is described below:

- **Initial Development:** An initial development of the application is carried on, focusing on the core functions required in the project and for the final user.

- **User Feedback:** The initial version is presented to the end-user, who test the application and provides feedback on its functionality, usability, and any areas needing improvement.

- **Refinement:** Based on the user's feedback, the developers make the necessary changes to improve the application functionality. This includes fixing any issues, adding new features, and improving the user usability.

- **Iteration:** The new and refined version is then presented again to the final user for further feedback. This process is repeated iteratively until the application meets the user's requirements and expectations.

By employing this iterative and incremental approach, the developers ensure that the final application is user-friendly, efficient, and achieve the specific needs of the final user, allowing an early detection and resolution of issues, leading to a more robust and reliable application.

Hematoxylin-eosin staining was performed on slides to identify pneumonic areas, revealing a dose-dependent relationship. The acquired TIFF images were converted to JPEG format using Python version 3.1 and libraries *matplotlib*, *numpy*, and *cv2* for digital image processing (DIP). The user interface allows selection of folders containing original images for the described process (Figure 2). It also facilitates selection of folders containing binarized images for quantifying black areas (Figure 3).

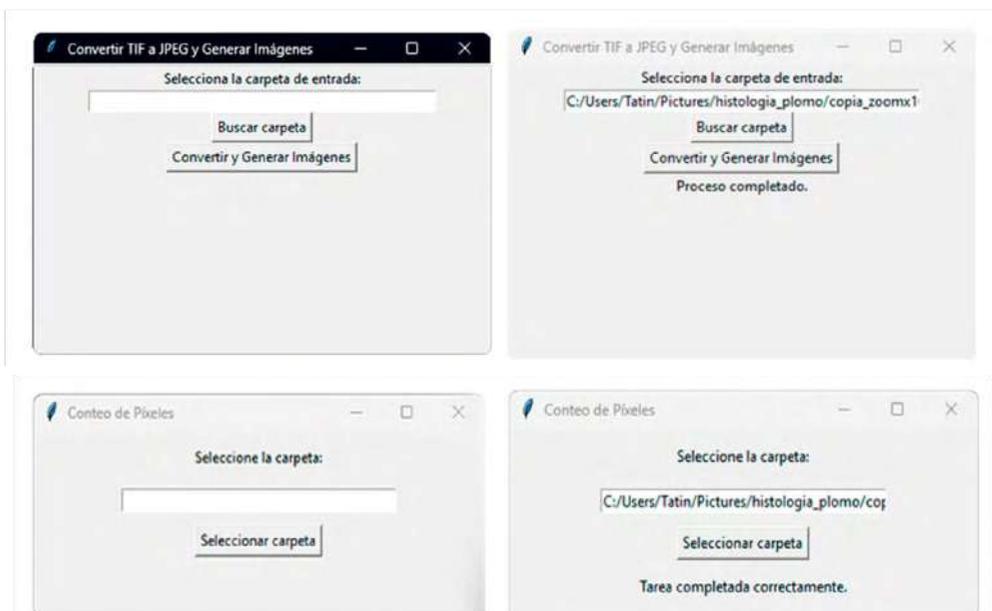


Fig. 2 Users select the folder containing original images. Results are displayed on-screen upon the process finish.

Fig. 3. The interface enables users to select the folder with binarized images. Upon completion, results are displayed on-screen.

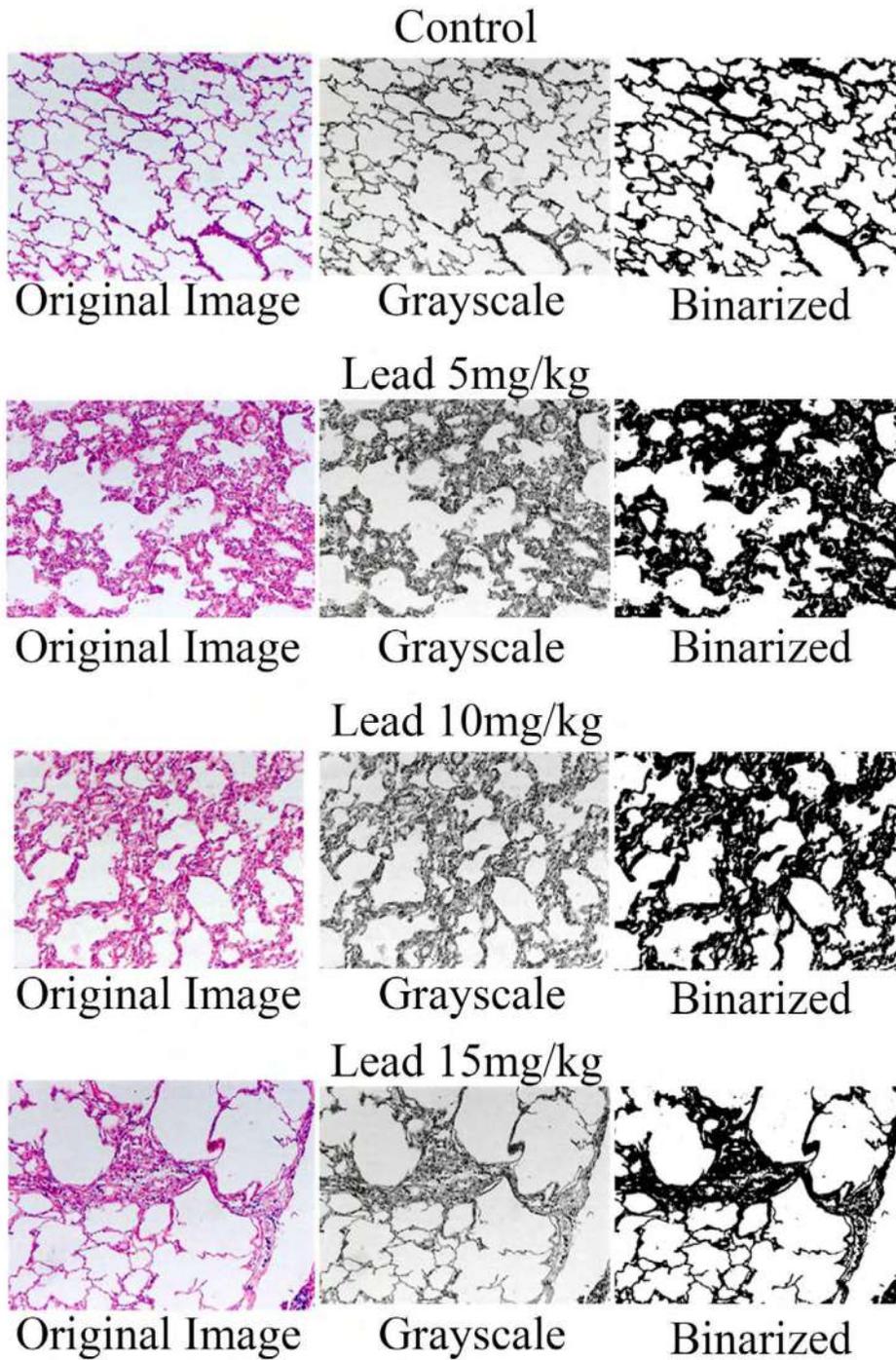


Fig. 4. Comparison of Different Generated Images.

Grayscale conversion applied thresholds (0.2989, 0.5870, 0.1140) producing an image with observable changes for the user. Binarization followed, setting values below the threshold to 0 and above to 255, with thresholds manually adjusted by experts. Representative images are shown in Figure 4 demonstrating the final binarized images stored in JPEG for subsequent area quantification.

The final output is a CSV file containing image file names, counts and areas of black and white pixels. The tests were performed using seven original images with 1384 x 1032 resolution.

The Canny edge detection method was applied to extract the contours of structures in the histological images. The process began with converting the image to grayscale and applying Gaussian smoothing to reduce noise. The gradient magnitude and direction were calculated using the Sobel operator, followed by non-maximum suppression to thin out the edges. Finally, edge tracking by hysteresis was performed to connect weak edges to strong ones, ensuring continuous contours. The extracted contours were then analyzed for various morphological metrics, including average length, area, circularity, solidity, aspect ratio, and the number of contours. The resulting contours provide critical information for understanding the morphological characteristics of the tissue structures, as illustrated in the following image (Figure 5).

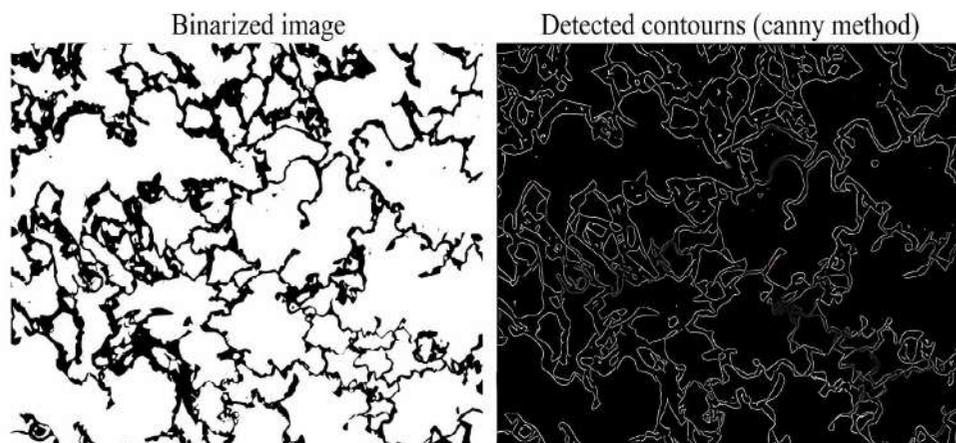


Fig. 5. Binarized histological image (left) and the result of edge detection using the Canny method (right). The binarized image highlights the regions of interest, while the Canny edge detection algorithm effectively identifies the contours of the tissue structures, providing clear boundaries for further morphological analysis.

RESULTS

These results show a statistically significant increase in pneumonic areas in groups treated with lead compared to the negative control group (5mg/kg $p < 0.05$, 10mg/kg $p < 0.01$, 15mg/kg $p < 0.001$) (Table 1). There is also a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the group treated with 15mg/kg body weight of $Pb(NO_3)_2$ compared to the $NaNO_3$ control group. Also we noted a statistically significant increase in the group of 15mg/kg of body weight of $Pb(NO_3)_2$ compared to the group of 10mg/kg of body weight of $Pb(NO_3)_2$.

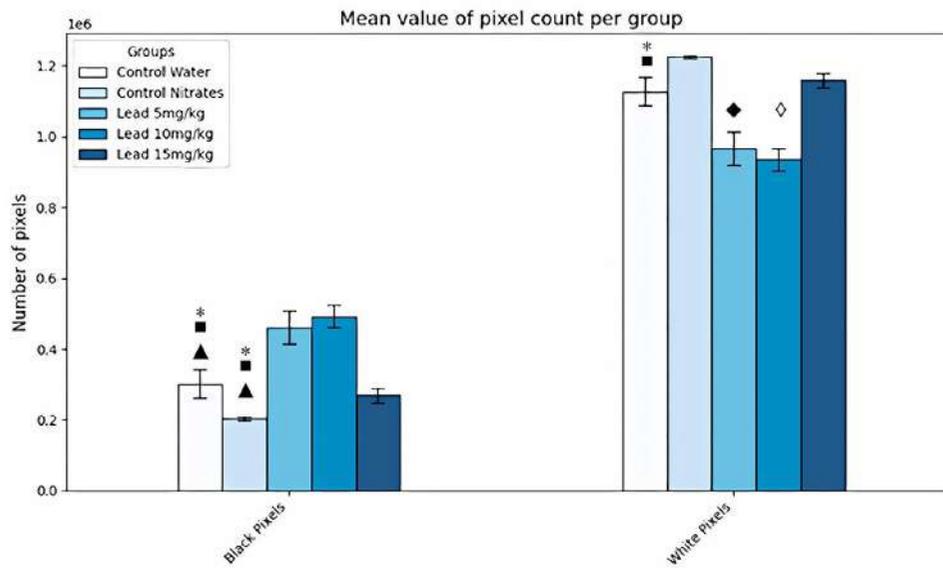


Fig. 6. Bar graphs showing the average pixel count of black pixels (left) and white pixels (right) in the histological images. The graphs illustrate the differences in pixel distribution across the experimental groups and the control group, highlighting variations in tissue characteristics (* Control vs Pb 5 mg/kg, ■ Control vs Pb 10 mg/kg, ▲ Control vs Pb 15mg/kg, ● Pb 5 mg/kg vs Pb 10 mg/kg, ◆ Pb 5 mg/kg vs 15 mg/kg and Pb and ◇ 10 mg/kg vs Pb 15 mg/kg).

Table 1. ANOVA results for the different groups regarding the quantity of white pixels and the area of black pixels. Significant differences were observed between the groups, with a p-value < 0.05, indicating statistical significance in both metrics.

Group	Number of black pixels		Area of white pixels %	
	F-Value	P-value	F-Value	P-Value
Control vs Pb 5mg/kg	4.8699	0.0343	4.8699	0.0343
Control vs Pb 10mg/kg	6.2019	0.0179	6.2019	0.0179
Control vs Pb 15mg/kg	13.6331	0.0008	20.3207	0.8254
Pb 5mg/kg vs Pb 10mg/kg	0.022	0.8827	0.022	0.8827
Pb 5mg/kg vs Pb 15mg/kg	1.3484	0.2538	2.9639	0.0945
Pb 10mg/kg vs Pb 15mg/kg	2.094	0.1573	4.352	0.0447

The analysis of morphological features revealed significant differences between the experimental groups ($p < 0.05$) see (Table 2, Table 3, Table 4). These differences can be attributed to alterations induced by apoptotic processes, inflammation, and fibrosis. The observed variations in tissue structure align with the pathological changes associated with these cellular processes, suggesting that exposure to lead may activate mechanisms that disrupt cellular homeostasis and promote tissue damage.

Table 2. ANOVA results for the different groups comparing the average lengths and areas of extracted edges. Significant differences were observed between the control group and the treatment groups, with a p-value < 0.05, indicating statistical significance in edge length.

Group	Average Lengths		Average Areas	
	F-Statistic	P-Value	F-Statistic	P-Value
Control vs Pb 5mg/kg	13.4176713	0.00436726	3.27563009	0.10042356
Control vs Pb 10mg/kg	6.69537332	0.04134823	1.5344996	0.26169976
Control vs Pb 15mg/kg	4.47763601	0.08794557	1.9383782	0.22259372
Pb 5mg/kg vs Pb 10mg/kg	0.19417777	0.67112661	0.01499496	0.90555984
Pb 5mg/kg vs Pb 15mg/kg	0.24905295	0.63304162	0.53388689	0.48870582
Pb 10mg/kg vs Pb 15mg/kg	0.05868566	0.82420211	5.73658097	0.09629668

Although significant differences are observed in the average length metric between the groups, it is interesting to note that there are no significant differences between groups with different lead concentrations, such as Pb 5 mg/kg, compared to the other experimental groups, Pb 10 mg/kg and Pb 15 mg/kg. However, a significant difference is observed between the control group and the Pb 5 mg/kg and Pb 10 mg/kg groups. Additionally, regarding the analyzed average area metric, no significant differences are observed between any of the groups (table 2).

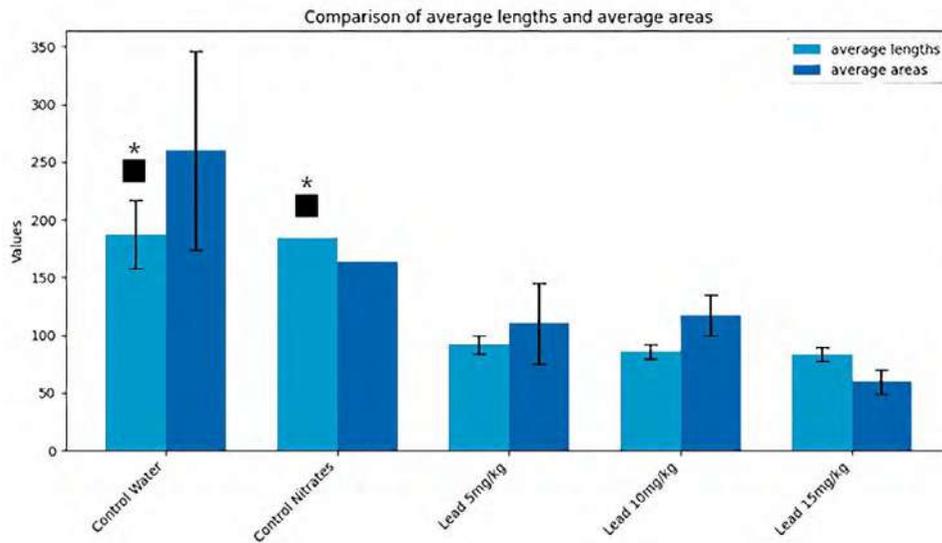


Fig. 7. Bar graphs depicting the average lengths and areas of the detected edges in the histological images. The graphs highlight differences in pixel distribution between the experimental groups and the control group, emphasizing variations in tissue characteristics (* Control vs Pb 5 mg/kg, ■ Control vs Pb 10 mg/kg, ▲ Control vs Pb 15 mg/kg, ● Pb 5 mg/kg vs Pb 10 mg/kg, ◆ Pb 5 mg/kg vs 15 mg/kg and Pb and ◇ 10 mg/kg vs Pb 15 mg/kg).

Table 3. ANOVA results for the different groups comparing the average circularity and solidity of extracted edges. Significant differences were observed between the control group and the treatment groups, with a p-value < 0.05, indicating statistical significance in both metrics.

Group	Average circularities		Average Solidity	
	F-Statistic	P-Value	F-Statistic	P-Value
Control vs Pb 5mg/kg	15.7160415	0.00266762	19.4320763	0.00131815
Control vs Pb 10mg/kg	45.4321066	0.00051949	46.9040987	0.00047669
Control vs Pb 15mg/kg	4.49078845	0.08760011	7.9278519	0.03729941
Pb 5mg/kg vs Pb10mg/kg	1.20E-06	0.99915429	0.05529784	0.81999604
Pb 5mg/kg vs Pb15mg/kg	2.49573621	0.15816577	1.96059705	0.20417988
Pb 10mg/kg vs Pb 15mg/kg	108.037305	0.00190031	42.4591114	0.00734285

Moreover, regarding the average circularity metric, significant differences are observed in the comparisons between the control group and the Pb 5 mg/kg and Pb 10 mg/kg groups, as well as between the Pb 10 mg/kg and Pb 15 mg/kg groups. No significant differences are observed in the remaining comparisons. Meanwhile, in the average solidity metric, significant differences are observed between the control group and the Pb 5 mg/kg, Pb 10 mg/kg and Pb 15 mg/kg groups, and between the Pb 10 mg/kg and Pb 15 mg/kg groups (Table 3).

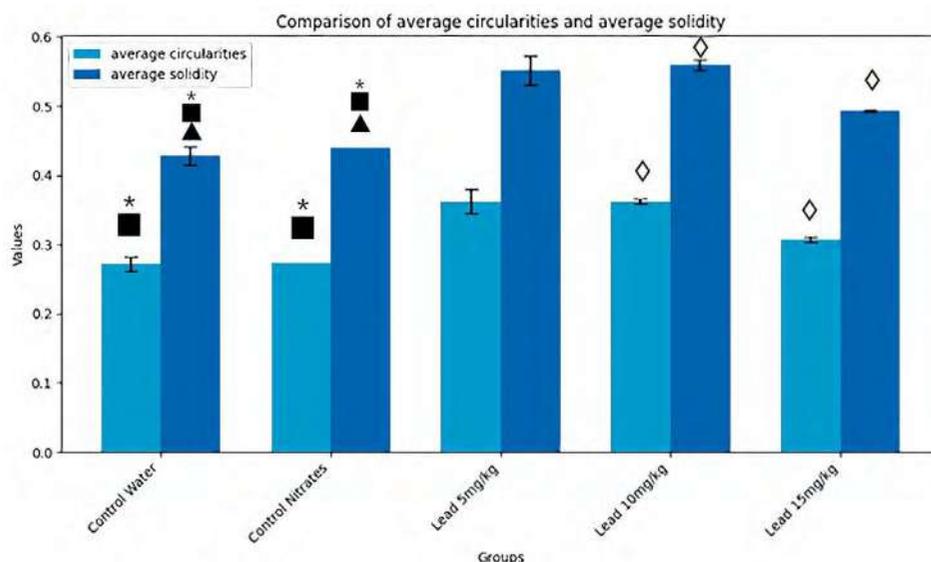


Fig. 8. Bar graphs showing the average circularity and solidity of the analyzed tissues. Significant differences were observed in both morphological characteristics across the groups (* Control vs Pb 5 mg/kg, ■ Control vs Pb 10 mg/kg, ▲ Control vs Pb 15 mg/kg, ● Pb 5 mg/kg vs Pb 10 mg/kg, ◆ Pb 5 mg/kg vs 15 mg/kg and Pb and ◇ 10 mg/kg vs Pb 15mg/kg).

Table 4. ANOVA results for the diverse groups comparing the average aspect ratio and number of contours of extracted edges. Significant differences were observed between the control group and the treatment groups, with a p-value < 0.05, indicating statistical significance in both metrics.

Group	Average circularities		Average Solidity	
	F-Statistic	P-Value	F-Statistic	P-Value
Control vs Pb 5mg/kg	15.7160415	0.00266762	19.4320763	0.00131815
Control vs Pb 10mg/kg	45.4321066	0.00051949	46.9040987	0.00047669
Control vs Pb 15mg/kg	4.49078845	0.08760011	7.9278519	0.03729941
Pb 5mg/kg vs Pb10mg/kg	1.20E-06	0.99915429	0.05529784	0.81999604
Pb 5mg/kg vs Pb15mg/kg	2.49573621	0.15816577	1.96059705	0.20417988
Pb 10mg/kg vs Pb 15mg/kg	108.037305	0.00190031	42.4591114	0.00734285

The values obtained in the comparisons of the aspect ratio metric show significant differences between the control group and the Pb 5 mg/kg and Pb 10 mg/kg groups. Additionally, significant differences are observed among the experimental groups, specifically between Pb 5 mg/kg vs. Pb 10 mg/kg and Pb 10 mg/kg vs. Pb 15 mg/kg. Meanwhile, in the average number of contours metric, significant differences are observed only in the comparisons between the control group and the Pb 10 mg/kg and Pb 15 mg/kg groups. (Table 4).

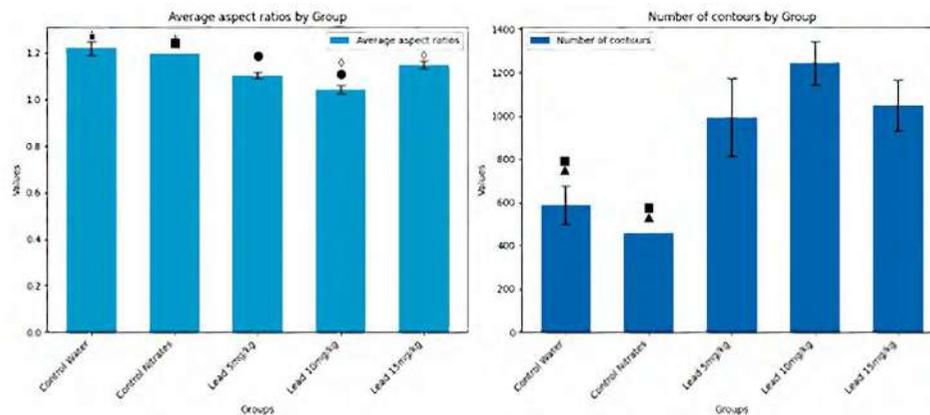


Fig. 9. On the left, bar graphs display comparisons between the groups for the "aspect ratio" metric, on the right, the graphs show the number of detected contours. Significant differences are evident in both metrics, with the control group differing notably from the experimental groups (* Control vs Pb 5 mg/kg, ■ Control vs Pb 10mg/kg, ▲ Control vs Pb 15 mg/kg, ● Pb 5 mg/kg vs Pb 10 mg/kg, ◆ Pb 5 mg/kg vs 15 mg/kg and Pb and ◇ 10 mg/kg vs Pb 15 mg/kg).

DISCUSSIONS AND CONCLUSIONS

The results show lung damage on the lead treated individuals. When these images were processed in the software created by Gerardo Neftalí Rivera Rojas from the Master's Degree in Information Processing Sciences at the Autonomous University of Zacatecas, a statistically significant increase in pneumonic areas was observed in male Wistar rats treated with lead nitrate at doses of 5 mg/kg, 10 mg/kg, and 15 mg/kg compared to the control group (Figure 4). Additionally, previous studies on Wistar rats exposed to approximately 500 mg/L per day for one and two weeks reported an increased number of lymphocytes in the treated groups compared to controls, further highlighting the immune response to lead exposure (Adeyomoye & Adewumi, 2019). The increase in lymphocytes may be associated with pro-inflammatory processes, linked to the thickening of the alveolar tissue.

Some structural alterations were found in these images, including disorganization of the alveoli and thickened interalveolar septa. These findings may indicate that the lung tissue had undergone fibrosis, which coincides with our results (ONARLIOĞLU et al., 1999). In Masson's trichome stain you can see black nuclei, reddish muscle and cytoplasm, and blue or green collagen, responsible for maintaining the adequate elasticity that allows the lung to carry out its mechanical activity, therefore, when these fibers disappear, it indicates a process of pulmonary fibrosis (Carrera &

Hernan, 2013). Image processing and basic quantification of alveolar tissue allow inference of potential morphological changes, aiding professionals in assessing structural damage.

This study addresses morphological characteristics that may be associated with lung tissue damage due to chronic lead exposure in Wistar rats. Metrics such as tissue area, contour count, solidity, length, aspect ratio, and circularity could serve as quantifiable indicators of damage, not only through the increase in alveolar tissue thickness. This initial approach paves the way for the quantifiable analysis of lung damage using microscopic images. These processes, taking a few minutes on many current devices, could benefit scientists involved in this specific research. Additionally, quantification of regions of interest such as nuclei, collagen accumulations, or texture differences features reported by (Ségard et al., 2024) will be considered for future improvements to the software presented.

Ethical statement

The project was approved by the Research Committee (COFEPRIS-19CI 32056045) and the Bioethics Committee (CEI-UAO/UAZ0002-R/2022).

REFERENCES

- Adeyomoye, O. I., & Adewumi, N. A. (2019). Lead exposure causes alteration of haematological indices in adult female Wistar rats. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 7(6), 30-34.
- Aschner, M., Skalny, A. V., Lu, R., Santamaria, A., Zhou, J.-C., Ke, T., Karganov, M. Y., Tsatsakis, A., Golokhvast, K. S., & Bowman, A. B. (2023). The role of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) modulation in heavy metal toxicity. *Archives of Toxicology*, 97(5), 1299-1318.
- Carrera, L. G., & Hernan, G. B. (2013). Pulmonary manifestations of collagen diseases. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*, 49(6), 249-260.
- Charkiewicz, A. E., & Backstrand, J. R. (2020). Lead Toxicity and Pollution in Poland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/ijerph17124385>
- Dietert, R. R., & Piepenbrink, M. S. (2006). Lead and immune function. *Critical reviews in toxicology*, 36(4), 359-385.

- Ding, X., He, R., Zhang, T., Mei, L., Zhu, S., Wang, C., Liao, Y., Wang, D., Wang, H., & Guo, J. (2023). Lung toxicity and molecular mechanisms of lead-based perovskite nanoparticles in the respiratory system. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *15*(36), 42139-42152.
- Dos Santos, N. R., Rodrigues, J. L. G., Bandeira, M. de J., Anjos, A. L. dos S., Araújo, C. F. da S., Adan, L. F. F., & Menezes-Filho, J. A. (2022). Manganese and lead exposure and early puberty onset in children living near a ferromanganese alloy plant. *International journal of environmental research and public health*, *19*(12), 7158.
- Fang, Y., Lu, L., Liang, Y., Peng, D., Aschner, M., & Jiang, Y. (2021). Signal transduction associated with lead-induced neurological disorders: A review. *Food and Chemical Toxicology*, *150*, 112063.
- Hoover, C., Dickerson, A. S., Specht, A. J., & Hoover, G. G. (2023). Firearm-related lead exposure and pediatric lead levels in Massachusetts: A decade of evidence (2010-2019). *Environmental Research*, *227*, 115719. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115719>
- Hübner, R.-H., Gitter, W., Eddine El Mokhtari, N., Mathiak, M., Both, M., Bolte, H., Freitag-Wolf, S., & Bewig, B. (2008). Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques*, *44*(4), 507-517.
- Jiang, C.-B., Kao, C.-S., Chien, L.-C., Chen, Y.-J., & Liao, K.-W. (2022). Associations among prenatal and postnatal arsenic, lead, and cadmium exposures and motor development in 3-year-old children: A longitudinal birth cohort study in Taiwan. *Environmental Science and Pollution Research*, *29*(28), 43191-43200.
- Jing, H., Zhang, Q., Li, S., & Gao, X. (2020). Pb exposure triggers MAPK-dependent inflammation by activating oxidative stress and miRNA-155 expression in carp head kidney. *Fish & Shellfish Immunology*, *106*, 219-227.
- Kothapalli, C. R. (2021). Differential impact of heavy metals on neurotoxicity during development and in aging central nervous system. *Current Opinion in Toxicology*, *26*, 33-38.
- Kou, H., Ya, J., Gao, X., & Zhao, H. (2020). The effects of chronic lead exposure on the liver of female Japanese quail (*Coturnix japonica*): Histopathological damages, oxidative stress and AMP-activated protein kinase based lipid metabolism disorder. *Ecotoxicology and environmental safety*, *190*, 110055.

- Kumar, A., Kumar, A., MMS, C.-P., Chaturvedi, A. K., Shabnam, A. A., Subrahmanyam, G., Mondal, R., Gupta, D. K., Malyan, S. K., & Kumar, S. S. (2020). Lead toxicity: Health hazards, influence on food chain, and sustainable remediation approaches. *International journal of environmental research and public health*, *17*(7), 2179.
- Lee, H. J., & Lee, H.-Y. (2024). Characterization of lung function impairment and pathological changes induced by chronic lead and cadmium inhalation: Insights from a mouse model study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *283*, 116776.
- Li, L., Li, W., Liu, Y., Jin, X., Yu, Y., & Lin, H. (2023). TBBPA and lead co-exposure induces grass carp liver cells apoptosis via ROS/JAK2/STAT3 signaling axis. *Fish & Shellfish Immunology*, *142*, 109100.
- ONARLIOĞLU, B., ONARLIOĞLU, T., & Erdal, S. (1999). The Effect of Lead Inhalation on Rat Lung Morphology. *Turkish Journal of Medical Sciences*, *29*(6), 617-622.
- Paithankar, J. G., Saini, S., Dwivedi, S., Sharma, A., & Chowdhuri, D. K. (2021). Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction. *Chemosphere*, *262*, 128350.
- Ségard, B.-D., Kimura, K., Matsuoka, Y., Imamura, T., Ikeda, A., & Iwamiya, T. (2024). Quantification of fibrosis extend and airspace availability in lung: A semi-automatic ImageJ/Fiji toolbox. *Plos one*, *19*(2), e0298015.
- Tarragó, O., & Brown, M. J. (2017). *Lead toxicity*.
- Wang, D., Fu, X., Zhang, J., Xu, C., Hu, Q., & Lin, W. (2020). Association between blood lead level during pregnancy and birth weight: A meta-analysis. *American Journal of Industrial Medicine*, *63*(12), 1085-1094.
- Wang, L., Zheng, Y., Zhang, G., Han, X., Li, S., & Zhao, H. (2021). Lead exposure induced inflammation in bursa of Fabricius of Japanese quail (*C. japonica*) via NF- κ B pathway activation and Wnt/ β -catenin signaling inhibition. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *224*, 111587.
- Wang, X., Mukherjee, B., & Park, S. K. (2018a). Associations of cumulative exposure to heavy metal mixtures with obesity and its comorbidities among US adults in NHANES 2003–2014. *Environment international*, *121*, 683-694.

- Wang, X., Mukherjee, B., & Park, S. K. (2018b). Associations of cumulative exposure to heavy metal mixtures with obesity and its comorbidities among US adults in NHANES 2003–2014. *Environment international*, *121*, 683–694.
- West, C. M., Ivy, C. M., Husnudinov, R., & Scott, G. R. (2021). Evolution and developmental plasticity of lung structure in high-altitude deer mice. *Journal of Comparative Physiology B*, *191*, 385–396.
- Xu, L., Huo, X., Liu, Y., Zhang, Y., Qin, Q., & Xu, X. (2020). Hearing loss risk and DNA methylation signatures in preschool children following lead and cadmium exposure from an electronic waste recycling area. *Chemosphere*, *246*, 125829.
- Yu, Y.-L., Yang, W.-Y., Hara, A., Asayama, K., Roels, H. A., Nawrot, T. S., & Staessen, J. A. (2023). Public and occupational health risks related to lead exposure updated according to present-day blood lead levels. *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, *46*(2), 395–407. <https://doi.org/10.1038/s41440-022-01069-x>

Further considerations:

The authors believe that a larger sample of subjects would be helpful for improving the sensitivity of results.



Co-amorfo de Sulfasalazina:L-Arginina con propiedades de solubilidad y velocidad de disolución mejoradas para una mayor biodisponibilidad y eficacia terapéutica.

Co-amorphous of sulfasalazine: arginine with improved solubility and dissolution rate properties for enhanced bioavailability and therapeutic efficacy.

Javier Hernández Illescas¹, Oscar García Barradas², Fernando López Fentanes³, Jorge G. Domínguez Chávez⁴, Karina Mondragón Vásquez⁵

Introducción. La solubilidad y la velocidad de disolución son dos factores fisicoquímicos clave en la eficacia terapéutica de un fármaco administrado por vía oral, ya que estos parámetros determinan la cantidad de fármaco disponible para su absorción. En este contexto, el desarrollo de co-amorfos farmacéuticos es una estrategia prometedora para mejorar la solubilidad y la velocidad de disolución de compuestos poco solubles en medios fisiológicos. En este sentido, la sulfasalazina se caracteriza por una elevada permeabilidad intestinal pero una baja solubilidad que resulta en una biodisponibilidad menor al 15%. Con base en lo anterior, la obtención de sistemas co-amorfos de sulfasalazina que posean mayor solubilidad y velocidad de disolución, incrementaría la cantidad de fármaco disponible para su absorción, mejorando su biodisponibilidad y su eficacia terapéutica. **Objetivo:** Obtener y caracterizar química y biofarmacéuticamente un co-amorfo de sulfasalazina:L-Arginina con propiedades mejoradas de solubilidad y velocidad de disolución. **Metodología** el co-amorfo se obtuvo mediante las técnicas de slurry y de molienda mecanoquímica en proporción 1:1 de sulfasalazina y L-Arginina. Su caracterización incluyó la difracción de rayos X para determinar su naturaleza cristalina o amorfa, espectroscopía FT-IR y microscopía Raman para analizar interacciones intermoleculares y homogeneidad. La estabilidad térmica y la presencia de solvatos o hidratos fueron evaluadas con calorimetría diferencial y termogravimetría. Además, se analizaron su estabilidad en medios fisiológicos, solubilidad y la velocidad de disolución.

<https://doi.org/10.25009/rmuv.2025.1.131>

Recibido: 18/03/25

Aprobado: 06/05/25

¹Facultad de Bioanálisis-Veracruz, Universidad Veracruzana. Doctor en Ciencias Químico-Biológicas.

²Instituto de Química Aplicada, Universidad Veracruzana. Doctor en Ciencias (Química Orgánica).

³Facultad de Bioanálisis-Veracruz, Universidad Veracruzana. Doctor en Educación.

⁴Facultad de Bioanálisis-Veracruz, Universidad Veracruzana. Doctor en Ciencias. Autor por correspondencia: jorgedominguez@uv.mx

⁵Facultad de Bioanálisis-Veracruz, Universidad Veracruzana. Doctor en Ciencias Químicas. Autora por correspondencia: kmondragon@uv.mx

Resultados: Se obtuvo un co-amorfo puro con estequiometría sulfasalazina:L-Arginina:agua de 1:1:2, estable hasta 50 °C sin humedad y hasta 40 °C con 75 % de humedad relativa. Este mostró estabilidad en medios con pH 1.2, 4.5 y 6.8, y triplicó la solubilidad y la velocidad de disolución en comparación con la sulfasalazina libre. **Conclusión:** La obtención de un co-amorfo estable y con mejor solubilidad sugiere un potencial aumento en la biodisponibilidad de la sulfasalazina, favoreciendo su aplicación en formulaciones más eficaces. **Palabras clave:** co-amorfo, solubilidad, velocidad de disolución.

Introduction: Solubility and dissolution rate are two key physico-chemical factors in the therapeutic efficacy of an orally administered drug, as these parameters determine the amount of drug available for absorption. In this context, the development of pharmaceutical co-amorphoses is a promising strategy to improve both solubility and dissolution rate of poorly soluble compounds in physiological media. Sulfasalazine is characterised by high intestinal permeability but low solubility, resulting in a bioavailability of less than 15%. Based on the above, obtaining co-amorphous of sulfasalazine with higher solubility and dissolution rate would increase the amount of drug available for absorption, thereby improving its bioavailability. **Objective:** To obtain and characterize chemically and biopharmaceutically a sulfasalazine:L-arginine co-amorphous with improved solubility and dissolution rate properties. **Methods** The co-amorphous is obtained by slurry and/or mechanochemical milling in a 1:1 ratio of sulfasalazine and L-arginine. Its characterization included X-ray diffraction to determine its crystalline or amorphous nature, FT-IR spectroscopy and Raman microscopy to analyze intermolecular interactions and homogeneity. Thermal stability and the presence of solvates or hydrates were evaluated by differential calorimetry and thermogravimetry. In addition, their stability in physiological media, solubility and dissolution rate were analyzed. **Results:** A pure co-amorphous was obtained with a sulfasalazine:L-arginine:water stoichiometry of 1:1:2, which was stable up to 50°C without humidity and up to 40°C with 75% relative humidity. It showed stability in media with pH 1.2, 4.5 and 6.8 and tripled the solubility and dissolution rate compared to free sulfasalazine. **Conclusion:** Obtaining a stable co-amorph with better solubility suggests a potential increase in the bioavailability of sulfasalazine, favoring its application in more effective formulations. **Keywords:** co-amorphous, solubility, dissolution rate.

INTRODUCCIÓN

De los estados de la materia, el que predomina comercialmente en la industria farmacéutica es el sólido.¹ En donde la mayoría de los materiales farmacéuticos, tanto Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFAs) como excipientes y, la mayoría de las formas farmacéuticas son sólidas a temperatura ambiente. Esto es relevante, ya que las propiedades físicas y reológicas de

un IFA en estado sólido tienen importantes implicaciones en el desarrollo, en el procesamiento, en la formulación e incluso en la eficiencia de los productos farmacéuticos. Dos de las propiedades más importantes de los IFAs son la solubilidad y la velocidad de disolución, que pueden influir de manera determinante en parámetros tan importantes como la biodisponibilidad y la eficacia terapéutica.²

De manera general, y con base en su empaquetamiento molecular, los sólidos se pueden clasificar en sólidos cristalinos y en sólidos amorfos. La diferencia entre estos es el ordenamiento de las moléculas a corto y a largo alcance, en donde, el ordenamiento a corto alcance se refiere a la forma en que moléculas vecinas se agrupan o enlazan entre sí, mientras que el ordenamiento a largo alcance se refiere a la periodicidad o regularidad que presentan cientos de miles de moléculas agregadas y que se propaga tridimensionalmente a una distancia “considerable” para formar la estructura del sólido. De este modo, en la forma cristalina, las moléculas se agrupan presentando un ordenamiento definido a corto y a largo alcance, mientras que en el estado amorfo las moléculas presentan un ordenamiento a corto alcance, de forma similar al estado cristalino, pero no poseen un empaquetamiento definido a largo alcance; lo que trae como consecuencia que el estado amorfo sea la forma de mayor energía en la que puede presentarse un material sólido.³ Como resultado de esto, los sólidos amorfos generalmente poseen una alta movilidad molecular y un incremento en sus propiedades termodinámicas, lo que conlleva a que parámetros como la solubilidad y la velocidad de disolución incrementen con respecto a los sólidos cristalinos.⁴

En términos de sólidos farmacéuticos esto es relevante, ya que más del 60% de los medicamentos que se encuentran en el mercado mundial presentan importantes problemas de solubilidad; por lo que un incremento en la solubilidad y en la velocidad de disolución podría

potenciar su biodisponibilidad, lo que conllevaría a una mejor eficiencia terapéutica y a una reducción de la dosis administrada. Con base en esto, el uso de IFAs amorfos resulta atractivo para la industria farmacéutica, sin embargo, son poco utilizados debido a su alta inestabilidad que es consecuencia de su alta energía interna y de su alta movilidad molecular, lo que les confiere una considerable reactividad química, una alta higroscopicidad y una fuerte tendencia a la cristalización; procesos que pueden ocurrir durante la manufactura, el almacenamiento o durante la administración del medicamento.⁵ Cabe mencionar, que cualquier cambio en la forma del sólido trae como consecuencia una modificación de sus propiedades fisicoquímicas y por ende de sus propiedades biofarmacéuticas, por lo que la búsqueda de metodologías que permitan la estabilización de sólidos amorfos bajo condiciones ambientales es un área de investigación atractiva e interesante de explorar.

Recientemente Rades y colaboradores⁶ reportaron una estrategia para estabilizar fármacos amorfos mediante la generación de sistemas multicomponentes co-amorfos utilizando los IFAs γ -indometacina y naproxeno; en donde el establecimiento de interacciones intermoleculares de puente de hidrógeno entre estos dos fármacos proporciona estabilidad a sus fases amorfas, impidiendo la cristalización de los componentes. Además, se observó en la fase co-amorfa γ -indometacina:naproxeno un incremento importante en la velocidad de disolución intrínseca ($0.419 \text{ mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) con respecto a los fármacos cristalinos por separado (naproxeno 0.30 y γ -indometacina $0.055 \text{ mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) e incluso al del sólido amorfo de la γ -indometacina ($0.316 \text{ mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$).

Estos resultados fundamentan que la obtención de co-amorfos es una estrategia interesante para incrementar la velocidad de disolución de los fármacos sin la necesidad de modificar su estructura química, sin embargo,

esta aproximación ha sido poco explorada y la principal limitación al obtener sistemas co-amorfos fármaco:fármaco es que ambos efectos terapéuticos deben ser complementarios entre sí, lo que reduce las posibilidades de obtención.⁷

Al respecto, una modificación interesante para la estabilización de fases amorfas es la obtención de sólidos co-amorfos de fármacos con moléculas pequeñas, inertes y sin acción terapéutica, en donde el establecimiento de las interacciones intermoleculares entre estos, no sólo estabilizaría la fase amorfa sino también modificaría parámetros fisicoquímicos de los fármacos como la solubilidad y la velocidad de disolución, aumentando con esto su biodisponibilidad pero sin alterar su estructura química y por ende su efecto terapéutico.

Con base en esto, un tipo de fármacos en donde la aplicación de esta estrategia es interesante, son los de la Clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, en donde su característica principal es que poseen una alta permeabilidad intestinal, pero presentan una baja solubilidad en medios acuosos y en donde cualquier aumento en la solubilidad mejoraría su eficacia terapéutica. Al respecto, el objetivo de este trabajo es obtener, caracterizar y evaluar fases sólidas co-amorfas estables de un fármaco de la clase II denominado Sulfasalazina con una molécula no tóxica para el organismo como el aminoácido L-Arginina. La Sulfasalazina (figura 1) es un fármaco derivado de las sulfonamidas que se utiliza como antiinflamatorio y es ampliamente utilizado para el tratamiento de la artritis reumatoide y para la colitis ulcerosa, sin embargo, a pesar de sus importantes aplicaciones en el tratamiento de estos padecimientos, este fármaco tiene una biodisponibilidad menor al 15% debido a que es prácticamente insoluble en agua.⁸



Figura 1. Estructura química del IFA Sulfasalazina

Dado que la estructura química del IFA Sulfasalazina contiene grupos funcionales donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, se seleccionó a un aminoácido como la L-Arginina que contiene grupos funcionales que pueden establecer interacciones intermoleculares complementarias y fuertes con el fármaco, además de que se encuentra la lista GRAS (Generally Recognized As Safe: Generalmente Reconocido Como Seguro) de la FDA (Food and Drug Administration)

por lo que su uso en un producto farmacéutico es seguro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las metodologías utilizadas para la obtención de la nueva forma sólida amorfa Sulfasalazina:*L*-arginina fueron la reacción de slurry (RS) y la reacción mecanoquímica por molienda (RM). La primera metodología consistió realizar una mezcla de estequiometría 1:1 Sulfasalazina:*L*-Arginina que se colocó en un vial provisto con un agitador magnético y se adicionaron unas gotas de agua como disolvente; la mezcla se agitó por 10 minutos y se secó por 24 horas a temperatura ambiente. La segunda metodología consistió en colocar la mezcla estequiométrica 1:1 Sulfasalazina:*L*-Arginina en un mortero de ágata para someterla a un proceso de molienda manual utilizando unas gotas de agua como disolvente hasta obtener una pasta uniforme que se secó a temperatura ambiente.

Los sólidos obtenidos de ambas metodologías se caracterizaron por difracción de rayos X de polvos (Difractómetro D2 Phaser de Bruker AXS con radiación $\text{Cu K}\alpha$ $\lambda=1.541 \text{ \AA}$ and detector SSD160 linkseye), espectroscopia de infrarrojo (FT-IR Nicolet iS50 de Thermo Scientific con ATR de cristal de diamante), microscopia Raman (Alpha-300M+ de Witec con láser Ne-He de 632 nm), calorimetría de barrido diferencial (DSC Q2000 de TA Instruments) y por análisis termogravimétrico (TGA Q50 de TA Instruments). Además, se determinó su velocidad de disolución intrínseca, su solubilidad termodinámica, su estabilidad física bajo condiciones controladas de humedad relativa (HR) y de temperatura (40°C, 0% HR; 50°C, 0% HR y; 40°, 50% HR) y en diferentes medios que simulan fluidos fisiológicamente relevantes como son buffers de fosfato a pH 6.8, de acetato a pH 4.5 y de ácido clorhídrico a pH 1.2 (todos los buffers se realizaron bajo las especificaciones la USP).⁹

Para el estudio de la velocidad de disolución, se utilizó un disolutor (SR8 plus Disolution test Station de Hanson) provisto de un equipo de Wood,¹⁰ en donde se colocó una pastilla elaborada con 150 mg del sólido amorfo obtenido y se comprimió con una fuerza de 60 Kg cm^{-2} . El estudio se realizó en un medio de buffer de fosfatos con un pH de 6.8 a 37°C, emulando un medio intestinal y agitando a 50 rpm. El monitoreo de la velocidad de disolución se realizó cada 3 min. hasta completar un tiempo de 60 min. y la determinación de la concentración por unidad de tiempo se realizó con un espectrofotómetro UV/Vis (S-3100 de Scinco) considerando el coeficiente de absorptividad del fármaco puro. Cabe mencionar que el mismo procedimiento se realizó con el fármaco puro, que sirvió como referencia.

Para los estudios de estabilidad en disoluciones que simulan medios fisiológicos, realizó una disolución sobresaturada tanto del fármaco como del co-amorfo obtenido y se dejaron en agitación magnética por 72 hrs; los sólidos resultantes se secaron y se analizaron por difracción de rayos X de polvos (DRXP) para determinar si la fase cambia o permanece sin modificación.

Para el estudio de estabilidad física indicativa a diferentes condiciones de temperatura y HR, se expusieron los sólidos a las condiciones indicadas arriba y el sólido resultante se analizó por difracción de rayos X de polvos para verificar su integridad.

Finalmente, para la prueba de solubilidad se realizaron disoluciones sobresaturadas del co-amorfo y del fármaco por separado y se monitoreó la cantidad de fármaco disuelto a las 24, 48 y 72 hrs. utilizando un espectrofotómetro UV/Vis y considerando el coeficiente de absorptividad del fármaco puro. Cabe mencionar que todos los análisis se realizaron por triplicado para asegurar su producibilidad y confiabilidad.

RESULTADOS

En la figura 2 se muestra la comparación de los difractogramas de Rayos X de polvos de los sólidos obtenidos por slurry y molienda y los difractogramas obtenidos de las materias primas (sulfasalazina y L-arginina) sometidas a las mismas condiciones de reacción, como se puede observar, Los difractogramas de las materias primas, muestran un patrón de difracción bien definido, mientras que los sólidos obtenidos por molienda y por slurry de las mezclas estequiométricas 1:1 sulfasalazina:L-arginina, muestran un halo difuso y sin picos de difracción.

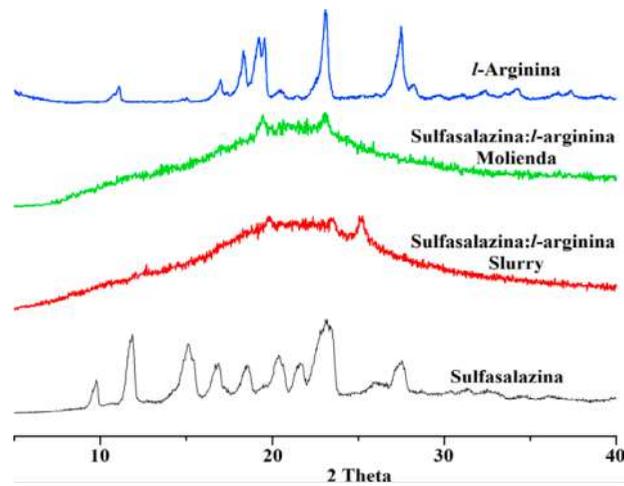


Figura 2.
Difractogramas de Rayos X de polvos.

Los espectros de FT-IR para las materias primas sulfasalazina y arginina; y el co-amorfo sulfasalazina:L-arginina se muestra en la figura 3, mientras que la asignación de las bandas vibracionales se observa en la tabla 1.

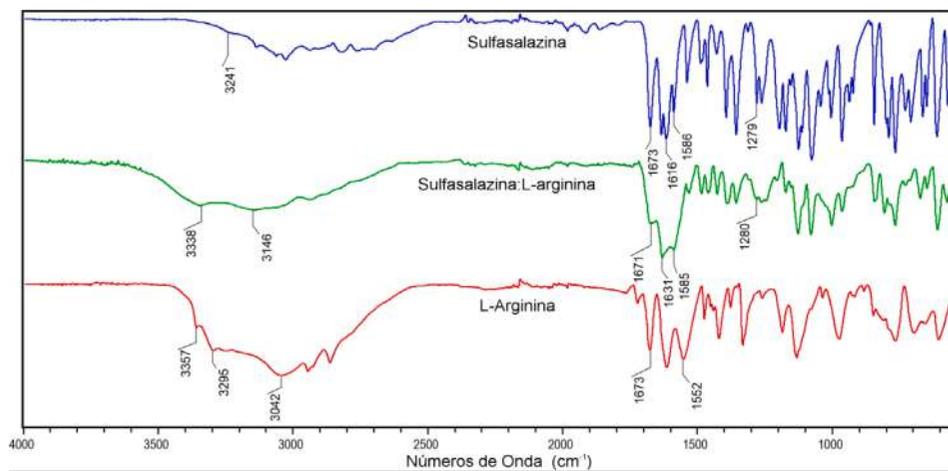


Figura 3.
Espectros de FT-IR.

Asignación	Sulfasalazina ¹¹	L-Arginina ¹²	Sulfasalazina:L-Arginina
ν (O-H) estiramiento	3241	-----	3338
ν (C=O) estiramiento	1673	-----	1671
ν (N-H) estiramiento	1616	-----	1631
ν (N=N) estiramiento	1586	-----	1585
ν (O=S=O) estiramiento	1279	-----	1280
ν (N-H) estiramiento NH ₂ amino	-----	3357	3338
ν (N-H) estiramiento Guanidina	-----	3295	3338
ν (O-H) estiramiento	-----	3042	3146
ν (C=O) estiramiento	-----	1673	1671
ν (N-H) flexión	-----	1555	1585

Tabla 1. Asignación de las bandas vibracionales de los grupos funcionales que pueden establecer puentes de hidrógeno. Valores en cm⁻¹.

Para el análisis por microscopía Raman, inicialmente se determinaron los espectros Raman del co-amorfo Sulfasalazina:L-Arginina (figura 4c) y las materias primas (figura 4a, L-Arginina y 4b Sulfasalazina). La figura 4d, muestra la imagen producida por el mapeo de la superficie de una tableta hecha de la fase co-amorfa con la finalidad de conocer la distribución de los componentes antes mencionados, considerando la obtención de un espectro raman cada 100 nm de una superficie total de 10 μm .

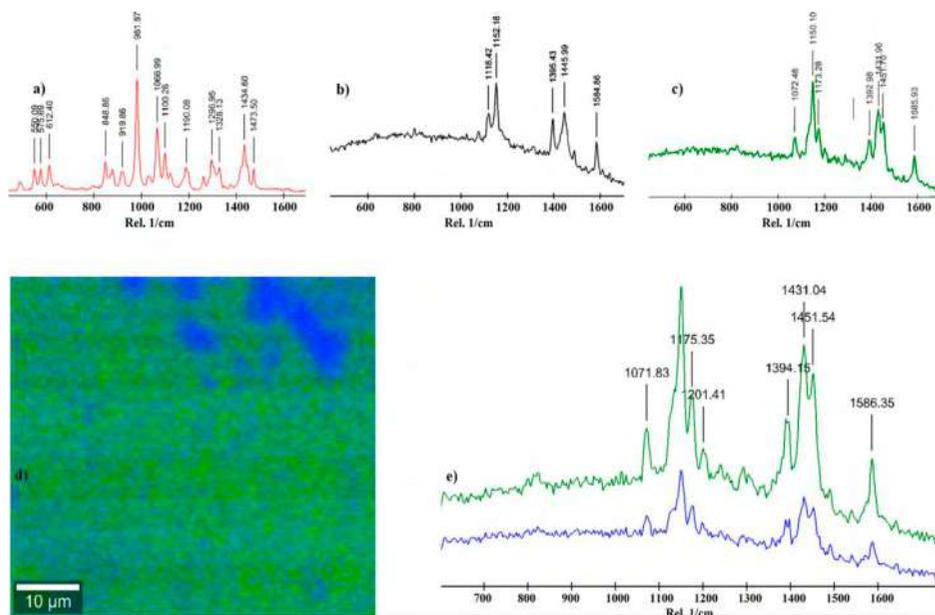


Figura 4. Espectros de microscopía Raman de: a) L-Arginina y b) Sulfasalazina y c) de la fase co-amorfa obtenida; abajo, d) imagen obtenida mapeo y e) espectros que corresponden a las zonas verde y azul de la imagen de mapeo.

En la imagen 4d se pueden observar dos colores, en donde el verde corresponde al espectro Raman del co-amorfo, mientras que las pequeñas regiones azules corresponden al mismo espectro obtenido de la zona verde y corresponden al espectro del co-amorfo de sulfasalazina:L-arginina, en donde la única diferencia entre ellos fue un nivel de ruido diferente atribuido al desenfoco del equipo, debido a la rugosidad propia de la pastilla.

El análisis térmico del co-amorfo de Sulfasalazina:L-Arginina incluyó estudios de calorimetría de barrido diferencial (DSC) y el análisis termogravimétrico (TGA). El termograma de DSC (figura 5a) se observa una discontinuidad de la línea base a 79.67 °C asignada a una transición vítrea, posteriormente a 223.7 °C se observa un evento exotérmico debido a la posible cristalización del sólido seguido de la fusión/descomposición a aproximadamente 280°C. Por otro lado, en el TGA (figura 5b) se observa a aproximadamente 70°C, una pérdida de masa del 5.53% del peso; además se observa otra pérdida del 15.89% del peso a aproximadamente a 160°C y finalmente, arriba de 200°C, se observa una pérdida de 48.21% peso.

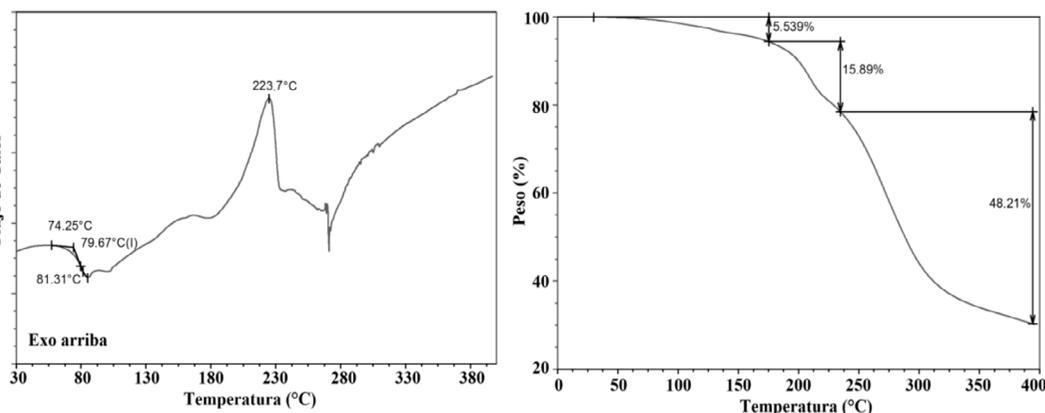


Figura 5. Termogramas de calorimetría de barrido diferencia DSC (a) y el análisis termogravimétrico TGA (b) de la nueva forma sólida 1:1 Sulfasalazina:L-Arginina.

Por otro lado, la figura 6a, muestra los difractogramas obtenidos a partir de las pruebas de estabilidad indicativa, en donde se observa la comparación del difractograma de polvos inicial del co-amorfo y los difractogramas obtenidos después de haber sometido al co-amorfo a las condiciones ahí indicadas durante un mes. De igual manera, la figura 6b, muestra la comparación del difractograma inicial del co-amorfo y los difractogramas obtenidos después de haber sometido al co-amorfo a los medios fisiológicos ahí indicados, durante 24 hrs.

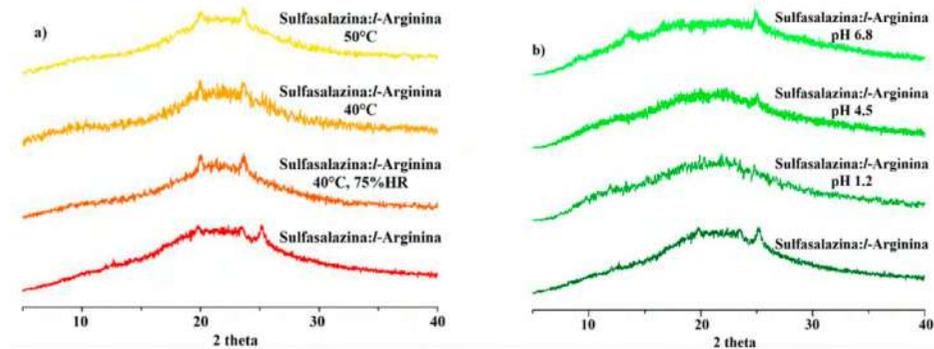


Figura 6. Difractogramas de rayos X de polvos de a) prueba de estabilidad indicativa del co-amorfo bajo diferentes condiciones de temperatura y HR y b) Prueba de estabilidad del co-amorfo a diferentes sometido 24h a diferentes medios fisiológicos al pH indicado.

Finalmente, el estudio de velocidad de disolución del co-amorfo de sulfasalazina:L-arginina (círculos rojos) en buffer de fosfato a pH de 6.8 y su comparación con la velocidad de disolución de la Sulfasalazina pura (cuadros naranja) se presenta en la figura 7; en donde, en el eje X se muestra el tiempo de monitoreo en minutos y en el eje Y la concentración en mgcm^{-2} de sulfasalazina y en el que se puede observar un incremento considerable de la velocidad de disolución con constantes de 3.9 y de 1.2 mgcm^{-2} para el co-amorfo de sulfasalazina:L-arginina y para sulfasalazina respectivamente. Además, se observa que la concentración en el último minuto de estudio (minuto 30) es aproximadamente tres veces mayor en co-amorfo con respecto a la Sulfasalazina pura.

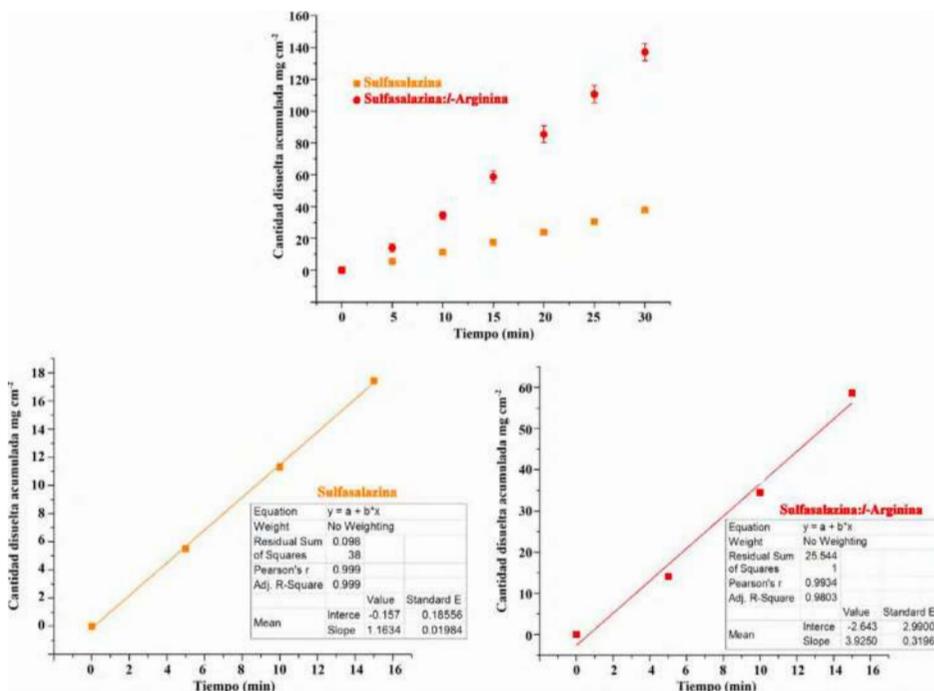


Figura 7. Gráfico de Arriba, velocidad de disolución a pH 6.8 a 37°C y 50 rpm. Gráficos de abajo, cálculos de la constante de disolución de Sulfasalazina y el co-amorfo sulfasalazina L-Arginina.

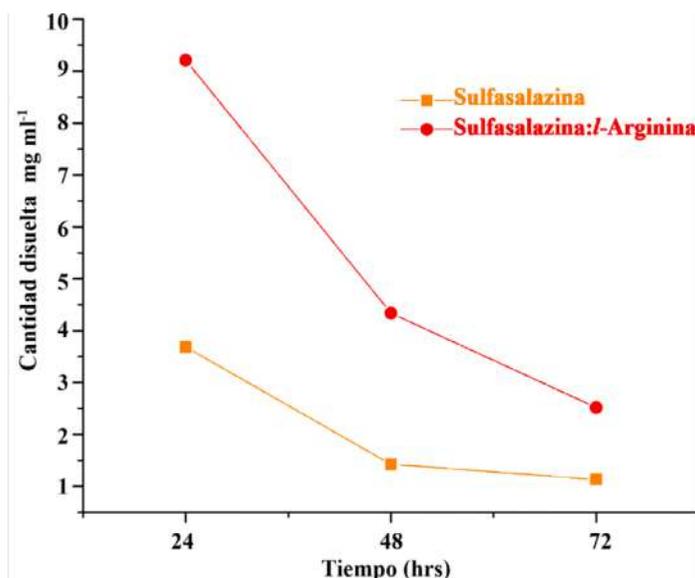


Figura 8.
Pruebas de solubilidad

En el mismo sentido, se realizaron pruebas de solubilidad para el co-amorfo (círculo rojo) y de sulfasalazina (cuadro naranja) y cuyos resultados se ilustran en la figura 8, en donde en el eje X se muestra el tiempo en horas y en el eje Y los mg mL^{-1} disueltos. Del análisis se observa un incremento considerable de la solubilidad de la fase co-amorfa con respecto a la Sulfasalazina libre en los tres tiempos monitoreados (24, 48 y 72 hrs). Este incremento, es similar al observado en la velocidad de disolución que es de aproximadamente tres veces más al fármaco libre.

DISCUSIÓN

La difracción de Rayos X de polvos (DRXP) es una técnica poderosa para la determinación del orden o desorden molecular en un sólido.¹³ Los patrones de difracción observados para sistemas cristalinos, muestran patrones de difracción con picos bien definidos, mientras que en sólidos amorfos en donde hay un bajo orden a largo alcance, los patrones de difracción son observados como una dispersión difusa con ausencia de reflexiones de Bragg, que comúnmente es referido como la aparición de un “halo” llamado residuo cristalino.¹⁴

Los sólidos resultantes de la reacción de slurry y la reacción en molienda de sulfasalazina:L-arginina 1:1 y las materias primas se analizaron por DRXP para determinar la naturaleza cristalina o amorfa del sólido como resultado de la interacción entre la sulfasalazina y las materias primas. En los difractogramas correspondientes a las materias primas (sulfasalazina y L-arginina) se observó un patrón de picos de difracción bien definidos que indican que las materias primas son cristalinas. Por el contrario, la ausencia de picos de difracción y la formación de un “halo” difuso en los difractogramas de slurry y molienda confirma la obtención de un sólido amorfo de sulfasalazina:L-arginina, es decir, la presencia del coformador en la mezcla sometida a slurry o molienda induce la completa amorfización de la sulfasalazina.

Si bien la difracción de rayos X de polvos es una técnica fundamental para determinar la cristalinidad o amorficidad de un sólido, no proporciona evidencia directa de las interacciones intermoleculares entre la sulfasalazina y la L-arginina. Para este propósito, se empleó la espectroscopía infrarroja, una técnica de caracterización altamente sensible a cambios estructurales

y conformacionales en los compuestos. En el caso de los co-amorfos, esta metodología ofrece información valiosa sobre las interacciones intermoleculares en el estado sólido,¹⁵ mediante el análisis de los desplazamientos en las bandas vibracionales asignadas a los grupos funcionales de la sulfasalazina y la L-arginina, que pueden participar en dichas interacciones.

Derivado de los espectros de infrarrojo se observa un ensanchamiento y pérdida en la definición de las bandas vibracionales en el espectro de IR del amorfo de sulfasalazina:L-arginina con respecto a las materias primas, esto es atribuido al inherente elevado grado de desorden molecular asociado a los sólidos amorfos,¹⁶ que es consistente con lo observado por DRXP. Además, el espectro de IR del amorfo de sulfasalazina:L-arginina, mostró un patrón de bandas vibracionales muy similar al de las materias primas, detectando desplazamientos significativos, en particular, las bandas asignadas a los estiramientos de los enlaces O-H y N-H en la sulfasalazina que exhibieron desplazamientos de $\Delta\nu=97\text{ cm}^{-1}$ y $\Delta\nu=15\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. De manera análoga, en L-arginina se registraron desplazamientos de $\Delta\nu=19\text{ cm}^{-1}$ y $\Delta\nu=30\text{ cm}^{-1}$ para las bandas asignadas al estiramiento y la flexión del enlace N-H de los grupos amino y guanidina, respectivamente. Estos desplazamientos sugieren la presencia de interacciones intermoleculares fuertes en el complejo amorfo, en la sulfasalazina, dichas interacciones involucran principalmente el grupo amina de la sulfonamida y el hidroxilo fenólico, mientras que en la L-arginina, los grupos funcionales responsables de estas interacciones son la guanidina y la amina.

Por otro lado, las bandas vibracionales correspondientes a las vibraciones de los grupos carbonilo, sulfonilo y diazo en la sulfasalazina, así como del grupo ácido carboxílico en la L-arginina, presentaron desplazamientos mínimos ($\Delta\nu < 4\text{ cm}^{-1}$). Este comportamiento sugiere que estos grupos funcionales podrían estar involucrados en la formación de interacciones débiles dentro del amorfo. Es relevante destacar que, en la región espectral comprendida entre 1500 y 1590 cm^{-1} , no se detectaron nuevas bandas que pudieran atribuirse a las vibraciones C=O de carboxilatos aunado al pequeño desplazamiento observado ($\Delta\nu = 3\text{ cm}^{-1}$) para la banda vibracional correspondiente al enlace C=O del ácido carboxílico de la L-arginina sugiere que no hay una transferencia del protón ácido de la arginina a la sulfasalazina para formar una sal. Con base en estos resultados, se concluye la obtención de un co-amorfo de sulfasalazina: L-arginina.

Además de lo anterior se realizaron estudio de espectromicroscopia Raman que es una técnica poderosa para el estudio de la distribución espacial de mezclas físicas¹⁷ y la detección de fenómenos de separación de fase en sistemas co-amorfos.¹⁸ En una mezcla física de sulfasalazina y L-arginina, el mapeo Raman de la superficie de la pastilla contendría el espectro Raman de sulfasalazina y el de L-arginina. Sin embargo, la imagen obtenida del mapeo del co-amorfo sulfasalazina:L-arginina, muestra una amplia región en verde

que indica una alta homogeneidad de la muestra con pequeñas regiones en azul, sobre todo en la parte superior de la imagen. En donde de ambas regiones se determinó su espectro Raman (figura 4d) y se observó que los espectros eran los mismos, en donde la única diferencia entre ellos fue un nivel de ruido diferente atribuido al desenfoque del equipo, debido a la rugosidad propia de la pastilla; con base en esto, se concluyó que la nueva forma sólida amorfa es homogénea y no existen residuos de las materias primas.

Para concluir con la caracterización del co-amorfo de sulfasalacina:arginina, se llevó a cabo la caracterización térmica, conformada por estudios de calorimetría de barrido diferencial (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). Uno de los fenómenos característicos de los sistemas amorfos es la transición vítrea (T_g), la cual representa el punto en el que el sólido amorfo adquiere propiedades de un "semisólido" con comportamiento similar al de un líquido. Por debajo de esta temperatura, el material amorfo se considera estable, con una baja tendencia a la cristalización. En general, una T_g más alta se asocia con una menor tendencia a la cristalización y una mayor estabilidad del co-amorfo.¹⁹

El termograma de DSC del co-amorfo sulfasalazina:L-arginina mostró un primer evento térmico correspondiente a la transición vítrea, la cual se observó a una temperatura relativamente alta (79.67 °C). Este valor indica que el co-amorfo permanecerá estable mientras no se alcance dicha temperatura. Además, la presencia de una única temperatura de transición vítrea (T_g) sugiere la formación de un sistema co-amorfo homogéneo,²⁰ en lugar de una mezcla física, lo que concuerda con los resultados obtenidos mediante espectroscopía Raman. Durante el evento de transición vítrea (T_g), el termograma de TGA registró una pérdida de peso del 5.53%, atribuida a la deshidratación de dos moléculas de agua. Este resultado sugiere que la fase analizada corresponde a un hidrato con una estequiometría 1:1:2 de sulfasalazina:L-arginina:agua.

Durante el evento de T_g el termograma de TGA, mostró una pérdida de peso del 5.53% que corresponde a la pérdida de dos moléculas de agua, este resultado sugiere que el co-amorfo analizado corresponde a un hidrato con estequiometría 1:1:2 de sulfasalazina:L-arginina:agua. Posterior a la deshidratación y la transición vítrea (T_g), el aumento en la movilidad molecular del co-amorfo conlleva un evento exotérmico a 223 °C, asociado con la cristalización de uno de los componentes de la mezcla sulfasalazina:L-arginina. De manera simultánea, el análisis termogravimétrico (TGA) indica que a esta temperatura se inicia una pérdida de masa del 15.89%, atribuida a la descarboxilación de la sulfasalazina y la L-arginina, para después descomponerse térmicamente los compuestos a 238°C.

En un sólido amorfo, de naturaleza metaestable, con el tiempo existe una tendencia a acercarse espontáneamente a su estructura de equilibrio por medio de un fenómeno denominado relajación estructural que es promovida por la movilidad molecular (movimientos vibratorios, rotacionales y traslacionales). A partir de los estudios de estabilidad indicativa bajo condiciones de calor seco a 40 °C y 50 °C así como 40 °C con 75% de HR, mostraron que el co-amorfo permaneció estable hasta por un mes bajo estas condiciones de calor y humedad, esto confirma que, a temperaturas por debajo a la Tg observada en el DSC, el co-amorfo permanecerá estable, además se puede concluir que las interacciones intermoleculares que establece sulfasalazina con la L-arginina pudieran estar restringiendo la movilidad molecular en el amorfo, lo que inhibe la tendencia a la separación del co-amorfo y su cristalización.²¹ A partir de los estudios de estabilidad del co-amorfo en contacto con medios fisiológicos, se observó una buena estabilidad del co-amorfo en todos los pH's utilizados, esto fue atribuido a que las interacciones intermoleculares formadas entre la sulfasalazina y la L-arginina, permanecen son tan fuertes que permanecen aún en presencia del medio fisiológico, esto resulta interesante, ya que una vez solubilizado el co-amorfo en el medio de disolución, si la interacción sulfasalazina:L-arginina permanece, se evitaría la precipitación de la sulfasalazina en el medio fisiológico, permitiendo que permanezca más tiempo solubilizado y disponible para su absorción por el organismo.

Debido a la baja eficiencia en el empaquetamiento de las moléculas en el sólido y al bajo orden molecular a largo alcance, los sólidos amorfos poseen una alta movilidad molecular y una alta energía potencial con respecto a la forma cristalina, y constituyen dos de sus más importantes propiedades de los sólidos amorfos que impactan directamente en las propiedades químicas y físicas en los fármacos, entre ellos la solubilidad y la velocidad de disolución de

estos.²² Como era de esperarse, se observó un incremento significativo tanto en la solubilidad como en la velocidad de disolución del co-amorfo de sulfasalazina en comparación con la forma cristalina del fármaco, lo cual evidencia que los sistemas amorfos presentan una mayor solubilidad relativa frente a sus contrapartes cristalinas.

El perfil de disolución de un co-cristal o co-amorfo generalmente se caracteriza por dos fenómenos: inicialmente, se presenta un "efecto resorte", caracterizado por un aumento rápido y considerable en la concentración del fármaco disuelto; este es seguido por un "efecto paracaídas", en el que la concentración disminuye progresivamente debido a la disociación de las interacciones fármaco:coformador.²³ Sin embargo, en muchos casos, estos efectos son transitorios y ocurren en los primeros minutos u horas tras la disolución, lo que impide mantener un estado de sobresaturación adecuado para una óptima absorción del principio activo. Un hallazgo relevante en este estudio es que, en el caso del co-amorfo sulfasalazina:L-arginina, el "efecto paracaídas" se prolonga hasta 24 horas después del inicio del experimento, decayendo gradualmente hasta las 72 horas. Este comportamiento respalda los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad en medios fisiológicos, donde se observó que la interacción entre sulfasalazina y L-arginina se mantiene en disolución, retardando la precipitación del fármaco y favoreciendo su permanencia en un estado sobresaturado durante un periodo prolongado.

CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvo un nuevo co-amorfo estable de sulfasalazina:L-arginina:agua en estequiometría 1:1:2. Esta fase se caracterizó completamente por las técnicas de difracción y espectroscópicas correspondientes para este tipo de sistemas y que indican que se trata de una fase sólida multicomponente amorfa con estequiome-

tria Sulfasalazina:L-Arginina:agua 1:1:2. Esta fase permanece estable bajo condiciones de temperatura de hasta 50°C sin humedad y de hasta 40°C con 75% de HR y, en disoluciones de buffers de pH 1.2, 4.5 y 6.8. Además, este co-amorfo mostró un incremento en la solubilidad y en la velocidad de disolución de aproximadamente tres veces con respecto al fármaco libre. De los resultados es evidente las potenciales aplicaciones de este tipo de estudios para la generación de nuevas fases solidas estables, **más solubles** y con una velocidad de disolución mayor, lo que puede traer como consecuencia una biodisponibilidad mayor, un requerimiento menor de dosis, una disminución de efectos colaterales y una mejora en la relación costo beneficio, todo esto sin alterar la estructura química del fármaco y por ende su efecto terapéutico.

Reconocimientos

A los Laboratorios Senosiain S.A. de C.V. por el apoyo otorgado para realizar estos estudios.

REFERENCIAS

1. Byrn SR et al. Solid-State Properties of Pharmaceutical Materials, 1st edn. New Delhi: John Wiley & Sons, 2017. b) Hilfiker R, Blatter F. Relevance of Solid-state Properties for Pharmaceutical Products, Chap 1. In Hilfiker R, ed. Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry. Weinheim: Wiley-VCH GmbH & Co, 2006:1-19.
2. Aaltonen J, Rades T. Towards Physico-Relevant Dissolution Testing: The Importance of Solid-State Analysis in Dissolution. Dissol Tech 2009; 16: 47-54.
3. Hancock B C, Zografi G J. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. Pharm. Sci. 1997, 86(1), 1-12.
4. Yu L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. Adv. Drug Delivery Rev. 2001; 48(1): 27-42.
5. Löbmann K, Laitinen R, Grohganz H, Gordon K C, Strachan C, Rades T. Coamorphous Drug Systems: Enhanced Physical Stability and Dissolution Rate of Indomethacin and Naproxen. Mol. Pharmaceutics. 2011; 8(5): 1919-1928.
6. Laitinena R, Löbmann K, Strachana C J, Grohganzb H, Rades T. Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs. Int. J. Pharm. 2013; 453(1): 65-79.

7. Dengele S J, Grohgan H, Rades T, Löbmann K. Recent Advances in Co-amorphous Drug Formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016; 100: 116-125.
8. Choi J, Patel P, Fenando A. Sulfasalazine. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557809/>
9. The United States Pharmacopeia. National Formulary 36. Vol. 1. Rockville (MD: United State Pharmacopeial Convention; 2018. Test Solutions; p. 5676.
10. Wood J H, Syarto J E, Letterman H. Improved Holder for Intrinsic Dissolution Rate Studies. *J. Pharm. Sci.* 1965; 54(7): 1068-1068.
11. Safa A N, Sheibani A, Baei M T, Sayyed-Alangi S Z, Tazikeh Lemeski E. Theoretical and experimental studies on sulfasalazine interactions with poly (lactic acid): Impact of hydrogen bonding and charge transfer interactions on molecular structure, electronic and optical properties. *Heliyon.* 2023 16; 10(1): e23813.
12. Roda A, Santos F, Chua Y Z, Kumar A, Do H T, Paiva A, Duarte A R C, Held C. Unravelling the nature of citric acid:l-arginine:water mixtures: the bifunctional role of water. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2021; 23: 1706-1717.
13. Bunaciu A A, Udriştioiu E G, Aboul-Enein H Y. X-Ray diffraction: Instrumentation and Applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2015; 45: 289-299.
14. Thakral S, Terban M W, Thakral N K, Suryanarayanan R. Recent advances in the characterization of amorphous pharmaceuticals by X-ray diffractometry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016; 100: 183-193.
15. Kaushal A M, Chakraborti A K, Bansal K. FTIR Studies on Differential Intermolecular Association in Crystalline and Amorphous States of Structurally Related Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Mol. Pharmaceutics.* 2008; 5(6): 937-945.
16. Han Y, Pan Y, Lv J, Guo W, Wang J. Powder Grinding preparation of co-amorphous β -azelnidipine and maleic acid combination: Molecular interactions and physicochemical properties. *Powder Technol.* 2016; 291: 110-120.
17. Widjaja E, Sampanthar J T, Ding Han X, Goh E. Use of Raman microscopy and band-target entropy minimization technique to differentiate physical mixture from chemical mixture in mixed metal oxides. *Catal. Today.* 2008; 131(1-4):21-27.

18. Kilpeläinen T, Pajula K, Ervasti T, Uurasjärvi E, Koistinen A, Korhonen O. Raman imaging of amorphous-amorphous phase separation in small molecule co-amorphous systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2020; 155:49-54
19. Suresh K, Chaitanya Mannava M K, Nangia, A. A novel curcumin–artemisinin coamorphous solid: physical properties and pharmacokinetic profile. *RSC Adv.* 2014; 4: 58357-58361.
20. Chiou W L, Riegelman S. A Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *J. Pharm. Sci.* 1971; 60(9): 1281–1302.
21. a) Kaushal A M, Chakraborti A K, Bansal A K. FTIR Studies on Differential Intermolecular Association in Crystalline and Amorphous States of Structurally Related Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Mol. Pharmaceutics.* 2008; 5(6): 937-945. b) Kaushal A M; Bansal A K. Thermodynamic behavior of glassy state of structurally related compounds. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008, 69,1067-1076.
22. Babu N J, Nangia, A. Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals. *Cryst. Growth Des.* 2011; 11(7): 2662-2679.
23. Bavishi D D, Borkhataria C H. Spring and parachute: How cocrystals enhance solubility. 2016; 62(3): 1-8. b) Fujita.

Detección de marcadores tumorales por biosensores colorimétricos basados en nanotriángulos de Plata

Detection of tumor markers by colorimetric biosensors based on silver nanotriangles

Daniela González Zarate¹, José Luis Zamora Navarro², Irma Yadira Izaguirre Hernández³, Pablo Thomas Dupont⁴, José María Remes Troche⁵, Luis Zamora Peredo^{6*}

Resumen

<https://doi.org/10.25009/rmuv.2025.1.132>

Introducción. Los nanotriángulos de plata (Ag NTs) tienen la característica de ser coloidales, lo que significa que pueden ser dispersos homogéneamente en una solución líquida. Además, otorgan a la solución coloidal una coloración azul que puede cambiar debido a modificaciones en su morfología o estado de agregación. En los biosensores colorimétricos basados en Ag NTs se debe cuantificar ese cambio de coloración y relacionarlo con el cambio de concentración de la biomolécula objetivo. **Objetivo:** Diseñar un inmunoensayo colorimétrico, utilizando Ag NTs, para detectar un marcador tumoral. **Metodología:** Mediante el método de reducción química se sintetizaron Ag NTs y mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) se estudió la dispersión de sus tamaños nanométricos. Mediante absorbancia UV-Vis se evaluó su estabilidad química por un periodo de tiempo de 40 días, en el cual su coloración azul se mantuvo estable. Finalmente, se evaluó el comportamiento colorimétrico de la solución coloidal cuando se enlazan diferentes proteínas a la superficie de las Ag NTs. **Resultados:** Se sintetizaron Ag NTs con un tamaño promedio de 70 nm con excelente estabilidad química mayor a 40 días. Los estudios de absorbancia demuestran que es posible identificar si el cambio en la coloración de la solución coloidal se debe a un cambio en la morfología de la nanopartícula o por aglomeración de estas. Además, es posible identificar cambios en la absorbancia óptica cuando la Ag NTs se enlazan con proteínas, como los marcadores tumorales. **Conclusión:** Es posible realizar inmunoensayos utilizando soluciones coloidales con Ag NTs para generar cambios en su colorimetría que sean proporcionales a la concentración de marcadores tumorales.

Recibido: 18/03/25

Aprobado: 06/05/25

¹ Maestría, Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico.

² Maestría, Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico.

³ Doctorado, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico.

⁴ Doctorado, Instituto de Investigaciones Médico-Biológicas, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico.

⁵ Doctorado, Instituto de Investigaciones Médico-Biológicas, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico.

^{6*} Doctorado, Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico. luiszamora@uv.mx

Palabras clave: Nanotriángulos de plata, sensores colorimétricos, absorbancia UV-Vis, marcadores tumorales.

Abstract

Introduction: Silver nanotriangles (Ag NTs) have the characteristic of being colloidal, which means that they can be homogeneously dispersed in a liquid solution. In addition, they give the colloidal solution a blue color that can change due to modifications in its morphology or state of aggregation. In colorimetric biosensors based on Ag NTs, this color change must be quantified and related to the change in concentration of the target biomolecule. **Objective:** To design an Ag NTs-based colorimetric immunoassay to detect a tumor marker. **Methodology:** Ag NTs were synthesized by the chemical reduction method and the dispersion of their nanometric sizes was studied by means of Dynamic Light Scattering (DLS) and Transmission Electron Microscopy (TEM). Their chemical stability was evaluated by means of UV-Vis absorbance for a period of 40 days, during which their blue color remained stable. Finally, the colorimetric behavior of the colloidal solution was evaluated when different proteins are bound to the surface of the Ag NTs. **Results:** Ag NTs with average size of 70 nm were synthesized with excellent chemical stability over 40 days. Absorbance studies demonstrate that it is possible to identify whether the change in the color of the colloidal solution is due to a change in the morphology of the nanoparticle or due to agglomeration of these. Furthermore, it is possible to identify changes in optical absorbance when Ag NTs bind to proteins, such as tumor markers. **Conclusion:** It is possible to perform immunoassays using Ag NTs colloidal solutions to generate changes in their colorimetry that are proportional to the concentration of tumor markers.

Keywords: Silver nanotriangles, colorimetric sensors, UV-Vis absorbance, tumor markers.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, cuando una mujer sospecha que está embarazada, la primera idea que viene a su mente es realizar una prueba rápida de embarazo. La prueba rápida de embarazo es un ejemplo de un biosensor colorimétrico que rápidamente, sin gastar mucho, con una confiabilidad alta y a simple vista puede determinar si está embarazada o no. Este dispositivo en realidad tiene la capacidad de mostrar una coloración cuya intensidad es proporcional a la concentración de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) que existe en su sangre y orina [1]. Otro ejemplo de un biosensor colorimétrico es la prueba de anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2, que la pandemia de COVID-19 nos obligó a conocer, en la cual se deposita una gota de sangre y la coloración de las líneas nos permite determinar si contamos con anticuerpos IgG y/o IgM [2]. En general, los biosensores colorimétricos pueden ser utilizados para detectar bacterias, micotoxinas, metales pesados, antibióticos, pesticidas, patógenos transmitidos por alimentos, alérgenos, toxinas marinas [3, 4]. Estos dispositivos colorimétricos representan el biosensor ideal, debido a que son de bajo costo, son rápidos, no necesita la interpretación de un especialista, no son invasivos y a simple vista podemos conocer el resultado positivo o negativo del diagnóstico. Sin embargo, el principal reto que tienen este tipo de biosensores es su nivel de sensibilidad y especificidad, razón por la cual muchas investigaciones científicas aún siguen enfocadas en desarrollar nuevas metodologías y nuevos materiales para su optimización.

La detección de marcadores tumorales asociados a diferentes tipos de cáncer también ha utilizado biosensores colorimétricos. Marcadores como la alfa proteína (AFP), el antígeno carcino embrionario (CEA), el antígeno específico de próstata (PSA) y otros antígenos como CA125 y CA15-3 pueden ser detectados y cuan-

tificados por un inmunoensayo ampliamente utilizado como ELISA (del inglés: enzyme-linked immunosorbent assay), en donde se utiliza una enzima para generar la coloración mediante una reacción catalítica y con estudios de absorbancia óptica se puede cuantificar la concentración de anticuerpos o antígenos existentes en muestras de suero sanguíneo [5].

Por su parte, la nanotecnología ha impulsado el desarrollo de los biosensores colorimétricos ya que las metodologías más actuales utilizan nanopartículas metálicas y en comparación con los ensayos colorimétricos tradicionales, el análisis colorimétrico basado en nanopartículas no requiere enzimas como catalizadores. En este caso, el color se genera por el cambio en la absorbancia debido de las nanopartículas metálicas [3]. Las nanopartículas esféricas de oro y plata son las más utilizadas para el diseño de biosensores colorimétricos y generalmente se realizan mediciones de absorbancia para optimizar las curvas de calibración que permiten determinar concentraciones desconocidas de biomoléculas en muestras de suero sanguíneo [5, 6]. Los fenómenos más aprovechados por los inmunoensayos colorimétricos son: el cambio de color debido al cambio de geometría de las nanopartículas, distancia entre las nanopartículas y por aglomeran y precipitan [3, 6]. Por lo anterior, es necesario controlar la síntesis química de las nanopartículas para conocer muy bien el comportamiento de su espectro de absorción óptica en el tiempo y en diferentes soluciones donde estas nanoestructuras estarán disueltas.

En este trabajo presentamos la síntesis de nanopartículas de plata con morfología esférica (NPs) y triangular (Ag NTs) con el objetivo de diseñar un inmunoensayo colorimétrico, utilizando Ag NTs, para detectar un marcador tumoral. Analizamos los espectros de absorbancia UV-Vis de ambas nanoestructuras, donde comprobaremos el cambio de coloración de la solución coloi-

dal originado por el cambio en la geometría de la nanopartícula. Además, evaluamos la estabilidad temporal de Ag NTs durante más de 40 días e identificamos las señales características del espectro de absorbancia cuando las Ag NTs son enlazadas a proteínas como la albumina de suero bovino (BSA) y anticuerpos contra el antígeno carbohidratado 19-9 (Ab CA19-9), marcador tumoral asociado al cáncer pancreático.

METODOLOGÍA

La síntesis de las nanopartículas de plata se realizó mediante el método de reducción química de nitrato de plata (AgNO_3) mediante borohidruro de sodio (NaBH_4) a una temperatura de $105\text{ }^\circ\text{C}$ y agitación constante a 600 rpm, donde también se debe incluir citrato de sodio y PVP, los cuales permiten que bajo concentraciones específicas se pueda dar forma triangular y plana a las nanoestructuras. Los detalles de las concentraciones y condiciones de síntesis pueden ser consultados en nuestros reportes previos [7].

Para enlazar las proteínas con las Ag NPs se debe funcionalizar la superficie de las nanoestructuras con una delgada capa de 3-ácido mercatopropiónico (3-MPA), lo cual evita que la plata interaccione eléctricamente con las proteínas y modifique su estructura. Posteriormente, se utilizó 125 μL de BSA a una concentración de 1 mg/mL con un tiempo de incubación de 1hr. Para la bioconjugación con el Ab CA 19-9 se utilizaron 25 μL con concentraciones de 5 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó durante 2 horas.

Para el estudio de absorbancia se utilizó un espectrómetro de la marca Thermo Scientific, modelo Genesys 50, con la capacidad de explorar la región ultravioleta y visible de 200 a 1100 nm con una resolución espectral de 2 nm. El estudio de microscopía electrónica de transmisión se realizó con el equipo marca JEOL modelo JEM2010 FEG en una celda de cobre recubierta con carbono con rejillas delgadas del mismo material.

RESULTADOS

La figura 1 muestra la fotografía de las soluciones coloidales con nanotriángulos de plata sintetizados con diferentes concentraciones 1.2, 0.9, 0.6 y 0.3 mL de borohidruro de sodio, A, B, C y D respectivamente. Claramente se observa como la coloración de la solución cambia de amarillo a azul conforme la concentración de borohidruro disminuye, algo que es originado por el cambio en la forma de las nanopartículas de plata, es bien conocido que cuando las nanopartículas son esféricas el color es amarillo y cuando son triangulares es azul [8]. La figura 2 muestra las imágenes obtenidas por TEM donde se observa claramente que las nanopartículas de la solución amarilla (A) tienen morfología esférica y en la solución azul (D) tienen nanotriángulos. Además, se puede observar que dichas nanopartículas tienen dimensiones entre 60 y 70 nm. Por otra parte, la figura 3 muestra los espectros de absorbancia de las soluciones mostradas en la figura 1, claramente se observa que la solución A (amarilla) tiene solo un pico de absorbancia alrededor de 400 nm, mientras que la solución B (línea verde) tiene dos picos adicionales, un pico de poca intensidad en 330 nm y un pico muy ensanchado en 850 nm. En la solución C el pico en 400 nm tiene muy poca intensidad y cuando la concentración de NaBH₄ es de 0.3 mL (solución D) dicho pico desaparece. Está bien establecido que la absorbancia en 400 nm es originada por las partículas esféricas y los otros dos picos de absorción son generados por las partículas triangulares [8], lo que significa que podemos asegurar que en la solución azul solo tenemos nanotriángulos de plata.

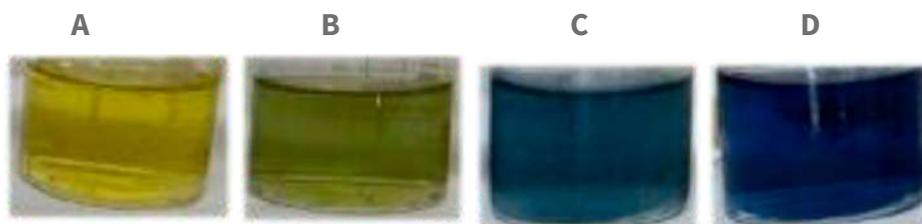


Figura 1. Imágenes de soluciones coloidales que contienen nanopartículas de plata sintetizadas con 1.2 (A), 0.9 (B), 0.6 (C) y 0.3 mL (D) de NaBH₄.

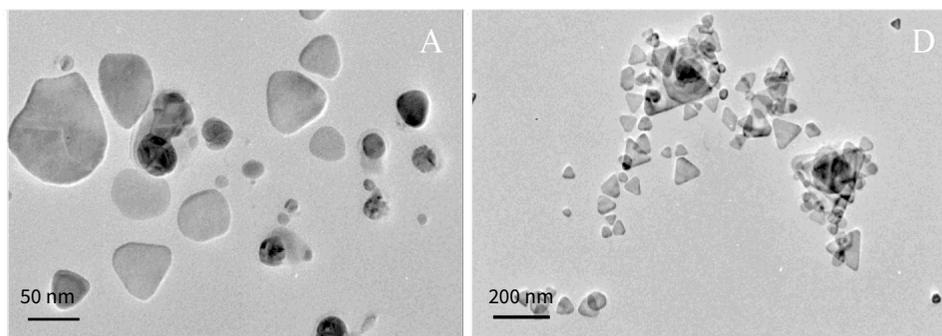


Figura 2. Imágenes TEM de nanopartículas de plata de forma esférica (solución A) y triangular (solución D).

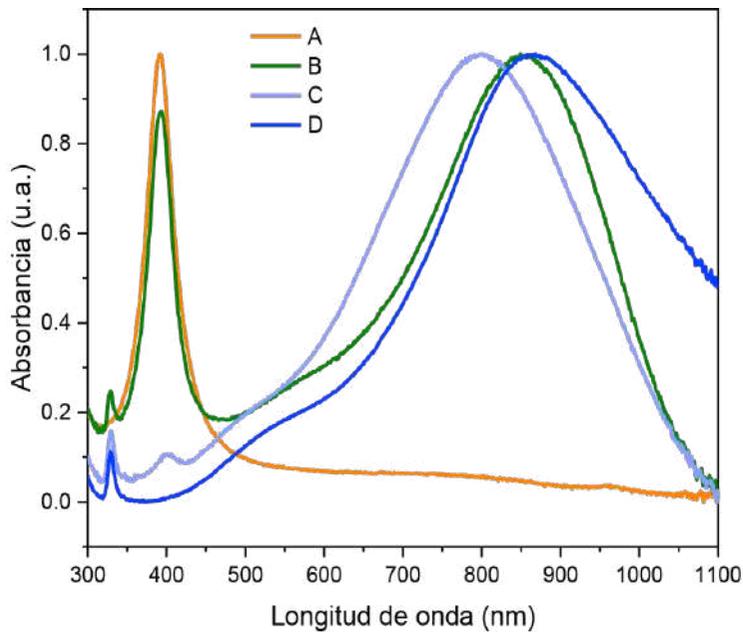


Figura 3. Espectros de absorción de soluciones coloidales que contienen nanopartículas de plata sintetizadas con 1.2 (A), 0.9 (B), 0.6 (C) y 0.3 mL (D) de NaBH₄.

La figura 4 muestra los espectros de absorción de soluciones de BSA en PBS, a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de una solución de anticuerpos CA19-9 con una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en la cual solo se observa un pico de absorción en 277 nm para el BSA y en 267 nm para el Ab CA19-9. Estas dos bandas de absorción son una excelente guía para identificar cuando se enlazan estas dos proteínas a la superficie de las Ag NTs, como se muestra en la figura 5, donde se puede observar que cuando se tienen el sistema “Ag NTs + proteína” aparece un nuevo pico de absorción en longitudes menores a 300 nm (línea verde y naranja) en comparación a cuando solo existen Ag NTs (línea azul).

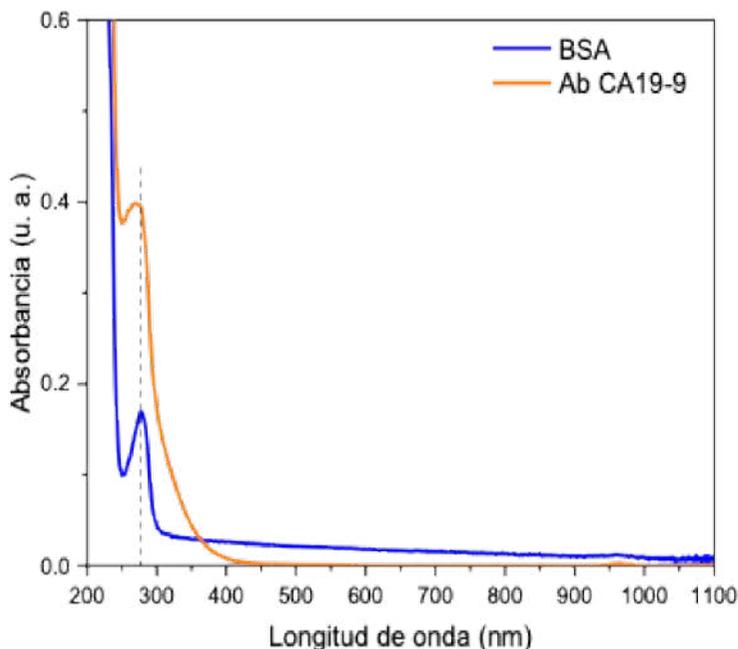


Figura 4. Espectros de absorción de soluciones con BSA y Ab CA19-9.

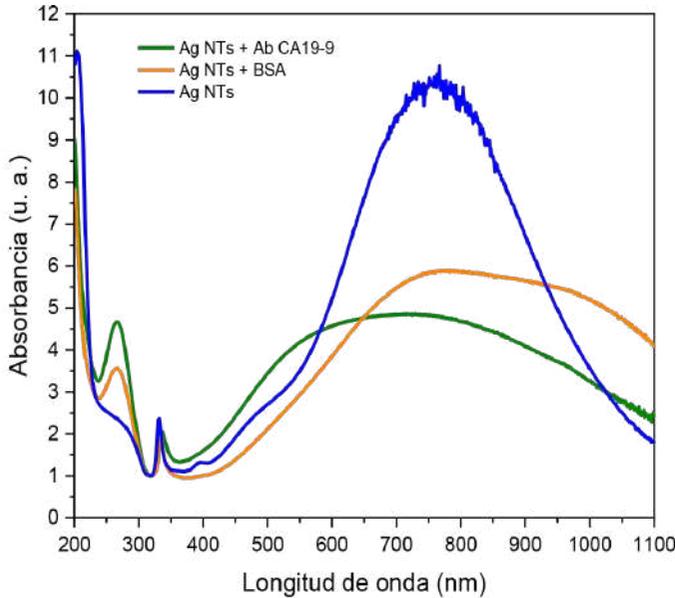


Figura 5. Espectros de absorción de soluciones de Ag NTs, Ag NTs con BSA y Ag NTs con Ab CA19-9.

Finalmente, la figura 6 presenta los espectros de absorción obtenidos de soluciones coloidales donde diferentes concentraciones de Ab CA19-9 se han incubado con una solución de Ag NTs, se observa claramente que el pico de absorción en 267 nm generado por los anticuerpos tiene un aumento en su intensidad originado por el incremento de su concentración en la solución. Además, en la figura 7 se muestran las imágenes de las soluciones coloidales antes y después de agregar un volumen constante de antígenos CA19-9 a cada solución, se puede observar que la solución cambia su coloración en función de la concentración de anticuerpos, lo que sugiere que los antígenos se enlazan a los anticuerpos previamente enlazados a las Ag NTs, generando aglomeración de todo el sistema “nanotriángulos – anticuerpos – antígenos” y su posterior precipitación.

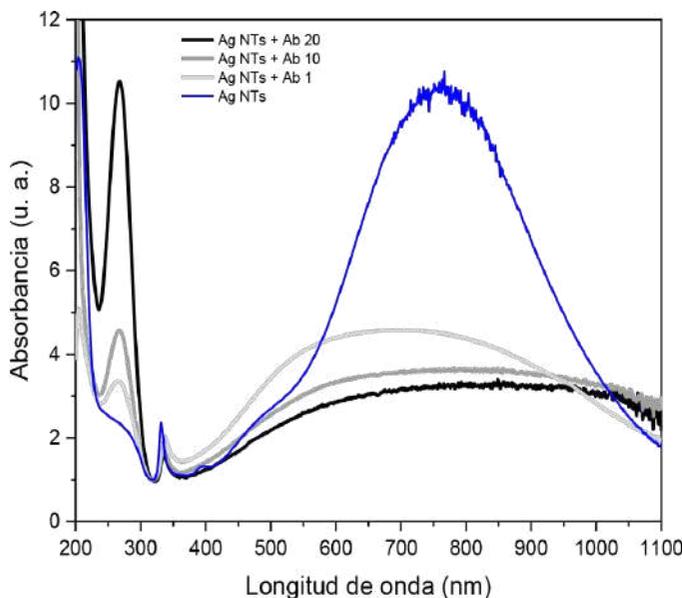


Figura 6. Absorbancia de soluciones con Ag NTs antes y después de incubar Ab CA19-9 con concentraciones de 1, 10 y 20 µg/mL.

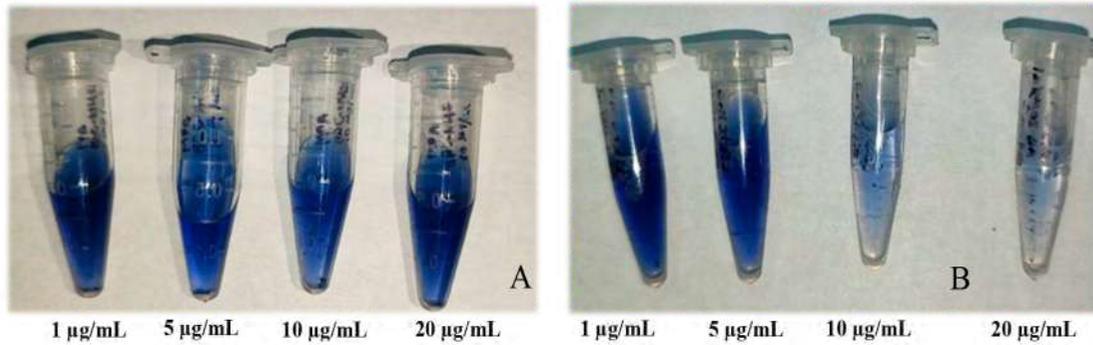


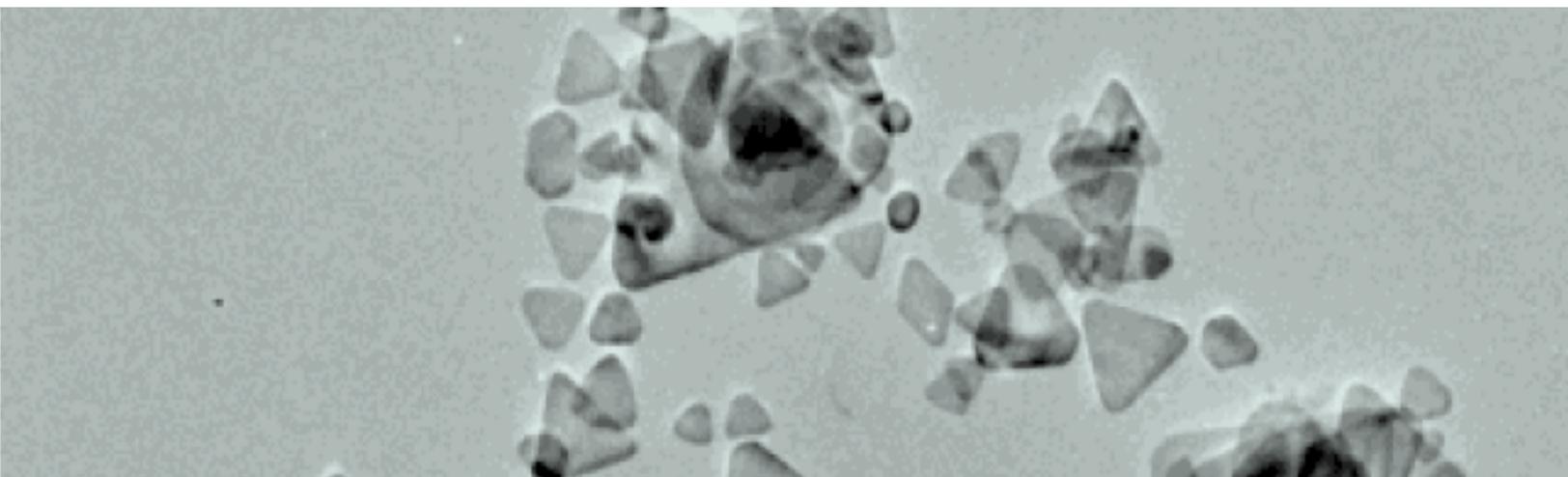
Figura 7. Soluciones de Ag NTs bionjugadas con diferentes concentración de Ab CA19-9 antes (A) y después (B) de agregar el mismo volumen de antígenos CA19-9 a cada vial.

CONCLUSIONES

En esta investigación se evaluó el comportamiento colorimétrico de soluciones coloidales de nanotriángulos de plata originado por cambios en su geometría y su biocojugación con proteínas como la albumina de suero bovino y los anticuerpos contra antígenos CA19-9, asociados al cáncer pancreático. Se demostró que mediante el análisis de la absorbancia óptica es posible diseñar un bioensayo que es capaz de detectar diferentes concentraciones de anticuerpos CA19-9. Esto establece las bases para diseñar un inmunoensayo que permita determinar diferentes concentraciones de marcadores tumorales asociados al cáncer.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo recibido por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (antes CONAHCYT) por el financiamiento recibido mediante el proyecto CF-2023-G-580.



BIBLIOGRAFÍA

1. R. M. Mohamed , S. M. El-Sheikh , M. W. Kadi , A. A. Labib and S. M. Sheta , A novel test device and quantitative colorimetric method for the detection of human chorionic gonadotropin (hCG) based on Au@Zn-salen MOF for POCT applications. *RSC Adv.* 2023, 13 , 11751 —11761. <https://doi.org/10.1039/D2RA07854F>
2. A. Sena-Torralba, R. Álvarez-Diduk, C. Parolo, A. Piper, and A. Merkoçi. Toward Next Generation Lateral Flow Assays: Integration of Nanomaterials. *Chemical Reviews* 2022 122 (18), 14881-14910. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01012>
3. J. Zhou, Y. Liu, X. Du, Y. Gui, J. He, F. Xie, and J. Cai. Recent Advances in Design and Application of Nanomaterials-Based Colorimetric Biosensors for Agri-food Safety Analysis, *ACS Omega* 2023, 8, 46346–46361. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c06409>
4. Li Feng, Mingcheng Zhang and Zhiyi Fan. Current trends in colorimetric biosensors using nanozymes for detecting biotoxins (bacterial food toxins, mycotoxins, and marine toxins). *Anal. Methods* 2024, 16, 6771–6792. <https://doi.org/10.1039/d4ay01184h>
5. Yin, Y., Cao, Y., Xu, Y., & Li, G. Colorimetric immunoassay for detection of tumor markers. *International Journal of Molecular Sciences* 2010, 11(12), 5077–5094. <https://doi.org/10.3390/ijms11125077>
6. E. Mauriz. Clinical Applications of Visual Plasmonic Colorimetric Sensing. *Sensors* 2020, 20(21), 6214. <https://doi.org/10.3390/s20216214>
7. D. González-Zárate, J. L. Zamora-Navarro, M. B. de la Mora, G. Santana-Rodríguez, M. Díaz-Solís, and L. Zamora-Peredo. Influence of Sodium Borohydride Content on Triangular Silver Nanoprisms Dropped on Copper Hydroxide Nanowire-Based SERS Substrates. *ACS Omega* 2024 9 (47). <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c06818>
8. M. Zannotti, V. Vicomandi, A. Rossi, M. Minicucci, S. Ferraro, L. Petetta, R. Giovannetti. Tuning of hydrogen peroxide etching during the synthesis of silver nanoparticles. An application of triangular nanoplates as plasmon sensors for Hg²⁺ in aqueous solution. *Journal of Molecular Liquids* 2020, 309, 113238. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113238>.

SERS y la Revolución en la Detección Temprana del Cáncer: Nuevas Tecnologías para Identificar Biomarcadores Clave en Tumores Digestivos

SERS and the revolution in Early Cancer Detection: New technologies to identify key biomarkers in digestive tumors

Marcos Luna-Cervantes¹, Luis Zamora-Peredo¹

Resumen

<https://doi.org/10.25009/rmu.2025.1.133>

El cáncer sigue representando uno de los mayores problemas y retos para la salud a nivel mundial, con los cánceres colorrectal, pancreático y hepático entre los más letales. La clave para poder hacerle frente está en la detección temprana, ya que cuando se logra identificar en fases iniciales, los tratamientos son más efectivos y ello puede incrementar la tasa de supervivencia. Un biomarcador es una molécula biológica cuya presencia o alteración en el organismo puede indicar la existencia de una enfermedad, como el cáncer. Sin embargo, los métodos tradicionales de diagnóstico, tales como imágenes médicas, análisis histopatológicos o inmunoensayos, no siempre son lo suficientemente precisos para detectar biomarcadores en bajas concentraciones, algo que es común en las primeras etapas de la enfermedad. Para superar esta limitación, la espectroscopía Raman mejorada por superficie (SERS) ha surgido como una técnica analítica de alta sensibilidad capaz de detectar moléculas en concentraciones extremadamente bajas mediante la amplificación de señales ópticas en presencia de superficies nanométricas. Este artículo tiene como propósito explicar y dar a conocer la aplicación de SERS en la detección de biomarcadores como el antígeno carbohidratado 19-9 (CA19-9), el antígeno carcinoembrionario (CEA) y la alfa-fetoproteína (AFP), una innovación que promete transformar la detección temprana del cáncer, permitiendo diagnósticos más rápidos y precisos que podrían salvar vidas y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Recibido: 18/03/25

Aprobado: 09/05/25

¹ Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología, Universidad Veracruzana (UV), Boca del Río, Veracruz, México.

Palabras clave: Cáncer, SERS, CA19-9, CEA, AFP

Abstract

Cancer remains one of the most significant global health challenges, with colorectal, pancreatic, and liver cancers among the most lethal. The key to addressing this issue is early detection, as identifying cancer in its initial stages allows for more effective treatments, potentially increasing survival rates. A biomarker is a biological molecule whose presence or alteration in the body can indicate the existence of a disease, such as cancer. However, traditional diagnostic methods, including medical imaging, histopathological analysis, and immunoassays, are not always sensitive enough to detect biomarkers at low concentrations, which is common in the early stages of the disease. To overcome this limitation, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) has emerged as a highly sensitive analytical technique that utilizes nanostructured surfaces to amplify biomolecular signals. SERS enables the detection of cancer biomarkers with unprecedented sensitivity, even at extremely low concentrations. This article aims to explain and highlight the application of SERS in detecting biomarkers such as Carbohydrate Antigen 19-9 (CA19-9), Carcinoembryonic Antigen (CEA), and Alpha-Fetoprotein (AFP), an innovation that holds the potential to transform early cancer detection by enabling faster and more accurate diagnoses, ultimately saving lives and improving patients' quality of life.

Keywords: Cancer, SERS, CA19-9, CEA, AFP

INTRODUCCIÓN

El cáncer continúa siendo uno de los mayores desafíos para la salud mundial, particularmente en sus variantes más agresivas como los cánceres colorrectal, hepático, pancreático y gástrico. Detectarlo a tiempo puede marcar la diferencia entre un tratamiento exitoso y un diagnóstico tardío con pocas opciones terapéuticas donde los métodos tradicionales de detección presentan limitaciones importantes. Las técnicas de imagenología, como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Tomografía Computarizada (TC), solo detectan masas tumorales cuando alcanzan un tamaño considerable, generalmente en etapas avanzadas (Shin et al., 2023). Los análisis basados en biomarcadores, como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o ensayos colorimétricos, frecuentemente no alcanzan la sensibilidad requerida para identificar las bajas concentraciones de marcadores presentes en fases iniciales. A estos desafíos se suma la naturaleza invasiva de las biopsias y sus prolongados tiempos de procesamiento, que retrasan decisiones clínicas cruciales. Estas limitaciones han creado una necesidad urgente de tecnologías más precisas, rápidas y menos invasivas.

En este contexto, la espectroscopía Raman mejorada por superficie (SERS, por sus siglas en inglés) está emergiendo como una alternativa innovadora. Esta tecnología supera tres barreras fundamentales de los métodos convencionales:

1. Sensibilidad nanométrica, detección por debajo de 0.1 ng/mL
2. Mínima invasión, requiriendo solo muestras de sangre u orina
3. Rapidez analítica, el análisis toma unos pocos minutos

Su mecanismo se basa en la identificación de "huellas moleculares" únicas mediante nanoestructuras plasmónicas, permitiendo identificar alteraciones cancerosas antes de que sean visibles estructuralmente. El potencial de SERS se magnifica en la detección específica de biomarcadores clave como la alfa-fetoproteína (AFP), el antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9) y el antígeno carcinoembrionario (CEA), todos fundamentales en la detección de cánceres hepático, pancreático, colorrectal y gástrico. Esta capacidad de identificar patrones moleculares únicos reduce la probabilidad de falsos positivos y mejora la confiabilidad del diagnóstico (Noothalapati et al., 2021).

Aunque aún hay desafíos por superar, como los costos de producción y la aprobación regulatoria, el potencial de esta tecnología es enorme. En un futuro cercano, SERS podría convertirse en una herramienta indispensable para detectar el cáncer de manera temprana, no invasiva y accesible, salvando vidas y mejorando la calidad de vida de millones de personas.

¿Cuál es el principio tras la espectroscopía Raman y SERS?

La espectroscopía Raman es una técnica analítica avanzada que proporciona información a nivel molecular sobre la composición y estructura de la materia, es decir muestras orgánicas e inorgánicas. Este método se basa en el principio de dispersión inelástica, el cual se conoce como efecto Raman (en honor a su descubridor Sir C. Venkata Raman), en el cual los fotones, provenientes de una fuente de luz monocromática (típicamente de láser) interactúan con los enlaces moleculares de una muestra, causando cambios en la energía vibracional. Estos cambios generan luz dispersa con longitudes de onda ligeramente diferentes a la incidente, produciendo un espectro Raman donde la intensidad y la posición de cada señal recibida proporciona información detallada sobre la composición y arquitectura molecular, de ahí que se conozca que cada espectro es una huella digital de la molécula permitiendo así su identificación y caracterización precisa. La espectroscopía Raman es reconocida por su especificidad y mínima preparación de muestras (Silva et al., 2023).

A pesar de sus ventajas, la dispersión Raman es inherentemente débil, ya que solo una pequeña fracción de fotones (aproximadamente 1 en 10 millones) experimenta este fenómeno. Esta limitación reduce la sensibilidad especialmente cuando se aplica a la detección de analitos en bajas concentraciones (Sharma et al., 2012). Como resultado, la técnica Raman estándar a menudo tienen dificultades para detectar biomarcadores en los niveles bajos típicos de los cánceres en etapas tempranas (Wang et al., 2022).

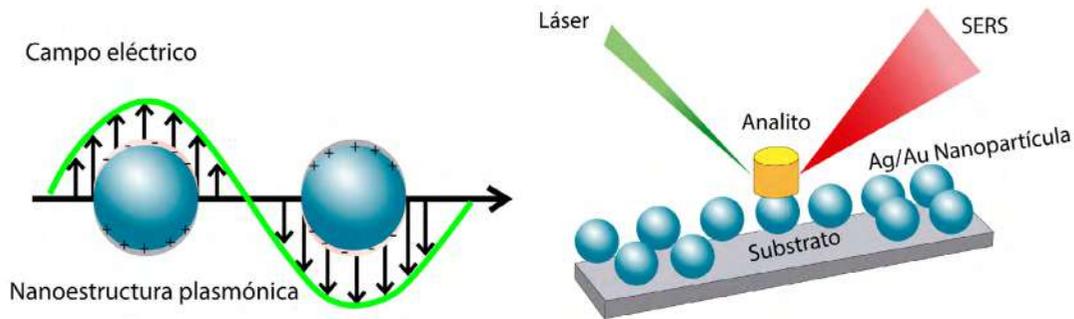


Figura 1. Principio SERS que utiliza nanoestructuras plasmónicas (nanopartículas) para amplificar las señales Raman.

Para superar las limitaciones de sensibilidad mencionadas, se emplea una técnica conocida como SERS. Esta técnica amplifica la señal Raman en varios órdenes de magnitud mediante el uso de superficies metálicas de tamaño nanométrico (nanoestructuras plasmónicas), que pueden ser nanopartículas o bien nanodendritas, típicamente compuestas de oro, plata o cobre. Estas nanosuperficies mejoran el campo electromagnético alrededor de las moléculas adsorbidas. Las nanopartículas de oro y plata son especialmente efectivas, ya que proporcionan una fuerte resonancia plasmónica y con ello el aumento de la dispersión de la luz, lo cual a su vez mejora la sensibilidad de las mediciones, permitiendo detectar incluso concentraciones extremadamente bajas, como en la detección de contaminantes en el medio ambiente o biomarcadores en muestras biológicas (Kim et al., 2021).

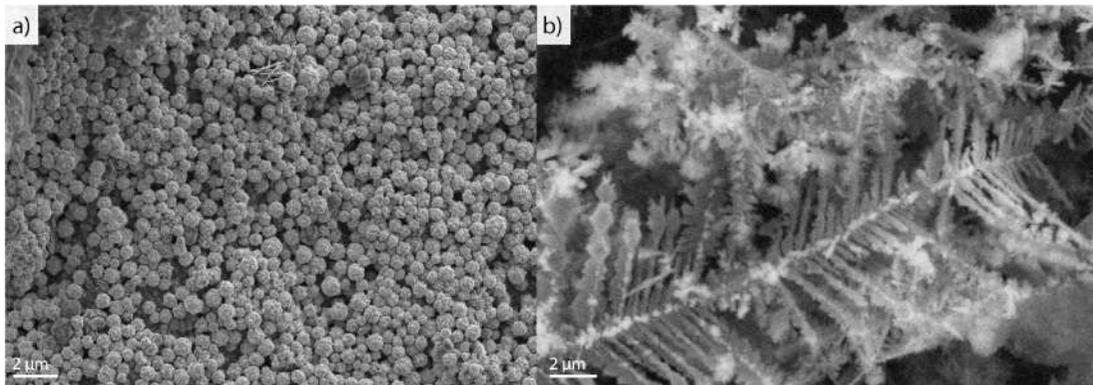


Figura 2. Nanoestructuras plasmónicas de plata: a) nanopartículas y b) nanodendritas.

No obstante, la técnica SERS puede ser todavía mejorada al incorporarle un sustrato con nanoestructuras como columnas, tubos, hilos, entre otros, esto debido a que éstas incrementan notablemente el área superficial sobre la cual las nanopartículas u otras nanoestructuras plasmónicas pueden depositarse (Lei et al., 2017).

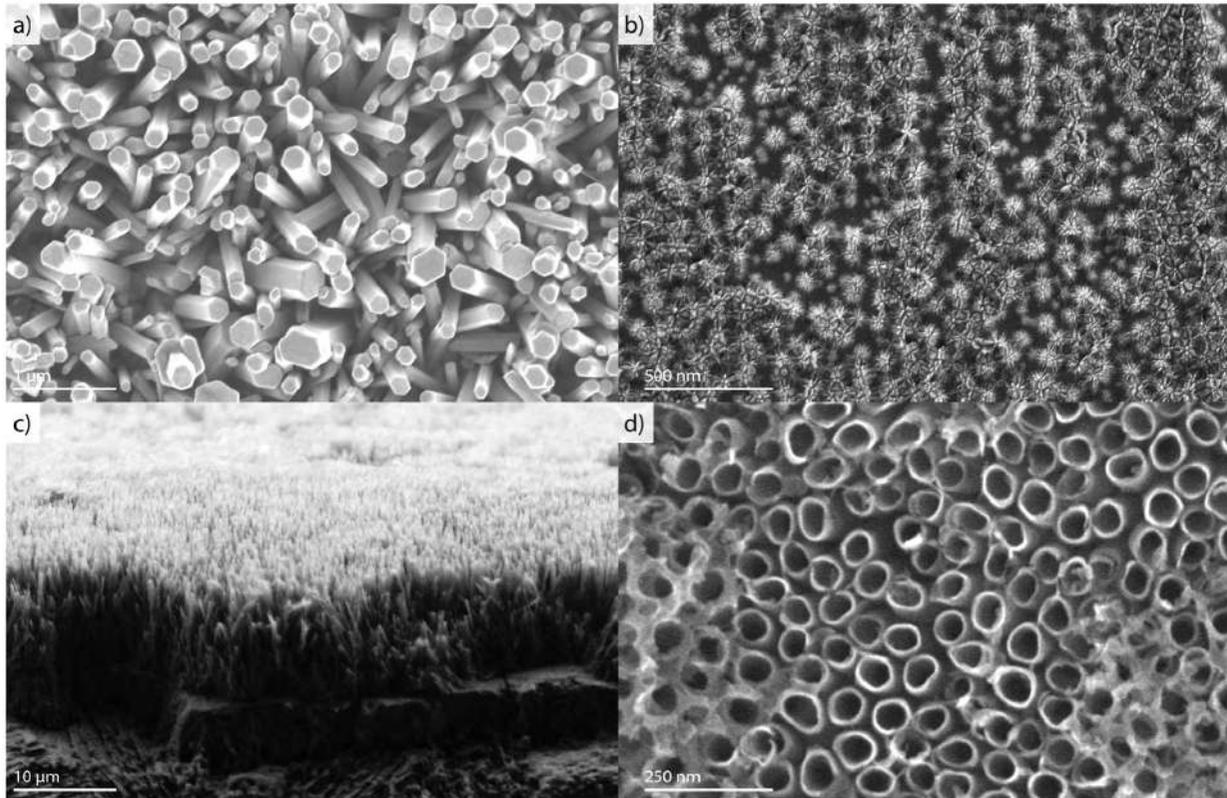


Figura 3. Morfologías nanométricas utilizadas para aumentar la efectividad de los sustratos SERS al incrementar notablemente el área superficial sobre la cual pueden depositarse las nanoestructuras plasmónicas. A) nanocolumnas, b) nanoflores, c) nanoalambres y d) nanotubos.

Biomarcadores

Un biomarcador es una molécula, gen o característica medible que indica un estado biológico normal, patológico o una respuesta a un tratamiento. En el contexto del cáncer, los biomarcadores son indicativos de la presencia de la enfermedad, su progresión y la respuesta al tratamiento. Estos marcadores pueden ser moléculas en la sangre, orina o tejidos (NCI, 2023). Los biomarcadores tumorales permiten identificar alteraciones moleculares específicas que reflejan la presencia y progresión de la enfermedad, facilitando su detección en etapas tempranas. En estos primeros estadios, las opciones terapéuticas son más eficaces, lo que se traduce en una mayor tasa de éxito en el tratamien-

to y una mejora significativa en la supervivencia de los pacientes (Pollap y Swit, 2022). Una de las principales ventajas de los biomarcadores en oncología es su capacidad para ser detectados en fluidos corporales como la sangre y la orina, lo que posibilita métodos de diagnóstico no invasivos en comparación con las biopsias tradicionales. Además, algunos de estos marcadores están directamente asociados con tipos específicos de cáncer, lo que permite personalizar las estrategias terapéuticas según el perfil molecular de cada paciente.

Por ejemplo, en el cáncer del tracto digestivo, biomarcadores como el CA19-9, CEA y AFP son cruciales. El CA19-9 que está asociado principalmente con el cáncer de páncreas, aunque también puede elevarse en cánceres de las vías biliares y colorrectal. En individuos sanos, los niveles de CA 19-9 suelen ser inferiores a 37 U/mL. En pacientes con cáncer pancreático, concentraciones superiores a 100 U/mL pueden indicar una enfermedad avanzada o metastásica; sin embargo, es importante considerar que niveles elevados de CA 19-9 también pueden presentarse en condiciones benignas como pancreatitis o enfermedades hepáticas, lo que limita su especificidad (Jans et al., 2013). Por su parte, el CEA es utilizado básicamente en la detección y seguimiento del cáncer colorrectal, pero también puede elevarse en cánceres de páncreas, estómago, pulmón y mama. En no fumadores sanos, los niveles normales de CEA son generalmente inferiores a 2.5 ng/mL, mientras que en fumadores pueden ser ligeramente más altos, pero usualmente no superan los 5 ng/mL (Rol actual del antígeno carcinoembrionario (CEA) en el manejo del cáncer de colon, 2023). La AFP es un biomarcador clave en la detección del cáncer de hígado, en adultos sanos, los niveles de AFP suelen ser inferiores a 10 ng/mL. Concentraciones superiores a 400 ng/mL son altamente sugestivas de la presencia de este cáncer en pacientes con cirrosis o hepatitis crónica. Los niveles elevados de estos biomarcadores

pueden ser indicativos de la presencia de cánceres específicos, lo que facilita un diagnóstico más preciso y temprano (Feng et al., 2017).

Otro punto importante por mencionar es la especificidad de un biomarcador, la cual se refiere a su capacidad para distinguir entre una condición patológica y un estado normal o una enfermedad diferente. Aunque biomarcadores como CA19-9, CEA y AFP son altamente útiles, su especificidad individual puede ser limitada debido a la posibilidad de elevaciones en otras enfermedades no malignas. Por ejemplo, el CA19-9, aunque es un marcador clave en el cáncer pancreático, también puede aumentar en pancreatitis crónica y enfermedades biliares benignas. De manera similar, el CEA, aunque se asocia principalmente con cáncer colorrectal, también puede encontrarse elevado en fumadores y en enfermedades inflamatorias del intestino. Por esta razón, el uso combinado de múltiples biomarcadores mejora la especificidad y confiabilidad del diagnóstico. Estudios recientes han demostrado que la combinación de CA19-9 con CEA aumenta la precisión en la detección del cáncer colorrectal avanzado, mientras que la medición conjunta de AFP y DCP (proteína inducida por deficiencia de vitamina K) mejora la detección temprana del carcinoma hepatocelular (Galle et al., 2018). Este enfoque combinado reduce la tasa de falsos positivos y mejora la toma de decisiones clínicas. En las etapas avanzadas de la enfermedad, los biomarcadores desempeñan un papel crucial en la evaluación de la respuesta al tratamiento y en la detección temprana de posibles recaídas. Su monitoreo continuo no solo facilita un seguimiento detallado del progreso del paciente, sino que también permite ajustar las intervenciones terapéuticas de manera precisa, optimizando el manejo clínico y contribuyendo a mejorar el pronóstico a largo plazo.

Aunado a lo anterior, la técnica SERS permite la identificación de biomarcadores median-

te dos enfoques principales: detección directa y detección indirecta, cada uno con características específicas que optimizan su aplicación en el diagnóstico molecular. La detección directa se basa en la lectura de las señales espectrales características de los biomarcadores, los cuales son adsorbidos sobre nanoestructuras plasmónicas. Al interactuar con el sustrato, estas moléculas generan una respuesta Raman amplificada que permite su identificación sin necesidad de marcadores adicionales. Por su parte, la detección indirecta emplea etiquetas (también llamadas reportadores Raman o nanoetiquetas) SERS funcionalizadas con elementos de reconocimiento, como anticuerpos o aptámeros, que se unen selectivamente a los biomarcadores objetivo, mejorando así la especificidad y amplificando la señal. Estas nanoetiquetas contienen colorantes Raman específicos que, al excitarse, producen señales detectables que confirman la presencia de la molécula de interés (Guerrini y Álvarez-Puebla, 2020).

Ambas estrategias ofrecen ventajas en la detección de biomarcadores tumorales, permitiendo análisis altamente sensibles y específicos que pueden aplicarse en el diagnóstico temprano y monitoreo del cáncer.

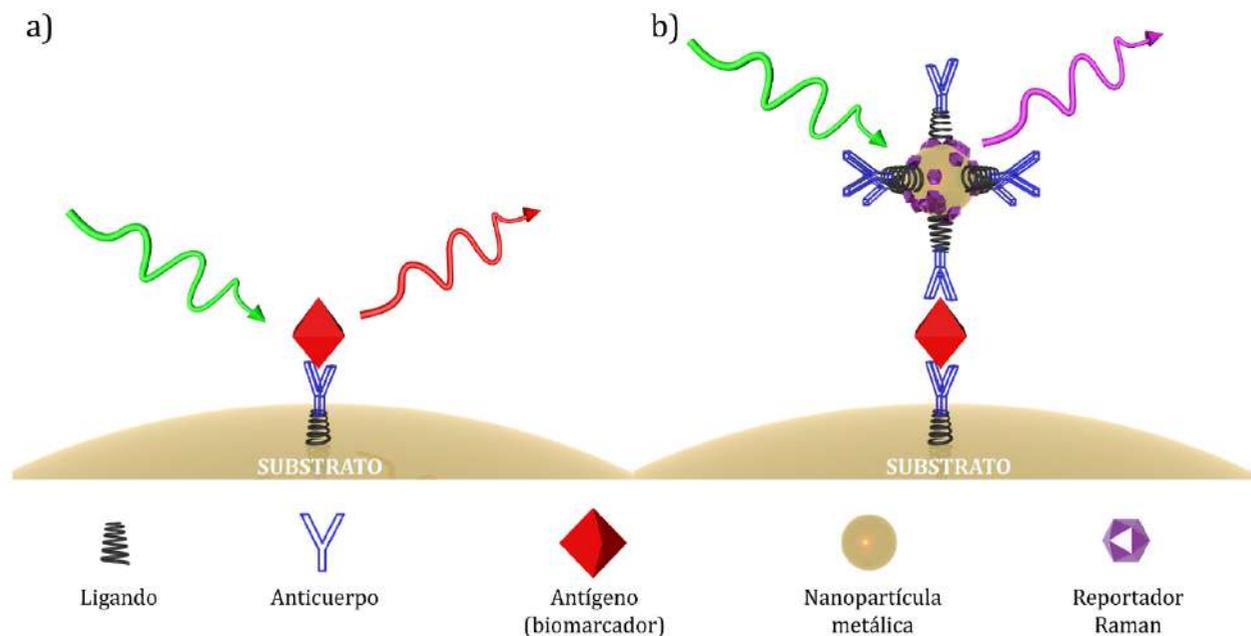


Figura 4. Esquema general del ensayo para la detección de biomarcadores tumorales por SERS, a) detección directa sin etiquetas o reportadores Raman, b) con etiquetas.

Detección de biomarcadores

La técnica SERS no solo amplifica señales moleculares, sino que también ofrece una herramienta de diagnóstico con una precisión sin precedentes. Gracias a su capacidad para detectar biomarcadores específicos en entornos biológicos complejos y es debido a esto que esta tecnología está revolucionando la detección temprana del cáncer.

En los últimos años, los avances en SERS han llevado a mejoras significativas en la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad para la detección de biomarcadores de cáncer. Dentro del interés del presente artículo, mencionamos que los antígenos CA19-9, CEA y AFP pueden ser identificados y cuantificados utilizando SERS al ser adsorbidos en sustratos especialmente diseñados, por ejemplo, sustratos SERS que utilizan nanoestrellas de oro y otras estructuras metálicas, logrando mejoras en la sensibilidad gracias a la amplificación de la señal de un reportador Raman, el cual es el que se rastrea cuando se realiza la detección. Esta técnica permite detectar concentraciones de CA 19-9 a niveles extremadamente bajos, por debajo de las capacidades de los ensayos comerciales convencionales.

Como es de notarse, gran parte de la importancia de esta técnica recae en su alta sensibilidad donde los avances en la ingeniería de nanoestructuras también han sido fundamentales para abordar los desafíos de intensidad y confiabilidad de las señales en muestras biológicas complejas. La detección del AFP en concentraciones menores a 0.1 ng/mL (Er et al., 2021), un umbral crucial para diagnosticar el carcinoma hepatocelular en sus primeras etapas se ha logrado, como lo menciona un estudio de 2021, donde ciertos sustratos SERS con nanoestructuras tipo girasol demostraron una amplificación significativa de la señal Raman, alcanzando un límite de detección de 0.05 ng/mL en suero diluido (Zhao

et al., 2021). Por su parte, el antígeno CEA ha logrado ser detectado en límites tan bajos como 0.258 ng/mL, empleando capas dobles de nanopartículas de oro (Wang et al., 2022).

Por lo anterior, esta tecnología es especialmente útil en aplicaciones clínicas, ya que permite diferenciar con alta precisión los niveles de antígenos en muestras de suero humano. Gracias a su sensibilidad y selectividad, los sensores SERS están abriendo nuevas posibilidades para el diagnóstico temprano y el monitoreo de enfermedades como el cáncer, ofreciendo una alternativa más rápida y precisa que los métodos convencionales.

Aspectos de bioseguridad

Dado que la espectroscopía Raman mejorada por superficie utiliza nanoestructuras metálicas, como nanopartículas de oro o plata, su implementación requiere consideraciones de bioseguridad específicas, especialmente en comparación con técnicas tradicionales como ELISA o PCR. Algunos puntos importantes, de manera general, se mencionan a continuación.

Almacenamiento y manejo de muestras: Al igual que en otras técnicas, las muestras biológicas analizadas mediante SERS deben ser almacenadas y manejadas siguiendo estrictos protocolos de bioseguridad para prevenir la contaminación y garantizar la integridad de los resultados. Esto incluye el uso de equipos de protección personal (EPP) adecuados; almacenamiento en condiciones controladas de temperatura, que dependiendo del tipo de muestra puede ir de -80 °C a -20 °C; y la implementación de procedimientos estandarizados para la manipulación de muestras.

Manejo de nanopartículas: Las nanopartículas metálicas utilizadas en SERS pueden presentar riesgos para la salud si no se manejan

adecuadamente. Es esencial implementar protocolos específicos que incluyan trabajar en áreas bien ventiladas o en cabinas de seguridad biológica, utilizar guantes, batas y protección ocular para minimizar la exposición, y evitar la generación de aerosoles o polvos que puedan ser inhalados.

Eliminación de residuos: la eliminación de residuos en técnicas tradicionales como ELISA o PCR generalmente implica desechos biológicos y químicos que deben ser tratados según las normativas establecidas para materiales peligrosos. En el caso de SERS, además de estos residuos, se deben considerar los desechos que contienen nanopartículas metálicas. Es fundamental recoger estos residuos en contenedores específicos y etiquetados adecuadamente, seguir las regulaciones locales e institucionales para la eliminación de nanomateriales, y considerar la posibilidad de reciclar o reutilizar las nanopartículas, siempre que sea seguro y práctico.

Al integrar SERS en entornos clínicos o de investigación, es crucial desarrollar y adherirse a protocolos de bioseguridad que aborden tanto las consideraciones comunes a las técnicas analíticas tradicionales como las específicas asociadas al uso de nanomateriales. Esto garantizará no solo la seguridad del personal y del entorno, sino también la validez y reproducibilidad de los resultados obtenidos (Mosca et al., 2024).

Perspectivas y conclusiones

No todo es miel sobre hojuelas y es importante recalcar que existen y persisten desafíos en la implementación a gran escala. Uno de los principales obstáculos es la reproducibilidad de las señales, ya que pequeñas variaciones en la fabricación de los sustratos nanoestructurados pueden afectar la confiabilidad de los resultados. Además, los costos asociados con la producción de estos sustratos siguen siendo elevados, lo que dificulta su adopción en entornos clínicos. No obstante, investigaciones en curso buscan alternativas más asequibles, así como estrategias para reutilizar los sustratos sin comprometer la precisión de las mediciones, lo que podría hacer que esta tecnología sea más accesible tanto para laboratorios especializados como para entornos de atención primaria. Ampliando el panorama, es importante denotar que la tecnología SERS también se está beneficiando de los avances en inteligencia artificial lo que ha permitido analizar espectros complejos, facilitando la detección simultánea de múltiples biomarcadores y reduciendo errores en el diagnóstico.

En los próximos años, los esfuerzos científicos se orientarán hacia la optimización de SERS mediante la combinación de enfoques con etiquetas, que garantizan alta especificidad, y métodos sin etiquetas, que simplifican y reducen costos. El desarrollo de técnicas de multiplexación, capaces de detectar simultáneamente múltiples biomarcadores en una sola medición, promete me-

jorar la eficiencia del diagnóstico, proporcionando una visión más detallada de la progresión del cáncer. Asimismo, la integración de SERS con biopsias líquidas podría transformar el monitoreo no invasivo de la enfermedad, permitiendo ajustar tratamientos de manera más precisa y personalizada.

La incorporación de estas tecnologías en la práctica clínica podría marcar una diferencia significativa en la lucha contra el cáncer. La detección temprana y el diagnóstico oportuno no solo mejorarían las tasas de supervivencia, sino que también reducirían los costos asociados con el tratamiento de la enfermedad en etapas avanzadas. Además, el desarrollo de dispositivos portátiles basados en SERS ampliaría el acceso a diagnósticos precisos en comunidades con recursos limitados, ayudando a cerrar brechas en la atención médica y mejorando la equidad en el acceso a tecnologías innovadoras. En este contexto, la tecnología SERS representa una evolución clave en el diagnóstico oncológico. Para que esta tecnología alcance su máximo potencial, es crucial fortalecer la colaboración entre investigadores, profesionales de la salud y la industria, abordando desafíos técnicos y regulatorios. Con un desarrollo continuo y una estrategia integral de implementación, estas innovaciones podrían redefinir la detección y el tratamiento del cáncer, mejorando la calidad de vida de los pacientes a nivel global.

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

- Er, E., Sánchez-Iglesias, A., Silvestri, A., Arnaiz, B., Liz-Marzán, L., Prato, M., & Criado, A. (2021). Metal Nanoparticles/MoS₂ Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Sandwich Immunoassay for α -Fetoprotein Detection. *ACS Appl. Mater.*, 13(7), 8823-8831. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c22203>
- Feng, F., Tian, Y., Xu, G., Liu, Z., Liu, S., Zheng, G., . . . Zhang, H. (2017). Diagnostic and prognostic value of CEA, CA19-9, AFP and CA125 for early gastric cancer. *BMC Cancer*, 17(737), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3738-y>
- Galle, P., Forner, A., Llovet, J., Mazzaferro, V., Piscaglia, F., Raoul, J., & Vilgrain, V. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. *Journal of Hepatology*, 69, 182-236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>
- Guerrini, L., & Álvarez-Puebla, R. (2020). Chapter 2 - Surface-enhanced Raman scattering (SERS) sensing of nucleic acids. *Frontiers of Nanoscience*, 16, 9-23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102828-5.00002-4>
- Jans, J., Talma, M., Almonacid, M., Cruz, J., Cáceres, M., Rosenfeld, C., & Jara, G. (2013). Rendimiento diagnóstico del marcador tumoral CA 19-9 en la diferenciación entre patología bilio-pancreática benigna y maligna. *Revista chilena de cirugía*, 65(4), 307-314. <https://doi.org/10.4067/S0718-40262013000400004>
- Kim, H., Lee, T., Yun, J., Lee, G., & Hong, Y. (2021). Cancer Protein Biomarker Identification and Quantification Using Nanoforest Substrate and Hand-Held Raman Spectrometer. *Microchemical Journal*, 160, 105632. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105632>
- Lei, Y., Weihua, W., Haiyan, J., Qianghua, Z., Huihui, S., Miao, Z., . . . Zhaoqi, S. (2017). Improved SERS performance of single-crystalline TiO₂ nanosheet arrays with coexposed {001} and {101} facets decorated with Ag nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 242, 932-939. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.162>
- Mosca, S., Mehta, M., & Skinner, W. (2024). Active Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): A Novel Concept for Enhancing Signal Contrast in Complex Matrices Using External Perturbation. *Applied Spectroscopy*, 79(2), 320-327. <https://doi.org/10.1177/00037028241267898>

- NCI. (7 de 12 de 2023). Marcadores tumorales. Retrieved 25 de 3 de 2025, from Cancer.gov: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/diagnostico/hoja-informativa-marcadores-de-tumores>
- Noothalapati, H., Iwasaki, K., & Yamamoto, T. (2021). Non-Invasive Diagnosis of Colorectal Cancer by Raman Spectroscopy: Recent Developments in Liquid Biopsy and Endoscopy Approaches. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*, 258, 119818. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119818>
- Pollap, A., & Swit, P. (2022). Recent Advances in Sandwich SERS Immunosensors for Cancer Detection. *Int. J. Mol. Sci.*, 29(9), 4740. <https://doi.org/10.3390/ijms23094740>
- Rol actual del antígeno carcinoembrionario (CEA) en el manejo del cáncer de colon. (2023). *Revista de cirugía*, 75(4), 255-262. <https://doi.org/10.35687/s2452-454920230041690>
- Sharma, B., Frontiera, R., Henry, A., Ringe, E., & Van Duyne, R. (2012). SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today*, 15, 16-25. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(12\)70017-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70017-2)
- Shin, H., Choi, B., Shim, O., Kim, J., Park, Y., Cho, S., . . . Choi, Y. (2023). Single Test-Based Diagnosis of Multiple Cancer Types Using Exosome-SERS-AI for Early Stage Cancers. *Nat. Commun.*, 14, 1644. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37403-1>
- Silva, M., Malitckii, E., Santos, T., & Vilaca, P. (2023). Review of conventional and advanced non-destructive testing techniques for detection and characterization of small-scale defects. *Progress in Materials Science*, 138, 101155. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2023.101155>
- Wang, T., Zhu, Y., Weng, S., Lin, X., Kong, K., Weng, Y., . . . Lin, D. (2022). Optical biosensor based on SERS with signal calibration function for quantitative detection of carcinoembryonic antigen. *Biomed. Opt. Express*, 13, 5962-5970. <https://doi.org/10.1364/BOE.474273>
- Zhao, X., Zhu, A., Wang, Y., Zhang, Y., & Zhang, X. (2021). Sunflower-Like Nanostructure with Built-In Hotspots for Alpha-Fetoprotein Detection. *Molecules*, 26(4), 1197. <https://doi.org/10.3390/molecules26041197>

Microscopía de Fuerza Atómica en el análisis de espermatozoides

Atomic Force Microscopy in sperm analysis

Héctor Pérez Ladrón de Guevara^{1*}, Adalberto Zamudio Ojeda², Santiago José Guevara-Martínez².

El Microscopio de Fuerza Atómica conocido como AFM por sus siglas en inglés (Atomic Force Microscopy), es un tipo de microscopía electrónica que permite generar una imagen a través de la interacción de las fuerzas de repulsión entre una punta llamada "cantilever" y la superficie que se está midiendo, un láser alineado a la punta y un detector mide los cambios en la altura de esta, obteniéndose un mapa del área medida con la altura respectiva a cada punto, lo cual se aprecia en una escala de colores. La figura 1 muestra un esquema del funcionamiento del AFM.

<https://doi.org/10.25009/rmu.2025.1.134>

Recibido: 07/03/25

Aprobado: 26/05/25

¹ Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara

² Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara

* hector.pladrondeguevara@academicos.udg.mx

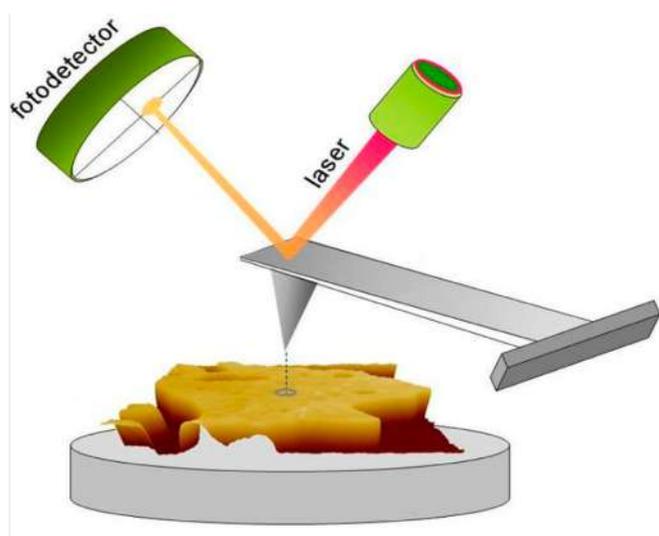
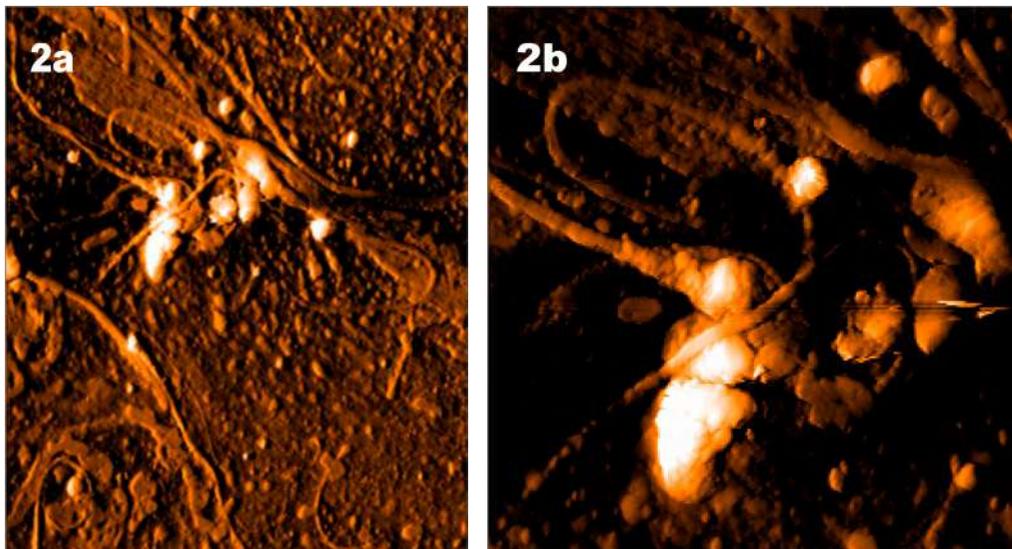


Figura 1. Esquema del funcionamiento del Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).

El AFM permite obtener imágenes con una resolución de amstrongs ($1 \text{ \AA} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}$), es decir 1,000 veces más el aumento que se obtiene en un microscopio óptico. Estas características lo hacen ideal para el estudio de materiales, y en el caso de muestras biológicas sus aplicaciones han estado aumentando.

A diferencia de otros tipos de microscopias electrónicas más caras como el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), en el que la muestra se tiene que recubrir en oro para poder obtener señal, o el Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) en el que el tamaño del espermatozoide resulta muy grande para las posibilidades del equipo y además de que se necesitan fijarlos con técnicas más complejas. En el AFM solo se necesita fijar la muestra por analizar en una superficie que puede ser un portaobjetos, la forma de fijarlo no requiere tinción ni colorantes, únicamente se deposita una muestra de semen en el portaobjetos y se distribuye uniformemente con un hisopo para posteriormente dejarlo secar unos minutos. Se debe de mencionar que la muestra a analizar debe de estar seca por que se utiliza el AFM en medición tipo "Contacto".

En las figuras 2a y 2b se muestran las imágenes obtenidas por el AFM en modo Contacto en un área de barrido de 70x70 micrómetros (μm), y también en un área de barrido de 28.3x28.3 micrómetros (μm).



Figuras 2a y 2b. Imágenes de Espermatozoides obtenidas por AFM en modo Contacto en un área de barrido de 70x70 micrómetros (μm), y 28.3x28.3 micrómetros (μm) respectivamente.

Las herramientas de análisis del microscopio nos permiten determinar aspectos importantes de la morfología de los espermatozoides tales como el tamaño de la cabeza, del flagelo, y observar si existen posibles alteraciones en su estructura.

También a diferencia de las otras técnicas, ya que se mide la altura en cada punto es posible realizar una imagen 3D que nos permite apreciar con mayor detalle las características morfológicas de los espermatozoides, en la figura 3 se muestra la imagen 2a en una vista 3D, con el software del equipo es posible medir la longitud y grosor de la cabeza, parte central, y flagelo del espermatozoide.

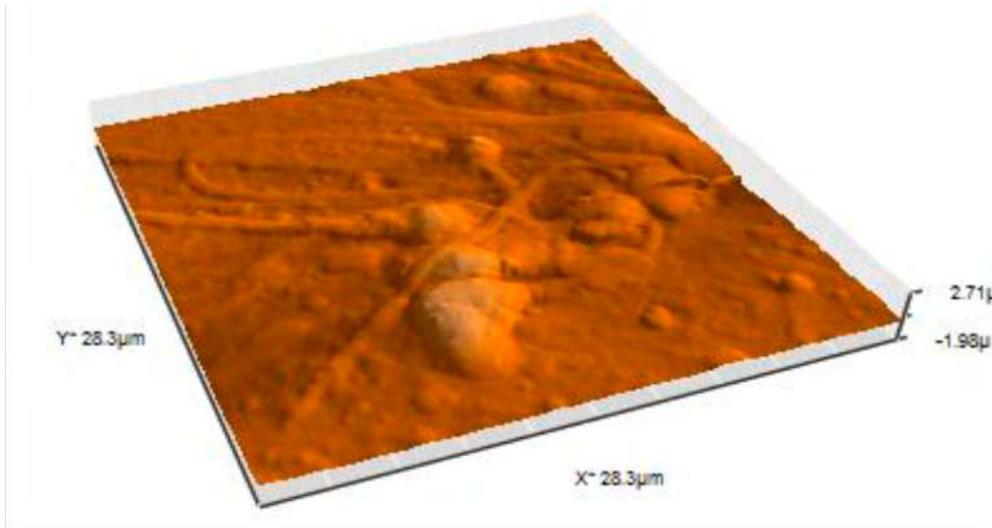


Figura 3. Imagen 3D de Espermatozoides obtenida por AFM en modo Contacto en un área de barrido de 28.3x28.3 micrómetros (μm).

Por mencionar algunas aplicaciones, estos estudios nos permiten observar cambios en el volumen del espermatozoide, características comúnmente relacionadas con algunos tipos de enfermedades, así como posibles malformaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Dufrêne, Y., Ando, T., Garcia, R. et al. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotech* 12, 295–307 (2017).

Methods in Molecular Biology, vol. 242: Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications, Edited by: P. C. Braga and D. Ricci, Humana Press Inc., Totowa, NJ

Atomic Force Microscopy, Peter Eaton and Paul West, Oxford University Press, 2010.





**Revista Médica de la
Universidad Veracruzana**

Volumen 2025-1
Enero-marzo

