CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Desarrollo de un método de detección para el virus del papiloma humano tipo 16

Tesis que presenta

M. en C. Giovanni Palomino Vizcaino

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de tesis

Dr. Luis Marat Alvarez Salas.

México, D.F. Enero, 2018

Durante la realización del presente trabajo el M. en C. Giovanni Palomino Vizcaino fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo el número de registro 418001, gracias por el apoyo.

Desarrollo de un método de detección para el virus del papiloma humano tipo 16

El presente trabajo de investigación fue realizado en el

Laboratorio de Terapia Génica

Del departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav

Bajo la Dirección del

Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Para mis padres

“La ciencia es la clave de nuestro futuro y si tu no crees en la ciencia, entonces nos estás reteniendo a todos hacia atrás”

-Bill Nye

Agradecimientos por los fondos

"Los privilegiados tienen la obligación de
regresar algo al país que les ha permitido tener
esa posición, por qué de qué sirve la experiencia,
el conocimiento,
el talento si no se hace con ello de México un

La presente Tesis Doctoral se desarrolló en el Laboratorio de Terapia Génica bajo la dirección del Dr. Luis Marat Alvarez Salas en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav).

Durante toda mi estadía el Laboratorio de Terapia Génica yo el M. en C. Giovanni Palomino Vizcaíno recibí una beca de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo el número de registro 418001, por todo el apoyo gracias.

El financiamiento de toda la investigación realizada en la presente Tesis de Doctorado fue recaudado gracias al gran esfuerzo y dedicación del Dr. Luis Marat Álvarez Salas, por su incansable labor muchas gracias.

Agradezco a la empresa Genes2Life, con la cual formamos un gran equipo de trabajo, en especial al Dr. Octavio García González por la gran oportunidad de adentrarme en el mundo de la industria tecnológica en el país, gracias por los fondos aportados para la realización de este trabajo.

Como parte de mi formación científica, asistí al 4to Simposio Internacional de la Sociedad Internacional de Aptámeros con sede en la ciudad de Oxford, Reino Unido. La asistencia al simposio fue apoyada por el Cinvestav, muchas gracias por el apoyo para la asistencia al simposio, fue una experiencia invaluable para mi desarrollo como científico.

Le agradezco a la red estructura función y evolución de proteínas por otorgarme una beca para la presentación del presente trabajo en el 6to Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas.

Para finalizar la presente Tesis Doctoral, el Cinvestav me otorgó una beca de extensión la cual fue indispensable para la consecución del presente trabajo muchas gracias.

Agradecimientos

"En cuestiones de ciencia, la autoridad de miles no vale más que el humilde razonamiento de un único individuo"

Culminar un proyecto multidisciplinario como este en nuestro país es un reto que solo se puede cumplir con buena voluntad, con la buena voluntad de tantos mexicanos que en algún momento de mi vida y de la presente investigación me brindaron su apoyo incondicional, por lo cual en esta sección me propongo plasmar mi agradecimiento para todos ellos.

A mi madre, la Sra. Martha Patricia Vizcaino López, por ensayarme que siempre puedo lograr lo que me propongo e impulsarme a esforzarme día a día para conseguirlo, por ser una gran guía de vida, por enseñarme a conducirme con humildad, por ser una incansable luchadora y por siempre hacerlo con la frente en alto y con una gran sonrisa.

A mi padre, el Sr. Rogelio Palomino Álvarez por impulsarme a llegar más alto y ensayarme siempre con el ejemplo, por enseñarme que la única forma de trabajar es con la más grande entrega y dedicación, por demostrarme día a día

que puedo logran mis metas si uso mi inteligencia, por demostrarme con el sudor de su frente que todo es posible si uno trabaja duro, con constancia y dedicación, por acompañarme en cada loco proyecto que me plantee y por enseñarme a materializar los locos impulsos de mis neuronas.

A mis padres por regalarme una gran vida, por permitirme equivocarme constantemente, por regalarme todas las oportunidades, por permitirme elegir mi camino de vida y ser partícipes de cada paso, por darlo todo para que este día tuviese este final.

A mi hermana, la M. en C. Kenia Palomino Vizcaino por ser la mejor compañera de familia, por las incontables peleas con finales divertido, por ser un gran ejemplo como persona, por enseñarme el valor de la familia y sobre todo por ser cómplice en cada una de mis locuras.

A Raúl Darían Martínez Hernández, por recordarme día a día que estoy vivo, por compartir conmigo su forma de ver y conducirse ante la vida, por su apoyo incondicional, por siempre afrontar las situaciones de la vida con gran convicción entereza y optimismo, por enseñarme que todo es eventual y por compartir conmigo esta gran aventura.

Al Dr. Luis Marat Alvarez Salas, por mostrarme su pasión por la ciencia, por enseñarme que nuestros límites no son intelectuales, por proveerme todo para desarrollarme como científico, por mostrarme siempre su cara paciente, por siempre mostrarme su gran pasión por transmitir sus conocimientos y sobre todo por las numerosas discusiones científicas que tanto nos apasionan y por siempre mostrarme un punto de vista enriquecedoramente distinto.

A todos mis asesores Dra. Julia Toscano Garibay, Dra. Rosa María del Refugio Bermúdez Cruz, Dra. Beatriz Xoconostle Cazares, Dr. José Luis García Cordero y Dr. Javier Hernández Sánchez por acompañarme en la gran aventura que fue este proyecto, por sus acertados consejos e impecables observaciones.

A la M. en C. Diana Gabriela Valencia Reséndiz, por ser la mejor compañera en esta difícil travesía, por esas tardes de café y cervecitas, por las

largas platicas científicas, los numerosos abrazos e incontables carcajadas, por ser una persona intachable y una amiga extraordinaria.

Al M. en C. Alejandro Gonzáles Torres, por demostrarnos que todo es posible cuando se lucha intensamente por alcanzarlo, por ser una persona única, por los incontables buenos momentos.

Al M. en C. Sergio Israel Rangel Guerrero, por las excelentes discusiones científicas y por las grandes ideas, por siempre estar dispuesto a ayudar muchas gracias.

A la M. en C. María Fernanda Pérez y Pérez, por ser una gran alumna y sobre todo una gran amiga, por las grandes aventuras, por siempre estar dispuesta a aprender y a ensayar, sobre todo por esa forma tan partículas de ver la vida.

A el B. Q. Mateo Alejandro Martínez Roque, por convertirte en un gran amigo y un nuevo compañero de cervecitas, muchas gracias por los buenos momentos.

A la Q. F. B. Evelyn Gabriela Bañuelos Villegas y al I. B. Q. Pablo Alberto Franco Urquijo, por formar parte de este equipo de trabajo.

Al Dr. José Manuel Cornejo Bravo, de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California por darme la primera oportunidad de entrar a un laboratorio, por permitirme jugar como científico y por el continuo apoyo durante toda mi travesía hasta el día de hoy.

A la Q. F. B. Lucithania Hernández Hernández, por ser un gran ejemplo a seguir, por exigirme siempre ser el mejor, por siempre cultivar mi lado creativo, por impulsar mi espíritu de aventurero y por ser una gran amiga.

A la Dra. Liliana Quintanar Vera y a la Q. Atenea Villegas Vargas, del departamento de Química del Cinvestav, por brindarme desinteresadamente su ayuda invaluable y sobre todo por todos los buenos y divertidos momentos.

Al M. en C. Juan Ismael Rea Hernández por toda la ayuda prestada para la realización de este proyecto y un gran agradecimiento al Dr. Samuel Zinker Ruzal porque su gran altruismo no conoce límites.

Muy especialmente a Gabriela Mora Macías por su gran entrega maternal para con cada uno de los alumnos, por siempre mostrar una cara sonriente y por su incansable labor, muchas gracias.

Al señor Héctor Vargas Sánchez por su incansable trabajo para el desarrollo de nuestras actividades y sobre todo por esas enriquecedoras platicas donde siempre me mostró un enriquecedor punto de vista.

A la B. Lourdes Rojas de la unidad de microscopia electrónica del Cinvestav y al Dr. Daniel Bahena Uribe del laboratorio avanzado de nanoscopía electrónica del Cinvestav por toda la ayuda brindada, pero sobre todo por mostrarnos a los pequeños protagonistas de esta gran historia.

A M. en C. Lizbeth Hernández Ancheita, M. en C. Juan Carlos Cifuentes Goches y M. en C. Juan de Dios Gómez López, por ser los mejores compañeros durante toda esta travesía, por todos esos grandes momentos que compartimos.

A la M. en C. María Guadalupe Aguilar González, por el gran trabajo de apoyo realizado, por mostrarnos siempre como conseguir nuestros objetivos.

“La gloria del mundo es transitoria, y no es ella la que nos da la dimensión de nuestra vida, sino la elección que hacemos de seguir nuestra leyenda personal, tener fe en nuestras utopías y luchar por nuestros sueños”

-Paulo Coelho

Visión general

> Tu tiempo es limitado, no lo malgastes viviendo la vida de alguien distinto. No quedes atrapado en el dogma que es vivir como otros piensan que deberías vivir. No dejes que los ruidos de las opiniones de los demás acallen tu propia voz interior. Y lo que es más importante, ten el coraje para hacer lo que te dicen tu corazón y tu intuición.

Una de cada diez muertes por cáncer en mujeres mexicanas es debida a cáncer cérvico uterino (CCU). Recientes estudios demuestran solo 50% de las mujeres mayores de 25 años se han realizado una prueba de detección para CCU y que 60% de los casos de CCU se detectan en etapas tardías, imposibilitando el tratamiento oportuno las lesiones precancerosas y complicando su tratamiento como tumores sólidos. El propósito de la presente tesis doctoral fue el desarrollo de un dispositivo diagnóstico de la infección productiva del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH16). Nuestra visión es que el dispositivo sea empleado en nuestro país como una prueba rápida que diagnostique una infección temprana del VPH16 en la población femenina, hemos diseñado el dispositivo de tal manera que sea posible el autoanálisis, de esta manera nosotros creemos que la población tendrá una herramienta que le permita el diagnóstico de la infección, concientizándola del riesgo a desarrollar

cáncer. Se espera que la población infectada aumente la frecuencia de sus consultas ginecológicas permitiendo así identificar y erradicar lesiones de bajo grado e impidiendo su progresión a cáncer.

Consideramos algunos aspectos indispensables para alcanzar este objetivo. El dispositivo debe ser; **Económico**, debe estar al alcance del bolsillo del usuario, **Rápido**, facilitando la obtención de resultados, **Sencillo**, de tal manera que sea posible que las mujeres se autoanalicen, por lo cual es indispensable que la obtención de la muestra sea fácil (**no Biopsia**) y que detecte específicamente **partículas virales.**

Con todo esto en mente hemos diseñado un biosensor óptico empleando aptámeros y nanopartículas de oro, de tal manera que cuando se detecten las partículas virales se apreciará un cambio de color de rojo a azul.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS POR LOS FONDOS XI

AGRADECIMIENTOS XIII

VISIÓN GENERAL XIX

LISTA DE ILUSTRACIONES XXV

LISTA DE FIGURAS XXVII

LISTA DE TABLAS XXIX

RESUMEN XXXI

ABSTRACT XXXIII

INTRODUCCIÓN 1

1 BIOSENSORES 1

1.1 ELEMENTOS DE SENSORES 3

1.2 ELEMENTOS DE BIORECONOCIMIENTO 4

2 APTÁMEROS 4

2.1 MODIFICACIONES POST-SELEX 8

3 NANOPARTÍCULAS DE ORO 12

3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA SUPERFICIE DE NANOPARTÍCULAS DE ORO 14

4 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH). 15

4.1 VPH16 16

4.2 PROTEÍNA L1 VPH16 17

ANTECEDENTES 21

JUSTIFICACIÓN 25

HIPÓTESIS 27

OBJETIVOS 29

1. OBJETIVO GENERAL 29

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 30

MATERIALES Y MÉTODOS 31

1 REACTIVOS BIOLÓGICOS 31

1.1 ENZIMAS Y OTROS REACTIVOS BIOLÓGICOS 31

1.2 CÉLULAS Y MEDIOS DE CULTIVO 32

1.3 Oligonucleótidos y plásmidos 33
2 Reactivos químicos 36
3 Equipo 37
4 Expresión de GST-GFP 38
4.1 Transformación 38
4.2 Expresión y purificación de la proteína GFP del VPH16 38
5 Producción de partículas tipo virus de L1 40
5.1 Obtención de baculovirus recombinantes 40
5.2 Infección viral, lisis celular y maduración 41
5.3 Purificación de VLPs 43
5.4 Análisis de los complejos de VLPs 43
6 Producción de los aptámeros 44
6.1 Amplificación por PCR 44
6.2 Transcripción *in vitro* (TIV) 44
6.3 Purificación de TIV 45
6.4 Producción de aptámeros marcados radiactivamente 46
7 Ensayos de unión 48
8 Determinación de la constante de disociación 49
9 Análisis in silico de los aptámeros 51
10 Síntesis de nanopartículas de oro 51
11 Caracterización de las GNPs 51
11.1 Determinación de la concentración de GNPs 51
11.2 Análisis de las GNPs en TEM de alta resolución 51
11.3 Dispersión de luz dinámica 52
12 Ensayos de agregación 52
13 Funcionalización de GNPs 53

RESULTADOS 55

1. Diseño del Biosensor 55
2 Caracterización de VLPs 56
3 Caracterización de GNPs 58
4 La versión de DNA de Sc5-c3 no reconoce VLPs 61
5 El aptámero sintético reconoce a las VLPs 62
6 El ML como cadena sencilla no modifica la unión de Sc5c3 64
7 El hibrido DNA/RNA Sc5-c3 reconoce VLPs 64
8 Sc5-c3-SH también reconoce a las VLPs 66
9 Sc5-c3Δ18 se une fuertemente a VLPs L1 VPH16 67
10 La Fuerza iónica bloquea la unión aptámero-VLPs 67
11 La mutante C27A no reconoce VLPs L1 VPH16 68
12 GNPs se agregan completamente con 70 mM NaCl 70
12 Las VLPs inhiben la agregación de las GNPs 71
13 Disgregación de los complejos de VLPs 72
14 La interacción GNPs/VLPs es reversible 74

15 LA INTERACCIÓN GNPS/VLPS NO ES ELECTROSTÁTICA 76
16 LA INTERACCIÓN GNPS-VLPS ES HIDROFÓBICA 78
17 LAS GNPS FUNCIONALIZADAS NO INTERACTÚAN CON LAS VLPS 80
18 LOS PSV TAMBIÉN INHIBEN LA AGREGACIÓN DE LAS GNPS 81

DISCUSIÓN 83

CONCLUSIONES 93

PERSPECTIVAS 95

ANEXO 97

ÍNDICE 107

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 109

Lista de ilustraciones

Ilustración 1. Aptámeros de ácido nucleico 5

Ilustración 2. SELEX 6

Ilustración 3. Modificaciones Post-SELEX 9

Ilustración 4. Tiol 5´ 10

Ilustración 5. Tiol 3´ 11

Ilustración 6 Relación tamaño/color de las GNPs 13

Ilustración 7. Agregación de GNPs 14

Ilustración 8. Estructura secundaria Sc5-c3 23

Ilustración 9. Sistema Bac-to-Bac. 41

Ilustración 10. Producción de VLPs 42

Ilustración 11. Ensayo de unión 48

Ilustración 13. Slot-Blot 50

Lista de figuras

Figura 1. Biosensor para la detección de HPV16.....55

Figura 2. Inmunodetección de la proteína L1.....56

Figura 3. TEM de las VLPs.....57

Figura 4. las VLPs se agregan en DPBS.....58

Figura 5. HAADF-STEM de las GNPs.....59

Figura 6. Análisis de las GNPs.....60

Figura 7. Distribución de tamaño de GNPs.....60

Figura 8. La versión de DNA de Sc5-c3 no reconoce VLPs.....62

Figura 9. El híbrido Sc5-c3 es capaz de reconocer las VLPs.....63

Figura 10. El híbrido Sc5-c3Δ18 no reconoce a las VLPs.....65

Figura 11. K_d de la interacción Sc5-c3Δ18 con VLPs L1 VPH16.....66

Figura 12. Efecto de la [NaCl] en el reconocimiento por VLPs L1 VPH16.....68

Figura 13. Sc5-c3 C27A no se une a VLPs L1 VPH16.....69

Figura 14. La mutación Sc5-c3Δ18 C25A disminuye la unión por VLPs L1 VPH16 .70

Figura 15. 70 mM de NaCl agrega completamente las GNPs.....71

Figura 16. Las VLPs bloquean la agregación de las GNPs.....72

Figura 17. TEM de complejos GNPs-VLPs.....73

Figura 18. Las GNPs disgregan los complejos de VLPs.....74

Figura 19. Cinética de interacción GNPs/VLPs.....75

Figura 20. La interacción GNPs/VLPs es reversible.....75

Figura 21. Sc5-c3Δ18 protege a las GNPs de la agregación.....76

Figura 22. El aptámero y las GNPs poseen un efecto aditivo.....77

Figura 23. La interacción GNPs-VLPs no es electrostática.....79

Figura 24. La interacción GNPs/VLPs es hidrofóbica 79

Figura 25. TEM GNPs-PEG y VLPs 80

Figura 26. Los PsVs inhiben la agregación de las GNPs 81

Figura 27. Fotografia de la inhibición de GNPs del VPH16 y VPH18 82

Figura 28. Sc5-c3 y predicción estructural de Sc3-c3 C27A 84

Figura 29. Segundo diseño de biosensor 90

Figura 30. Tercer diseño de biosensor 91

Lista de tablas

Tabla 1. ODNs para amplificar L1 33

Tabla 2. ODNs para amplificar Sc5-c3 33

Tabla 3. ODNs moldes mutantes de Sc5-c3.....34

Tabla 4. ODNs Fw para las mutantes de Sc5-c3Δ18 35

Tabla 5. ORNs Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18 modificados químicamente 36

Tabla 6. Tamaños de partícula por lotes de síntesis de GNPs.....61

Resumen

En este trabajo se diseñó un biosensor para el diagnóstico de infecciones productivas del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH16) empleando nanopartículas de oro (GNPs) y los aptámeros de RNA Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18 que poseen una alta especificidad y afinidad por partículas tipo virus (VLPs) del VHP16. Antes de integrar el biosensor, realizamos una caracterización bioquímica profunda de los aptámeros mediante ensayos de unión que determinó que ambos se unen fuertemente a las VLPs. La naturaleza lábil del RNA nos llevó a evaluar modificaciones a Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18 empleando ensayos de unión. La versión de DNA de Sc5-c3 (más estable en biofluídos y más susceptible a modificaciones), no reconoció a las VLPs sugiriendo una función relevante para las ribosas y los uracilos en el reconocimiento de las VLPs. El empleo de un híbrido DNA/RNA que mostró un 80 % de unión a VLPs, confirmó el requerimiento de composición ribonucleotídica en las posiciones en contacto con las VLPs. Sin embargo, el híbrido Sc5-c3Δ18 sólo fue capaz de unirse en un 40 % sugiriendo un mecanismo de reconocimiento distinto a Sc5-c3. Para profundizar en la naturaleza del reconocimiento, se realizó mutagénesis dirigida contra el dominio ML del Sc5-c3 encontrando que la mutante C27A perdió el 90% de la unión, presumiblemente por un cambio estructural. Ya que para el diseño de biosensor propuesto es indispensable que el aptámero Sc5-c3 reconozca a las VLPs en presencia de NaCl, se realizaron ensayos de unión en concentraciones crecientes de NaCl. La concentración máxima de NaCl en la cual Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18 puede llevar acabo efectivamente el reconocimiento de las VLPs fue de 0.2 M.

Los ensayos colorimétricos basados en GNPs son de gran interés para el diagnóstico debido a su simplicidad y bajo costo. Durante el desarrollo del biosensor se encontró una interacción espontánea entre las GNPs y las VLPs, no reportada previamente. Esta interacción ocasionó la inhibición de la agregación inducida por NaCl de las GNPs y separó los agregados de VLPs estabilizándolas

en solución como partículas independientes. Experimentos de competencia sugirieron que la naturaleza de la interacción GNPs y partículas tipo virus (VLPs) no es covalente. La adsorción de Sc5-c3 en la superficie de las GNPs mostró un efecto aditivo en la inhibición de la agregación, sugiriendo que la naturaleza de las interacciones GNPs-VLPs y GNPs-RNA es similar. El uso de VLPs mutantes confirmó que la carga electrostática opuesta de las superficies entre GNPs-VLPs no media su interacción, sugiriendo que fuerzas no-electrostáticas conducen el arreglo entre GNPs-VLPs. Ensayos de competencia empleando concentraciones crecientes de etanol durante la formación de los complejos GNPs-VLPs sugirió que las interacciones hidrofóbicas son la principal fuerza estabilizadora.

Se evaluó si la interacción GNPs-VLPs es exclusiva del VPH16 para lo que se emplearon VLPs del VPH18, confirmando que de igual manera éstas inhiben la agregación de las GNPs. De hecho, es posible observar una diferencia a simple vista en el color de las GNPs con cada tipo viral lo que sugiere el posible desarrollo de una técnica rápida de tipificación fundamentada en este efecto. Como una aproximación para determinar si la interacción se pudiese llevar acabo con viriones de VPH, empleamos pseudovirus (PsVs) en ensayos de agregación y comprobamos que estos también interactúan con las GNPs. Por lo tanto, la interacción entre GNPs-VPH descrita debería facilitar el desarrollo de ensayos de adsorción basados en GNPs para la detección de VPH y la prevención cáncer cervical.

Abstract

In this work a biosensor was designed for the diagnosis of productive infections of human papillomavirus type 16 (HPV16) using gold nanoparticles (GNPs) and the RNA aptamers Sc5-c3 and Sc5-c3Δ18 that have a high specificity and affinity for HPV16 L1 virus-like particles (VLPs). Before integrating the biosensor, we performed a deep biochemical characterization of the aptamers through binding assays that determined that both bind strongly to the VLPs. The labile nature of RNA led us to evaluate chemical modifications to Sc5-c3 and Sc5-c3Δ18 and analyzed those using binding assays. The DNA version of Sc5-c3 (more stable in biofluids and more susceptible to modifications), did not recognize VLPs suggesting a relevant function for ribose and uracils in the recognition of VLPs. The use of a DNA/RNA hybrid showed 80% binding to VLPs, thus confirming the requirement for a ribonucleotide composition within the positions in contact with the VLPs. However, the Sc5-c3Δ18 DNA/RNA was only able to bind by 40% suggesting an alternative binding mechanisms. To deepen the nature of the recognition, site-directed mutagenesis was carried out against the ML domain of Sc5-c3 finding that mutant C27A lost 90% binding, presumably due to profound structural changes within the aptamer structure. Because it is essential for the proposed biosensor design that the Sc5-c3 aptamer recognize VLPs in the presence of NaCl, binding assays were performed at increasing concentrations of NaCl. The maximum concentration of NaCl was established at 0.2 M, in which Sc5-c3 and Sc5-c3Δ18 can effectively sustain VLPs binding.

Colorimetric assays based on GNPs are of great interest for diagnosis due to their simplicity and low cost. During the development of the biosensor, a novel spontaneous interaction was found between the GNPs and the VLPs. This interaction caused the inhibition of the GNPs NaCl-induced aggregation and disaggregated VLPs clusters by stabilizing them into independent particles. Competition experiments suggested that the GNPs-VLPs interaction is non-covalent in nature. Adsorption of Sc5-c3 on GNPs surface showed an additive

effect on inhibition of aggregation, suggesting that the nature of the interactions GNPs-VLPs and GNPs-RNA is similar. The use of mutant VLPs confirmed that the opposite electrostatic charge of the surfaces between GNPs-VLPs does not mediate their interaction, suggesting that non-electrostatic forces drive the arrangement between GNPs-VLPs. Increasing concentrations of ethanol during the formation of GNPs-VLPs complexes suggested that hydrophobic interactions are the main stabilizing force.

The specificity of GNPs-VLPs interaction was evaluated comparing HPV16 VLPs against HPV18 VLPs, showing that both inhibit GNPs aggregation. In fact, it was possible to observe a simple difference in GNPs color with each viral type, suggesting the possible development of a rapid typing technique based on this effect. As an approximation to determine if the interaction could be performed with infective HPV virions, HPV16 pseudoviruses (PsVs) were used in aggregation experiments showing that they also interact with the GNPs. Therefore, the interaction GNPs-HPVs described here should facilitate the development of color-based adsorption assays for the detection of HPV infection and the prevention of cervical cancer.

Capítulo 1

Introducción

"La ciencia es el gran antídoto contra el veneno del entusiasmo y la superstición"

1 Biosensores

La tecnología de los biosensores se originó en 1962 con la primera publicación de Clark and Lyons, quienes construyeron el prototipo de una "pared analítica" capaz de llevar acabo un reporte en tiempo real de la química sanguínea en los pacientes quirúrgicos durante extensos periodos de tiempo. Para esto emplearon sistemas de detección electroquímica que permitieron monitorear cuantitativamente el pH sanguíneo, la tensión y el contenido de oxígeno y dióxido de carbono (Clark and Lyons, 1962).

Después de 55 años de éste experimento pionero, existe una gran variedad de terminologías y definiciones de biosensores dependiendo del campo de aplicación. El término "biosensor" fue acuñado por Cammann, pero actualmente se ha empleado para describir dos grandes grupos: A) costosos

dispositivos sofisticados y de alto rendimiento, capaces de medir de forma rápida, precisa y conveniente interacciones y componentes biológicos complejos; B) dispositivos producidos en masa, baratos, portátiles y fáciles de usar para análisis descentralizado, *in situ* o doméstico, por no especialistas (Cammann, 1977; Turner, 2013).

Un "biosensor" es un dispositivo analítico integrado por dos elementos, un elemento biológico y un elemento sensor. El elemento biológico interactuará directamente con el analito confiriéndole la especificidad y afinidad al biosensor, por lo cual se seleccionan elementos altamente específicos como aptámeros, enzimas o anticuerpos, que posean una alta afinidad por el o los analitos y una alta especificidad para discriminar al analito blanco en una mezcla compleja de moléculas. El elemento sensor, es el encargado de traducir el reconocimiento del elemento biológico por el analito en una señal cuantificable. Existen varios tipos de elementos sensores, los electroquímicos son los más utilizados ya que miden los cambios sutiles que ocurren cuando el analito interactúa con el elemento de reconocimiento (Luong et al., 2008).

Se han desarrollado biosensores capaces de determinar la concentración de iones, pequeñas moléculas, proteínas, ácidos nucleicos, células, entre otros. Estos han sido empleados en una gran variedad de aplicaciones, destacándose el diagnóstico médico, el aseguramiento de la calidad de los alimentos, el monitoreo ambiental, el control de procesos industriales y la detección de agentes peligrosos como las armas biológicas. Actualmente, el mercado global de los biosensores es de más de $ 13,000 millones de dólares americanos y ha sido dominado por dispositivos de vigilancia de la salud de uso doméstico (por ejemplo, medidores de glucosa y pruebas de embarazo). Éstos dispositivos proporcionan resultados precisos en poco tiempo y a un bajo costo (Hong et al., 2012; Mohanty and Kougianos, 2017).

1.1 Elementos de sensores

Existe una amplia variedad de tipos de sensores electroquímicos, ópticos y gravimétricos. Los sensores ópticos generan señales lumínicas medibles como absorbancia, fluorescencia, quimioluminiscencia, resonancia de plasmones superficiales (para sondear el índice de refracción), o cambios en la reflectividad. Los biosensores ópticos son preferibles para la detección de un gran número de muestras simultáneamente; sin embargo, no pueden ser fácilmente miniaturizados para su inserción en el torrente sanguíneo, pero son los más populares para el bioanálisis, debido a su selectividad y sensibilidad. Recientemente, los métodos basados en fluorescencia y resonancia de plasmón superficial han cobrado impulso debido a su alta sensibilidad (Lazcka et al., 2007).

1.1.1 Nanopartículas de Oro (GNPs)

Las nanopartículas de oro (GNPs) muestran una propiedad en su superficie denominada resonancia de plasmón superficial (SPR), lo que las convierte en herramientas perfectas para actuar como sensores ópticos. El fenómeno físico del plasmón, depende del tamaño y forma de una superficie o una partícula, es explicado como la absorción de la luz en el espectro visible, debida a la fotoexcitación impulsado por la oscilación de electrones en una nanoestructura metálica. Esta propiedad origina que las GNPs presenten un cambio de su característico color rojo cuando se encuentran en suspensión, a un color azul cuando se desencadena su agregación a concentraciones elevadas de NaCl. Esta propiedad ha sido calibrada en respuesta a estímulos externos, lo que ha permitido generar sensores colorimétricos para una variedad de blancos (Cruz and Stoytcheva, 2014; Frómeta, 2005; Smith et al., 2014).

Las GNPs han sido conjugadas con elementos de bio-reconocimiento (como oligonucleótidos de cadena sencilla) y han sido empleadas como bloques para la construcción de materiales a nanoescala, como herramientas para la regulación génica y como biosensores. Wang *et al.* emplearon una

molécula de DNA de cadena sencilla capaz de plegarse en una estructura definida en presencia de iones K^+ y demostraron que en su ausencia, el DNA de cadena sencilla es capaz de inhibir la agregación de las GNPs en presencia de NaCl, demostrando que las nanopartículas son capaces de distinguir DNA estructurado eficientemente (Shwetha et al., 2013).

1.2 Elementos de Bioreconocimiento

La inmovilización de una biomolécula es un paso crucial en el desarrollo de cualquier biosensor, ya que esta molécula proporciona el núcleo del biosensor y le provee su identidad, por esa razón es indispensable que la molécula mantenga su funcionalidad.

Los biosensores emplean tres clases principales de elementos de reconocimiento, enzimas, anticuerpos y ácidos nucleicos. Las enzimas pueden ser usadas para catalizar una reacción que consume o genera una sustancia que es detectada por un electrodo, los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales o recombinantes y regularmente son inmovilizados en un substrato que puede ser la superficie de detección. Los ácidos nucleicos han sido ampliamente utilizados para el desarrollo de biosensores, ya que poseen una alta especificidad para detectar secuencias específicas por hibridación. Además, se han usado ácido nucleicos capaces de reconocer estructuralmente una gran variedad de moléculas, los cuales se denominan aptámeros (Lazcka et al., 2007).

2 Aptámeros

Se denomina como aptámeros a aquellas moléculas obtenidas a través de un proceso de selección in vitro, como resultado se recuperan las moléculas más aptas para el reconocimiento del blanco usado en el proceso (Ellington and Szostak, 1990; Hermann and Patel, 2000). Los aptámeros pueden ser oligonucleótidos u oligopéptidos que sean capaces de plegarse en un estructura tridimensional definida al estar en contacto con la molécula blanco (Ilustración

1), como resultado del proceso de selección se obtienen moléculas altamente especificas (Mayer, 2009). Los aptámeros pueden incorporar pequeñas moléculas en su propia estructura o bien integrarse en la estructura de grandes complejos moleculares. La estructura tridimensional de los aptámeros de ácidos nucleicos (DNA y RNA) es compleja, se caracteriza por la presencia de tallos, bucles, protuberancias, horquillas, pseudonudos, cadenas tríplex o cuádruplex. La interacción aptámero blanco está restringida por su compatibilidad estructural y es estabilizada a través de apilamiento de anillos aromáticos, interacciones electrostáticas y de Van der Waals, puentes de hidrógeno o la combinación de éstas (Araki et al., 1998; Hermann and Patel, 2000; Stoltenburg et al., 2007). Los aptámeros existen en la naturaleza para asegurar una alta especificidad y afinidad por pequeños metabolitos (Barrick and Breaker, 2007; Rentmeister et al., 2007; Winkler et al., 2002).

Ilustración 1. Aptámeros de ácido nucleico
Los ácidos nucleicos de cadenas sencilla se pliegan en una estructura tridimensional que le permite interactuar con un blanco de manera adaptativa.

Los aptámeros de ácidos nucleicos son seleccionados in vitro a partir de una biblioteca combinatoria de oligonucleótidos empleando el método de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990). Brevemente, el método SELEX consiste en una sucesión de cinco pasos.

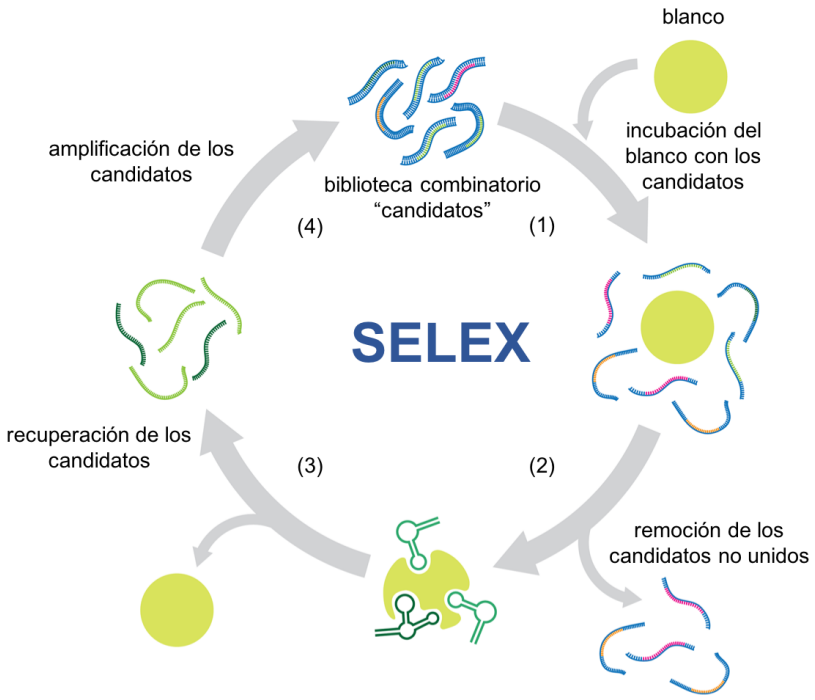

Ilustración 2. SELEX

Una biblioteca combinatoria de oligonucleótidos "candidatos" de cadena sencilla, se pone en contacto con el blanco (1), los candidatos que no posean afinidad por el blanco son removidos (2), los candidatos capaces de plegarse en una estructuras que les confiera especificidad y afinidad por el blanco son recuperados (3), los candidatos seleccionados son amplificados (4), los pasos 1-4 se repiten varias veces y finalmente los candidatos son caracterizados (5)(Proske et al., 2005).

Inicialmente se requiere una biblioteca de oligodeoxinucleótidos de cadena sencilla con una región aleatorizada flanqueada por secuencias fijas que permiten su amplificación por PCR, cada secuencia es un "candidato". Para aptámeros de RNA, la biblioteca de DNA debe ser amplificada por PCR para producir doble cadena y transcrita a RNA. La biblioteca es sometida a un proceso de selección in vitro en presencia del blanco. Los candidatos que no posean afinidad por el blanco son removidos y los oligonucleótidos cuyo plegamiento les permita interactuar con el blanco son recuperados y amplificadas por PCR (o RT-PCR y transcritas in vitro para las bibliotecas de RNA). El proceso es repetido varias veces (usualmente de 4-20 "rondas de selección") y en cada ronda se establece una mayor presión selectiva de tal manera que la astringencia de la sección se incrementa, enriqueciendo y aumentando la

especificidad y afinidad de los aptámeros. Al concluir el proceso de selección, los mejores aptámeros son amplificados mayoritariamente. Finalmente, los aptámeros son clonados, secuenciados y caracterizados (Ilustración 2).

Los aptámeros son altamente específicos y sensibles, pueden ser aislados contra blancos grandes y pequeños, incluso contra blancos tóxicos ya que su selección y producción no emplea organismos vivos. Su síntesis química es automatizada lo que permite una rápida y reproducible producción masiva. La principal limitación para el uso práctico de aptámeros de DNA y RNA es la susceptibilidad a nucleasas, debido a que los ácidos nucleicos son sustratos naturales lo que resulta en un factor crítico para su aplicación *ex vivo* e *in vivo* (Jhaveri et al., 2000; Tombelli et al., 2005). Se ha demostrado que la incorporación de bases modificadas químicamente a los aptámeros mejora drásticamente su estabilidad permitiendo su uso con biofluídos (Jhaveri et al., 2000). Varias metodologías han involucrado nucleótidos modificados compatibles con los procesos enzimáticos del método SELEX, aumentando la diversidad química y las propiedades biológicas de la biblioteca de ácidos nucleicos (Mayer, 2009).

Los aptámeros poseen la capacidad universal de adoptar dos organizaciones estructurales con otras moléculas: una estructura dúplex con una cadena complementaria y una estructura compleja con su molécula blanco. Al proceso que involucra el cambio de un dúplex a una estructura tridimensional definida con afinidad por un blanco específico se le denomina *switching*. El *switching* ha sido ampliamente explotado para la selección de aptámeros auto-reporteros (Nutiu and Li, 2005).

En comparación a los anticuerpos los aptámeros presentan numerosas ventajas. La principal es que no requieren el uso de animales para su producción. La mayoría de los procesos de producción de anticuerpos inician en sistemas biológicos induciendo una respuesta inmune contra la molécula blanco. Esto presenta grandes desventajas, por ejemplo, la generación de anticuerpos in vivo restringe la identificación del blanco sólo a condiciones fisiológicas. Otro ejemplo es cuando se desea obtener un anticuerpo de una proteína blanco con una

estructura muy similar a proteínas endógenas o cuando el antígeno es un compuesto tóxico (Tombelli et al., 2005). Por el contrario, los aptámeros como moléculas de reconocimiento para proteínas, son excelentes alternativas a los anticuerpos por su fácil producción *in vitro*, amplia gama de moléculas blanco, amplio rango de condiciones de reconocimiento, fácil modificación, desnaturalización térmica reversible y su ilimitada vida de anaquel (Famulok et al., 2007; Peng et al., 2009; Tombelli et al., 2005). Así, importantes esfuerzos se están dirigiendo hacia la aplicación de aptámeros para el diseño de biosensores (Willner and Zayats, 2007). Un gran número de aptámeros de DNA han sido aislados con una alta especificidad para el reconocimiento de pequeñas moléculas, proteínas e incluso complejos ensambles moleculares como células completas (Lubomir et al., 2013; Sun et al., 2010).

2.1 Modificaciones Post-SELEX

Los aptámeros son capaces de adoptar una estructura tridimensional que les permite reconocer específicamente un blanco. Ésta estructura es el resultado del proceso SELEX y determina su función, por lo cual al realizar modificaciones post-SELEX es indispensable ejercer precauciones para mantenerla. Debido a la vaga información estructural disponible sobre las modificaciones y a la carencia de sistemas bioinformáticos que permitan predecir con alta eficiencia la estructura que adoptan los aptámeros al unirse a sus blancos y los efectos de las modificaciones en la función de la molécula, modificar aptámeros post-SELEX es aún tarea de prueba y error.

Los aptámeros han sido sometidos a una variedad de modificaciones tanto enzimáticas como químicas para proveerles características apropiadas para diversas aplicaciones. Por ejemplo, para determinar su localización in vivo o para aumentar su resistencia a nucleasas. Existen una gran variedad de nucleótidos modificados que pueden ser incorporadas a la molécula de ácido nucleico. Estas modificaciones se pueden llevar acabo: en la pentosa, en el grupo de fosfatos y

sobre la base nitrogenada. Dada la gran variedad de modificaciones existentes sólo se mencionarán las modificaciones más importantes (Ilustración 3).

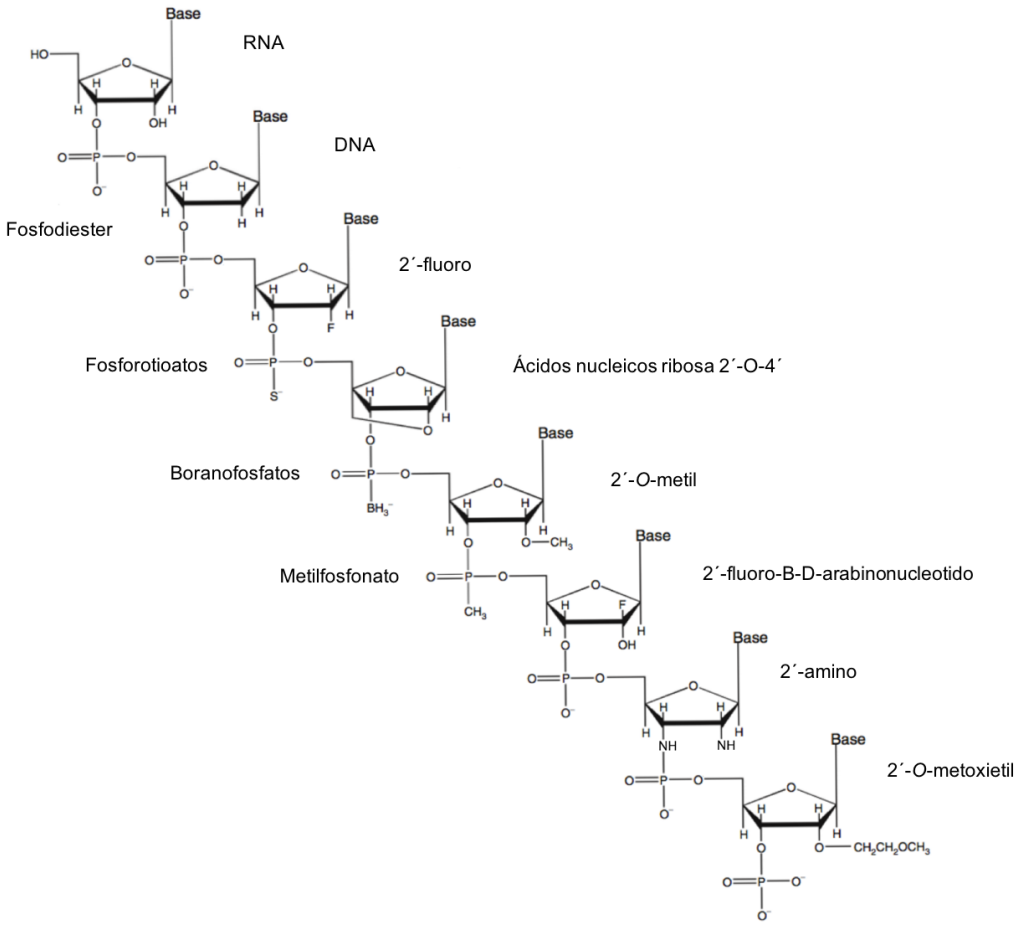

Ilustración 3. Modificaciones Post-SELEX

Modificaciones comunes al grupo fosfato y el azúcar utilizadas en oligonucleótidos. Representación esquemática de un polinucleótido con diversas modificaciones (Behlke, 2008).

Un dúplex de RNA adopta la forma de una hélice de tipo "A" más estable que la hélice tipo "B" del DNA, debido a que cada base interactúa más fuertemente con las bases vecinas de la misma cadena y a diferencia de los dúplex de DNA los dúplex de RNA permiten una compleja estructura secundaria y terciaria. El grupo 2´-OH le confiere importantes cualidades a la molécula de RNA, dentro de las cuales se encuentra una mayor temperatura de fusión debido a las interacciones a través de puentes de hidrógeno que éste puede formar.

Gracias a esta capacidad y a la plasticidad intrínseca de la cadena sencilla, el RNA puede plegarse, reconocer e interactuar con otras moléculas como las proteínas.

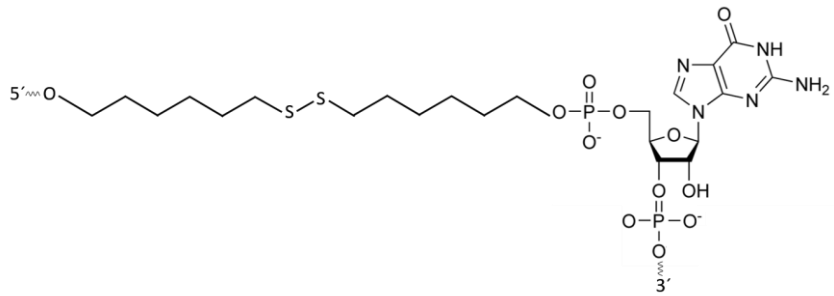

Ilustración 4. Tiol 5´
Oligonucleótido modificado en el extremo 5´ con un grupo tiol (-SH).

Dentro de las modificaciones al RNA, las que se realizan en la molécula de azúcar específicamente en el grupo 2´-OH de la ribosa son las más recurrentes (por ejemplo 2'-fluoro, 2'-amino, 2'-O-metilo, 2'-metoxietil, etc.). Este grupo exhibe una marcada susceptibilidad a degradación, debido a que los fosfatos que forman el esqueleto atacan el grupo 2´-OH de la ribosa adyacente por ser electrófilos, generando un intermediario cíclico que provoca la ruptura del enlace fosfodiéster (Behlke, 2008; Keefe and Cload, 2008). De esta forma la modificación más obvia es la supresión del grupo 2´-OH, cambiando el azúcar de ribosa a desoxirribosa generando una molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) estable a pH moderado y temperatura. A pesar de las diferencias estructurales entre DNA y RNA, Li *et al.* aislaron un aptámero de DNA (PS2.M) capaz de reconocer con alta especificidad y afinidad a hemina. Travascio *et al.* compararon la versión de DNA (KD 0.27 ± 0.002 μM) contra la de RNA (KD 0.9 ± 0.2 μM) y demostraron que la versión de DNA presenta una mayor afinidad por la molécula blanco (Li and Sen, 1996; Travascio et al., 1999).

Modificaciones en el enlace fosfodiéster también han sido usadas para estabilizar oligonucleótidos en biofluídos. Entre éstas destacan los fósforotioatos, metilfosfonatos, morfolinos y fosforamidatos que inhiben la actividad de nucleasas. Una clase distinta de modificaciones son los ácidos nucleicos ribosa

2´-O-4´ (LNAs o *Locked Nucleic Acids*). Estos ácidos nucleicos contienen un metileno formando un puente que conecta el 2´-O con el 4´-C de la ribosa boqueando al azúcar en una posición 3´-endo, que brinda resistencia a nucleasas e incrementan la temperatura de fusión (Tm) del oligonucleótido de 3-11 °C por residuo, resultado en la formación de un dúplex más estable (Travascio et al., 1999).

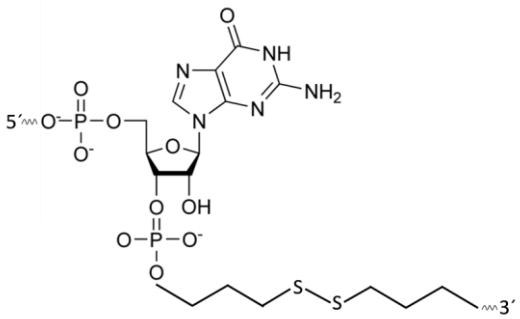

Ilustración 5. Tiol 3´
Oligonucleótido modificado en el extremo 3´ con un grupo tiol (-SH).

Una modificación muy importante en el área de los biosensores y las nanopartículas de oro (GNPs) es la adición de grupos tiol en cualquiera de los extremos (Ilustración 4 e Ilustración 5). Esta modificación permite el anclaje del oligonucleótido en la superficie de la GNPs. Al igual que las anteriores modificaciones la incorporación del grupo tiol en cualquier molécula (DNA o RNA) puede cambiar su estructura tridimensional. Éste fenómeno es de suma importancia cuando la función de la molécula está determinada por su estructura como en el caso de los aptámero. De esta forma, es indispensable analizar si el reconocimiento del blanco por el aptámero se ve afectado por la incorporación de modificaciones químicas en la molécula. Las bases modificadas se agregan durante la síntesis química y dado que el grupo tiol es muy reactivo, este grupo se sintetiza como un puente disulfuro que posteriormente debe ser reducido para exponer el grupo tiol libre.

3 Nanopartículas de Oro

En los últimos años, las nanopartículas metálicas (MNPs) tales como las nanopartículas de oro (GNPs) y nanopartículas plata (SNPs) se ha convertido en un poderoso aliado para la detección de moléculas con alta sensibilidad, especificidad y exactitud. Las MNPs han sido durante mucho tiempo la elección popular para aplicaciones de detección de superficie de plasmón debido a su banda de absorción visible, métodos fáciles de síntesis, estabilidad a largo plazo, compatibilidad biológica, alto grado de control sobre la forma y el tamaño, y una fácil funcionalización con una amplia gama de biomoléculas (Deng and Goldys, 2014). Las nanopartículas metálicas poseen un rango de tamaño entre 1 y 100 nm y muestran propiedades fisicoquímicas distintivas dependiendo del tamaño y forma (Ilustración 6).

Las nanopartículas plasmónicas (GNPs y SNPs) actúan como transductores que convierten el cambio en el índice de refracción local en cambios espectrales de la banda de resonancia de plasmón superficial localizado. GNPs y SNPs han sido incorporadas en sensores ópticos libres de marcaje ultra sensibles de bajo volumen. A menudo las GNPs son preferidas sobre las SNPs debido a que su superficie es más resistente a oxidación en biofluídos y en condiciones de laboratorio, además las GNPs exhiben un ancho de línea de plasmón más amplio que las SNPs (Szunerits and Boukherroub, 2012). Las GNPs sintetizadas por reducción con citrato son estabilizadas en solución por el mismo ion. El citrato recubre a las GNPs y les confiere una carga negativa, esta carga es responsable de la repulsión partícula-partícula que mantiene estable la suspensión de GNPs. Cuando las GNPs se colocan en una solución de NaCl, la suspensión de GNPs se desestabiliza conduciendo a la formación de agregados de GNPs conllevando a un cambio de color visible de rojo a azul proporcional a su agregación (Ilustración 7). Las GNPs son lo suficientemente pequeñas como para ingresar a casi todas las áreas del cuerpo incluidas las células y los orgánulos, lo que potencialmente conduce a un nuevo enfoque de la medicina (Nano-Medicina).

Ilustración 6 Relación tamaño/color de las GNPs
La suspensión de GNPs presenta un color diferente dependiendo del tamaño(Tomado de NanoComposix).

Cuando las nanopartículas entran en un fluido biológico, se recubren rápidamente con proteínas y lípidos que pueden conferir efectos biológicos no deseados debido a que pueden adoptar una conformación alterada biológicamente activa, o la exposición de nuevos epítopos, una función perturbada (debido a efectos estructurales o alta concentración local) y/o a los efectos de avidez derivados de la repetición espacial de la misma proteína. Al recubrimiento proteico de las MNPs se le ha denominado "corona". Existen dos tipos de coronas: la corona de larga duración "dura" o las de corta duración "suaves". Las coronas duras actúan como un recubrimiento estabilizante y duradero de la superficie desnuda de nanopartículas y puede reflejarse en diferentes subpoblaciones de ensamblajes de partículas, cada uno de los cuales presenta un recubrimiento proteico duradero (Cedervall et al., 2007).

El contexto biológico y fisiológico de la corona definirá la identidad biológica de la nanopartícula. Una comprensión profunda de los efectos biológicos de las nanopartículas requiere conocer el equilibrio y las propiedades de la cinética de unión de las proteínas (y otras moléculas) que se asocian con las nanopartículas. Además, en términos de la respuesta biológica, las proteínas más abundantemente asociadas no tienen necesariamente el efecto más profundo. Una proteína menos abundante con alta afinidad y especificidad para

un receptor particular puede ser un jugador clave. Por lo tanto, es esencial desarrollar métodos para distinguir a las proteínas fuertemente asociadas a las nanopartículas de las débilmente asociadas y estudiar la competencia entre ellas cuando el sistema está bajo control cinético o termodinámico. Sin embargo, a pesar de ser una tarea difícil, el aislamiento e identificación de proteínas asociadas a nanopartículas, es un prerrequisito fundamental para la nanobiología, la nanomedicina y la nanotoxicología (Cedervall et al., 2007; Docter et al., 2015).

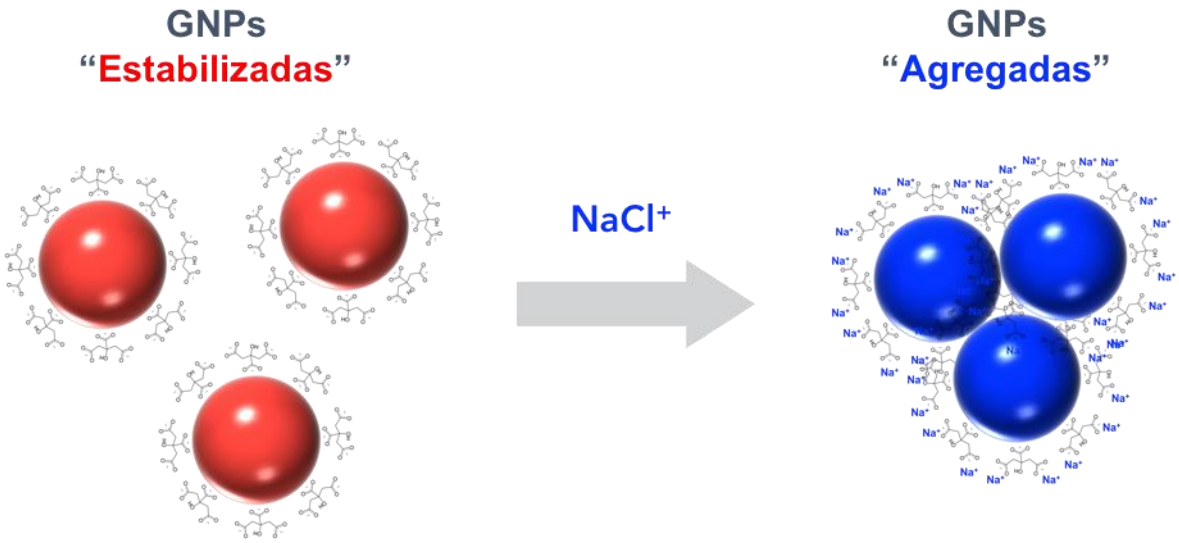

Ilustración 7. Agregación de GNPs
Las GNPs no funcionalizadas se encuentras dispersas en suspensión debido al recubrimiento con citrato. La carga positiva del $NaCl^+$ apantalla la repulsión de cargas entre las GNPs conduciéndolas irreversiblemente a la agregación. La cercanía entre las GNPs desencadena el cambio de color.

3.1 Características de la superficie de nanopartículas de oro

La hidrofobicidad de la superficie de las GNPs es controversial en la literatura. Se ha invertido una gran cantidad de trabajo experimental y algunos trabajos teóricos sobre este problema. Tennyson Smith realizó una búsqueda bibliográfica sobre reportes del carácter de la superficie de oro, encontrando 18 referencias que caracterizaron la superficie del oro como hidrofóbica y 8 como hidrofílica. Además los trabajos teóricos coinciden en el carácter hidrofóbico

excepto por uno. Como regla, los trabajos que coinciden en que la superficie "limpia" de oro es hidrofílica sugieren que la conclusión opuesta resulta de la contaminación hidrofóbica y viceversa. Tennyson Smith midió el ángulo de contacto de superficies de oro limpias a nivel atómico y encontró que es de carácter hidrofílico, pero concluyo que incluso una pequeña monocapa parcial de contaminación carbonosa la volverá hidrofóbica (Smith, 1980).

Recientemente, Ahmed *et al.*, describieron que las GNPs se depositan preferentemente en sustratos con características superficiales similares, demostrando que las GNPs no funcionalizadas se depositan preferentemente en superficies con recubrimientos hidrofóbicos. Las interacciones hidrodinámicas entre las GNPs y el sustrato inducen fuerzas atractivas de larga distancia entre superficies cargadas idénticamente, de tal manera que en superficies hidrofóbicas las moléculas de agua en contacto serán desplazadas hacia el ambiente circundante reduciendo la energía libre total del sistema, resultando en una interacción termodinámicamente favorable entre las partes hidrofóbicas (Ahmed et al., 2017).

4 Virus del papiloma humano (VPH).

Los VPH pertenecen a la familia *papillomaviridae*, que infecta a animales desde aves hasta mamíferos, incluyendo al humano y cada uno es específico para su respectivo hospedero. Los VPH infectan exclusivamente a queratinocitos humanos en la capa basal de epitelio escamoso estratificado, en el núcleo de los cuales se replica y ensambla. La diferenciación de los queratinocitos controla la expresión de los genes virales, los mecanismos por los cuales se lleva a cabo esta regulación aun no son comprendidos completamente (de Sanjosé et al., 2017). Los VPH genitales son clasificados en dos grupos: bajo riesgo, los cuales causan verrugas ano-genitales benignas (tipos 6 y 11) y los de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 35 y 45), asociados causalmente al desarrollo de cáncer cérvico-uterino. La infección con VPH genital de alto riesgo se considerada el mayor factor de riesgo en el desarrollo de cáncer cervical (Moody and Laimins, 2010;

Stanley et al., 2007). Dentro del grupo de alto riesgo el VPH16 es responsable por más del 50% de la incidencia de cáncer cérvico-uterino en el mundo (Finnen et al., 2003).

4.1 VPH16

Los viriones de VPH16 poseen un genoma de DNA de doble cadena (dsDNA) circular de aproximadamente 8 kb con una región reguladora de cerca de 1000 pb conocida como región larga de control (LCR) que no codifica para ninguna proteína pero contiene elementos en *cis* requeridos para la regulación de la expresión génica, replicación del genoma y su empaquetamiento (Muñoz et al., 2006). Dentro del genoma se encuentran codificadas seis proteínas tempranas (E) reguladoras no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) expresadas por queratinocitos no diferenciados o tempranamente diferenciados. Estas proteínas están involucradas en la replicación viral y el proceso de trasformación celular. E1 y E2 están involucradas en la replicación viral y la regulación de la trascripción temprana (Cripe et al., 1987; Mohr et al., 1990; Zheng and Baker, 2006). La proteína E4 continúa siendo expresada por los queratinocitos diferenciados terminalmente. E4 es expresada en infecciones productivas asociadas con el colapso de filamentos de citoqueratina (Bryan and Brown, 2000; Conway et al., 2009). Las proteínas E5, E6 y E7 son oncogenes virales y su expresión induce la inmortalización y transformación celular. En particular E6 y E7 son dos oncoproteínas virales que inactivan p53 y pRb respectivamente (Androphy et al., 1987; Bedell et al., 1991; Phelps et al., 1988). También codifica para dos proteínas tardías (L) estructurales que forman la cápside viral (L1 y L2), las cuales son expresadas por queratinocitos diferenciados terminalmente (Buck et al., 2008; Chen et al., 2000; Favre et al., 1975; Middleton et al., 2003; Zhou et al., 1991).

El ciclo de vida de la infección por VPH consiste en dos fases. La primera es una fase productiva para el establecimiento de la infección. En esta fase, VPH infecta a las células de la capa basal, manteniendo de 50-100 genomas virales por célula (McMurray et al., 2001). Después de la infección de la capa basal de

queratinocitos, los genes tempranos E1, E2, E5, E6, y E7 son expresados y el DNA viral es replicado (Middleton et al., 2003). En la segunda fase (fase tardía) las proteínas L1 y L2 encapsulan el genoma viral que se replica activamente (>1000 copias por células) en los estratos superiores del epitelio, para formar la progenie viral en el núcleo (Middleton et al., 2003). Estos viriones relevan al virus inicial, con lo cual reinicia la infección. Sin embargo, la fase productiva sólo se refiere a la infección con VPH donde existe la expresión de la proteína L1 (Yoshida et al., 2008).

4.2 Proteína L1 VPH16

Los viriones de VPH son de un tamaño de ~55 nm de diámetro (Kirnbauer et al., 1993). La cápside del VPH está compuesta por dos proteínas estructurales L1, la proteína principal de la cápside que propiamente constituye la mayor parte de la estructura del virus y la proteína menor L2, la cual se incorpora dentro de la cápside en una proporción L1:L2 30:1 (Chen et al., 2000). La proteína L1 se compone de 531 aminoácidos y se encuentra codificada de los nucleótidos 5560 al 7155, siendo el gen más conservado dentro de los genomas de los VPHs y por lo cual es utilizado para la identificación y clasificación de nuevos tipos de VPH. Se ha establecido que una diferencia menor a 2% se considera una variante, 2% a 10% es definido como un subtipo, más del 10% se considera un nuevo tipo, cuando comparten del 71% al 89% se consideran de la misma especie y entre 60% y 70% se considera del mismo género (de Villiers et al., 2004; Kirnbauer et al., 1993).

Los viriones contienen alrededor de 360 copias de la proteína L1 (Baker et al., 1991), que se auto-ensamblan en 72 pentámeros o capsómeros con una estructura icosahédrica. La interacción no covalente entre L1 y L2 presenta regiones de contacto tanto dependientes como independientes de la concentración de sales (Finnen et al., 2003). La interacción de L1 y L2 es indispensable para la encapsulación del genoma viral ya que L2 se encuentra asociada a los vértices del capsómero de L1 y es la proteína encargada de

introducir el DNA a las partículas virales en el núcleo (Doorbar, 2006). L2 es translocada independientemente al núcleo, L1 forma capsómeros en el citoplasma los cuales son translocados al núcleo donde L2 y los capsómeros de L1 se ensamblan para originar las cápsides virales (Florin et al., 2002).

El dominio de interacción de L2 ha sido localizado por mutagénesis dirigida identificando a los residuos 396-439 de la región carboxilo terminal como críticos para la interacción de L1-L2 permitiendo la incorporación de la proteína L2 en la cápside viral. El cambio de C a G en la posición 6240 del VPH16, tiene como resultado un cambio no conservativo de histidina a aspartato en el aminoácido 202, originando un ineficiente auto-ensamble de las partículas virales, demostrando que este aminoácido es crítico para el ensamblaje de las VLPs, plegamiento de la proteínas y la interacción proteína-proteína (Kirnbauer et al., 1993).

L1 es capaz de auto ensamblarse espontáneamente para formar partículas virales vacías (VLPs) que son morfológicamente similares e inmunológicamente indistinguibles de los viriones nativos. Las VLPs de VPH están formadas por la proteína L1 y pueden contener o no a la proteína L2. Las VLPs son capaces de inducir una alto título de suero neutralizante que puede prevenir la infección de VPH tanto *in vitro* como *in vivo* (Kirnbauer et al., 1992). Las VLPs han sido utilizadas para la generación de una vacuna profiláctica nonavalente capaz de prevenir la infección de VPH6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58, por un periodo mayor a 5 años después de la administración, representando un medio efectivo para reducir la incidencia no sólo del cáncer cervical y la displasia cervical sino también de neoplasias genitales y verrugas. Sin embargo el costo y la necesidad de refrigeración de las vacunas incapacitan su uso en zonas aisladas y de escasos recursos (Alphs et al., 2008; Frazer, 2007).

El mejor modelo de laboratorio para recrear el proceso de infección en el laboratorio son los pseudovirus (PsVs). Los PsVs están constituidos por las proteínas L1 y L2 que se ensamblan e incorporan un pseudogenoma que codifica para un gen reportero. Los PsVs permiten identificar a las células infectadas por la

expresión del gen reportero, regularmente una proteína fluorescente (Buck et al., 2003; Buck and Thompson, 2001). Este modelo ha sido de gran utilidad ya que ha permitido mapear los residuos de la proteína L1 necesarios para su entrada a la célula. Mediante mutagénesis sitio dirigida se produjeron PsVs mutados en las lisinas 278 y 361, lo que redujo fuertemente (>90%) la unión a la matriz extracelular (ECM) y a la membrana celular, por lo que las mutantes no lograron infectar eficientemente (Dasgupta et al., 2011).

Capítulo 2

Antecedentes

"Equipado con sus cinco sentidos, el
Hombre explora el Universo que lo rodea
y a sus aventuras las llama Ciencia"

–Edwin Powell Hubble

El uso de oligonucleótidos para el diagnóstico y terapia del cáncer cérvico-uterino ha sido ampliamente documentado en la literatura (Benítez-Hess et al., 2011; Leija-Montoya et al., 2014). El grupo del Dr. Luis Marat Alvarez Salas, reportó la deoxiribozima Dz1023-434 la cual exhibe una eficiente procesamiento del RNA mensajero policistrónico E6/E7 y demostró que la modificación de esta (Dz434-LNA) produce una fuerte disminución del RNA mensajero policistrónico E6/E7 en células positivas para VPH16 que se traduce en un decremento en la proliferación y un aumento en la muerte celular dependiente de dosis(Reyes-Gutiérrez and Alvarez-Salas, 2009). El mismo grupo aisló y caracterizó un aptámero de RNA (G5a3N.4) contra la proteína E7 del VPH16 con el potencial para ser utilizado en la detección de la infección por VPH y cáncer cérvico-uterino, proponiendo un

mecanismo de pinza en dos pasos, inicialmente una porción del aptámero se une con baja afinidad al dominio amino terminal de la proteína E7 y una vez anclado, un segundo dominio del aptámero se une al dominio CR3 adquiriendo su estructura final (Toscano-Garibay et al., 2011). De manera independiente, Nicol y colaboradores aislaron una serie de aptámeros de RNA contra la proteína de E7 del VPH16 (serie A: A1, A2 y A3), con valores de K_d de 87, 107 y 251 nM respectivamente. Los miembros de la serie diferían en 2 nucleótidos, pero sólo A2 fue capaz de interrumpir la interacción del complejo E7-pRb. Las diferencias observadas en el reconocimiento de la serie A no pueden atribuirse solamente a las variación en la afinidad, ya que A1 y A2 se unen similarmente a E7 pero sólo A2 inhibe la interacción con pRb, lo cual es atribuible a diferencias en la estructura terciaria afectando la capacidad de unión de E7 y pRb (Nicol et al., 2011).

Graham y Zarbl utilizaron una variante del método SELEX para seleccionar aptámeros de DNA con una alta especificidad y afinidad por células no tumorigénicas y células revertidas de cáncer cervical infectadas con VPH18, demostrando que los aptámeros reconocen los cambios en las macromoléculas de la superficie celular que distinguen a las células no-tumorigénicas de las tumorigénicas infectadas por el VPH18, enfatizando su utilidad en pruebas diagnósticas (Graham and Zarbl, 2012).

Durante mi tesis de maestría en el grupo del Dr. Luis Marat Alvarez Salas, trabaje en el aislamiento de una aptazima de DNA contra L1 del VPH16. Una aptazima es una molécula en la cual se fusionan un aptámero de DNA y una DNAzima de tal manera que la DNAzima solo puede ser activada cuando el aptámero reconoce a su molécula blanco. Las aptazimas han atraído la atención de disciplinas como la biotecnología y diagnóstico, debido a su utilidad para la detección de sus blancos. Desafortunadamente la laboriosa metodología de aislamiento combinada con limitaciones tecnológicas imposibilitó el aislamiento de la aptazima (Palomino-Vizcaino, 2013).

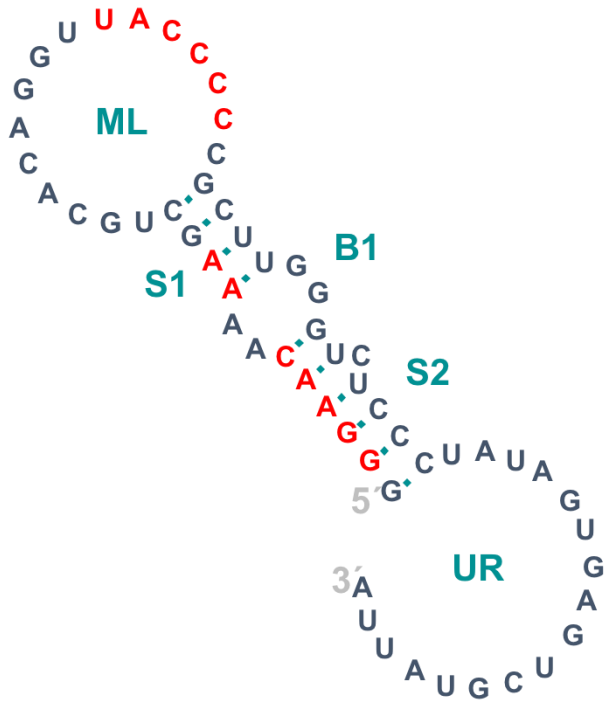

Ilustración 8. Estructura secundaria Sc5-c3

Estructura secundaria de Sc5-c3. Representación esquemática de la estructura secundaria de Sc5-c3, se indican los dominios identificados como (ML) loop o lazo mayor, (B1) burbuja 1, (S1) tallo 1, (S2) tallo 2 y (UR) región no estructurada. Se marcan en rojo las bases que se encuentran en contacto con las VLPs.

Como antecedente directo al presente trabajo, la Dra. Leija Montoya aisló y caracterizo un aptámero de RNA contra partículas tipo virus (VLPs) del VPH16 constituidas únicamente por la proteína L1 producidas empleando baculovirus recombinantes. El aptámero se denominó Sc5-c3 y mostró una elevada afinidad y especificidad por las VLPs (K_d 0.05 pM) con una unión residual a proteínas control. La estructura secundaria de Sc5-c3 en solución fue mapeada con RNasas y realizando ensayos de protección a ribonucleasas, se establecieron los nucleótidos que se encuentran en contacto con la VLP (Ilustración 8). Realizando deleciones progresivas de Sc5-c3 se encontró la secuencia del aptámero mínimo (Sc5-c3Δ18), que fue capaz de reconocer a las VLPs en una mezcla compleja de proteínas vaginales murinas, demostrando que este aptámero es específico para la detección de VLPs y posee el potencial para ser utilizados como un agente preventivo o para el diagnóstico de la infección productiva por VPH16 (Leija-Montoya et al., 2014).

Jampasa *et al.* desarrollaron un biosensor electroquímico para la detección de VPH16, basado en la inmovilización de una sonda de ácido nucleico péptido pirrolidilinico marcado con antraquinona. Esta sonda de 14 bases se diseñó para reconocer una región específica del gen de L1 de VPH16. La sonda fue inmovilizada en un electrodo de carbón impreso sobre una pantalla desechable de quitosan modificado. El dispositivo exhibió un límite de detección de 4-14 nM y fue exitosamente empleado para detectar DNA VPH16 de una reacción de PCR (fragmento de L1 240 bs) de una línea de cáncer cervical humano positiva para VPH16 (SiHa) (Jampasa et al., 2014). Recientemente esta sonda también se incorporó sobre un electrodo imprimible sobre papel de grafeno-polianilina, bajo condiciones óptimas mostró un límite de detección de 2.3 nM (Jampasa et al., 2016). El uso de GNPs para la detección de cápsides o viriones infectivos de VPH no se reporta en la literatura. Sin embargo, se sabe que GNPs no funcionalizadas no interactúan directamente con las cápsides proteicas de otros virus como echovirus 1, coxsackievirus B3 y virus de la estomatitis vesicular (Marjomaki et al., 2014; Vonnemann et al., 2014), lo que sugiere que las GNPs podrían ser utilizadas como elementos transductores en la integración de biosensores para VPH.

Capítulo 3

Justificación

"La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso"
–Louis Pasteur

Debido a la alta incidencia de cáncer cérvico-uterino en México y el mundo, se debe considerar prioritario el desarrollo de nuevos, sensibles, prácticos y económicos sistemas de detección temprana de la infección del VPH de alto riesgo, que permitan prevenir la aparición de cáncer cérvico-uterino en el país y el mundo.

Debemos considerar prioritario el desarrollo de tecnologías que consideren la conciencia social del país, dado que el 60 % de los nuevos casos de cáncer cérvico-uterino se detectan en etapas tardías. Así, es evidente que el hábito del autocuidado en nuestro país es muy deficiente, ya que las mujeres no acuden a las consultas ginecológicas de rutina (Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, 2017). Por lo cual debemos enfocarnos al desarrollo de dispositivos de auto-diagnóstico, que permeen en el segmento de la población femenina que no acude a las revisiones médicas oportunamente.

Capítulo 4

Hipótesis

El trabajo, la persistencia y la diligencia
son las madres de la buena suerte

-Benjamin Franklin

GNPs serán estabilizadas en una solución de NaCl, por la adsorción de un aptámero específico para VLPs de L1 del VPH16 en su superficie, exhibiendo un color rojo. En presencia de VLPs de L1 de VPH16, el aptámero se unirá específicamente a ellas desencadenando la formación de aglomerados de GNPs y el viraje de color a azul.

Capítulo 5

Objetivos

Cuando eres carpintero y estás haciendo un mueble bonito, no usas un trozo de madera mala para la parte trasera, aunque esté pegada a la pared y nadie la vea. Tú sabes que está ahí. Para dormir bien por la noche, la estética y la calidad,

1. Objetivo general

Generación y caracterización de un biosensor basado en nanopartículas y aptámeros para la detección del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH16).

2. Objetivos específicos

- Diseño de un biosensor para detectar VPH16.
- Producción de VLPs del VPH16 y VPH18.
- Determinación de la Kd para Sc5-c3Δ18.
- Modificar químicamente a Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18.
- Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro (GNPs).
- Integrar un biosensor empleando GNPs y aptámeros.
- Caracterizar el Biosensor.
- Retar el Biosensor con muestras biológicas.

Capítulo 6

Materiales y métodos

"Las cosas buenas pueden llegar a quienes
saben esperar, pero sólo serán
las sobras de quienes han mostrado
iniciativa para conseguirlas"

1 Reactivos biológicos

1.1 Enzimas y otros reactivos biológicos

Para los ensayos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), se utilizó la enzima *Taq* DNA polimerasa (*Invitrogen*). La mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) y los marcadores de peso molecular *GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* se adquirieron de Thermo Fisher Scientific Inc.

Para las reacciones de transcripción *in vitro* (TIV), se empleó la T3 RNA polimerasa (Thermo), y rNTPs (Thermo). Para las reacciones de defosforilación se empleó fosfatasa alcalina (CIAP) (Thermo). Para la incorporación del grupo fosfato en el extremo 5´ se empleó la enzima T4 polinucleótido cinasa (Thermo).

Para evitar la degradación del RNA en los ensayos de unión, se empleó un inhibidor de RNAsas RiboLock (Thermo).

Para realizar los ensayos de inmunodetección se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-L1 dirigido contra la proteína L1 del VPH16 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, sc-57834), anti-GST dirigido contra la proteína glutatión s-transferasa (Santa Cruz, sc-138), anti-ratón-HRP dirigido contra la fracción constante de la IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz, sc-2314) y anti-conejo-HRP dirigido contra la fracción constante de la IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz, sc-2313).

Para llevar a cabo la liberación de la proteína L1 del VPH16 se empleó la proteasa Trombina y como inhibidor de proteasas cOmplete™ (Merck KGaA).

1.2 Células y medios de cultivo

La cepa *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL F^- ompT hsdS(r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/$Spec^r$] (*Stratagene*) se utilizó rutinariamente para la expresión de proteínas recombinantes. La cepa DH10Bac™ (F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ-rpsL nupG/pMON14272/pMON7124) se empleó para la obtención de baculovirus recombinantes.

Las bacterias competentes para la transformación por choque térmico fueron preparadas de acuerdo al protocolo estándar del laboratorio (Sambrook et al., 1989). Las bacterias se cultivaron en medios complejos líquidos o sólidos (1.5 % de agar). Los medios Luria-Bertani (LB) [1 % de triptona, 0.5 % de extracto de levadura y 0.5 % NaCl], SOB [2 % de triptona, 0.5 % de extracto de levadura y 0.05 % NaCl] y SOC [2 % de triptona, 0.5 % de extracto de levadura, 0.05 % NaCl y 20 mM glucosa] se prepararon de acuerdo a las instrucciones estándar de laboratorio (Sambrook et al., 1989).

Tabla 1. ODNs para amplificar L1

Tipo	Nombre	Secuencia
VPH16	**FwL1XhoI**	ATC TCG AGT AAT GAG CCT GTG GC
	RvL1HindIII-EcoRI	CGG CCA TGA ATT CAA AAA GCT TCA CAG CTT CCT CTT
VPH18	**L118FB**	AAG AAT TCA TGG CCC TCT GGA
	L118FBrev	AAA AGC TTT CAT TTG CGT GCC CTC A

Las células SF21 de ovario de *Spodoptera frugiperda* de Invitrogen™ (Thermo) fueron cultivadas en botellas de 25 cm^2 Corning (Corning Inc.) a 26 °C con medio Sf-900™ II SFM (Thermo) con cambio de medio cada tercer día.

1.3 Oligonucleótidos y plásmidos

Tabla 2. ODNs para amplificar Sc5-c3

Tipo	Nombre	Secuencia*
Moldes	**T3GGSc5c3**	**AAT TAA CCC TCA CTA AAG** GGA ACA AAA GCT GCA CAG GTT ACC CCC GCT TGG GTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA
	T3CTSc5c3	**AAT TAA CCC TCA CTA AAG** CTA ACA AAA GCT GCA CAG GTT ACC CCC GCT TGG GTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA
Cebadores	**FwAptlib**	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CCA AGC
	FwD18	GGA GAC CCA AGC GGG GGT AAC CTG
	RvSc5c3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA AAA GCT G

*, se marcan con negrita la secuncia del promotor de la RNApol T3.

Todos los oligoribonucleótidos (ORN) y oligodeoxinucleótidos (ODN) usados fueron sintetizados por T4 Oligo® (ADN Sintético SAPI de CV). Para la amplificación de la secuencia de la proteína L1 VPH16 y sus mutantes, se emplearon los cebadores **FwL1XhoI** y **RvL1HindIII-EcoRI**. La secuencia nucleotídica de la proteína L1 del VPH18 fue amplificada de **pSHPV18** (Woodworth et al., 1989), empleando los cebadores **L118FB** y **L118FBrev** (Tabla 1).

Para la producción de los aptámeros se empleó el molde **T3GGSc5c3** y para la producción de la mutante G19C/G20T se empleó el molde **T3CTSc5c3**, se diseñaron 2 cebadores Fw: **FwAptlib** para la amplificación de Sc5-c3 y **FwD18** para Sc5-c3Δ18, pero solo un **RvSc5c3** (Tabla 2) (Leija-Montoya et al., 2014).

Tabla 3. ODNs moldes mutantes de Sc5-c3

Nombre	Secuencia
MC28A-Sc5c3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA AAA GCT GCA CAG GTT ACC CC**A** GCT TGG GTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA
MC27A-Sc5c3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA AAA GCT GCA CAG GTT ACC C**A**C GCT TGG GTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA
MC26A-Sc5c3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA AAA GCT GCA CAG GTT ACC **A**CC GCT TGG GTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA
MC25A-Sc5c3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA AAA GCT GCA CAG GTT AC**A** CCC GCT TGG GTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA
MC24A-Sc5c3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA AAA GCT GCA CAG GTT A**A**C CCC GCT TGG GTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA
MA23U-Sc5c3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA AAA GCT GCA CAG GTT **T**CC CCC GCT TGG GTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TT
MU22A-Sc5c3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA AAA GCT GCA CAG GT**A** ACC CCC GCT TGG GTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA

*, se marcan las posiciones mutadas con negrita.

Para la producción de los aptámeros mutados se diseñaron una serie de secuencias molde mutantes **MC28A-Sc5c3**, **MC27A-Sc5c3**, **MC26A-Sc5c3**, **MC25A-Sc5c3**, **MC24A-Sc5c3**, **MA23U-Sc5c3**, **MU22A-Sc5c3** y se emplearon el mismo par de cebadores para la amplificación de la versión completa del aptámero (Tabla 3).

Para la amplificación de la versión corta mutada del aptámero se emplearon los moldes mutantes antes descritos y el cebador RvSc5c3, pero se diseñó un primer Fw para cada mutante: **MC28A-FwD18**, **MC27A-FwD18**, **MC26A-FwD18**, **MC25A-FwD18**, **MC24A-FwD18**, **MA23U-FwD18** y **MU22A-FwD18** (Tabla 4).

Para comparar el reconocimiento del aptámero se sintetizaron las siguientes moléculas de RNA a menos que se indique lo contrario: **Sc5c3**, **Sc5c3D18**, **Sc5c3 (DNA)**, **ISc5c3**, **ISc5c3D18**, **Sc5c3 (DNA/RNA) y Sc5c3D18 (DNA/RNA)** (Tabla 5). Con el propósito de unir covalentemente el aptámero a la superficie de las nanopartículas, los aptámeros fueron modificados en el extremo 5´ y 3´ adicionando un grupo tiol: **SHSc5c3**, **Sc5c3SH**, **SHSc5c3D18**, **Sc5c3D18SH** (Tabla 5).

Tabla 4. ODNs Fw para las mutantes de Sc5-c3Δ18

Nombre	Secuencia*
MC28A-FwD18	GGA GAC CCA AGC **T**GG GGT AAC CTG
MC27A-FwD18	GGA GAC CCA AGC G**T**G GGT AAC CTG
MC26A-FwD18	GGA GAC CCA AGC GG**T** GGT AAC CTG
MC25A-FwD18	GGA GAC CCA AGC GGG **T**GT AAC CTG
MC24A-FwD18	GGA GAC CCA AGC GGG G**T**T AAC CTG
MA23U-FwD18	GGA GAC CCA AGC GGG GG**A** AAC CTG
MU22A-FwD18	GGA GAC CCA AGC GGG GGT **T**AC CTG

*, se marcan las posiciones mutadas con negrita.

Para la expresión heteróloga de la proteína de fusión glutatión S-transferasa y la proteína verde fluorescente (GST-GFP), se utilizó el vector **pGST-GFP** (Benítez-Hess et al., 2004). Las proteínas GST y L1 se encuentran separadas por una secuencia de reconocimiento para la proteasa trombina, permitiendo escindir a la proteína GFP. La expresión de la proteína se encuentra bajo el control del promotor *tac* que permite obtener altos índices de expresión proteica en el citoplasma bacteriano de manera inducible, conserva el origen de replicación ColE1 que asegura un alto número de copias por célula y como marcador de selección el gen que codifica para la β-lactamasa (*bla*), confiriendo resistencia a antibióticos β-lactámicos.

Tabla 5. ORNs Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18 modificados químicamente

Modificación	Nombre	Secuencia*
Sintéticos	Sc5c3	G GGA ACA AAA GCU GCA CAG GUU ACC CCC GCU UGG GUC UCC CUA UAG UGA GUC GUA UUA
	Sc5c3D18	G GGA ACA AAA GCU GCA CAG GUU ACC CCC GCU UGG GUC UCC
	Sc5c3 (DNA)	G GGA ACA AAA GCT GCA CAG GTT ACC CCC GCT TGG GTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA
Inosina	ISc5c3	G GGA ACA AAA GCU GCA CA**I** I**I**UU ACC CCC GCU UGG GUC UCC CUA UAG UGA GUC GUA UUA
	ISc5c3D18	G GGA ACA AAA GCU GCA CA**I** I**I**UU ACC CCC GCU UGG GUC UCC
Híbrido	Sc5c3 (DNA/RNA)	G **GGA ACA** A**AA** GCU GCA CAG GU**U ACC CC**C GCU UGG GUC UCC CUA UAG UGA GUC GUA UUA
	Sc5c3D18 (DNA/RNA)	G **GGA ACA** A**AA** GCU GCA CAG GU**U ACC CC**C GCU UGG GUC UCC
Tiol	SHSc5c3	**SH**-G GGA ACA AAA GCU GCA CAG GUU ACC CCC GCU UGG GUC UCC CUA UAG UGA GUC GUA UUA
	Sc5c3SH	G GGA ACA AAA GCU GCA CAG GUU ACC CCC GCU UGG GUC UCC CUA UAG UGA GUC GUA UUA-**SH**
	SHSc5c3D18	**SH**-G GGA ACA AAA GCU GCA CAG GUU ACC CCC GCU UGG GUC UCC
	Sc5c3D18SH	G GGA ACA AAA GCU GCA CAG GUU ACC CCC GCU UGG GUC UCC-**SH**

*, se marcan las posiciones modificadas en rojo.

Las mutantes de la proteína L1 del VPH16, **L1m6** (K278A-K361A), **L1m12** (K54A-K278A-K356A-K361A), **L1m24** (N57A-K59A-K278A-K361A-N450A-K452A) y **L1m25** (K54A-N57A-K59A-K278A-K361A-K442A-K443A) fueron donadas por el Dr. Martin Sapp (LSU Health Sciences Center).

2 Reactivos químicos

Los reactivos químicos empleados: $HAuCL_4$ (Ácido tetracloroaurico), Tris (tris-[hidroxietil]-aminometano), SDS (dodecilsulfato de sodio), EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), Amp (Ampicilina), acrilamida (2-propenamida), bis-

acrilamida (N,N´-metilen-bis-acrilamida), DMSO (dimetilsulfóxido), DTT (ditiotreitol), NaCl (cloruro de sodio), NaOH (hidróxido de sodio), $CaCl_2$ (cloruro de calcio), KCl (cloruro de potasio), KH_2PO_4 (fosfato de potasio monobásico), TEMED (N,N,N´,N-tetra-metilen-etilendiamina), IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosido), APS (persulfato de amonio), Na_2HPO_4 (fosfato bibásico de sodio), glicina, cloroformo, *Tween*® 20 (monolaurato de polioxi etilen sorbitan), citrato trisódico, nitrato de plata, bromuro de etidio, ácido bórico, acetato de sodio, azul de xilencianol y azul de bromofenol se adquirieron de la compañía Merck. El ácido acético, metanol, etanol, isopropanol, ácido clorhídrico se adquirieron de la marca Fermont (Productos Químicos Monterrey SA de CV). El glicerol (Thermo), peróxido de hidrogeno (*Química Meyer*), TRIzol® (Thermo), PVDF (polifluoruro de vinilideno) (Merk) y el estuche comercial *Pierce® BCA Protein Assay Kit* (Thermo) fueron adquiridos de diversos proveedores.

3 Equipo

Las reacciones de PCR se montaron en una campana de flujo laminar *CFV-13* (*Industrias Alder*), se llevaron a cabo en un termociclador *2720 Applied Biosystems* (Thermo). Para concentrar las muestras de ácidos nucleicos y proteínas se empleó un Savant™ *Automatic Environmental SpeedVac® System AES1010 With VaporNet®* (Thermo). Para la visualización de los geles de poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio se utilizó un transiluminador *MacroVue UVis-20* (*Hoefer Inc.*) y para su digitalización un sistema Enduro™ GDS (Labnet International. Inc.). La lisis bacteriana se llevó a cabo en un procesador ultrasónico (ColeParmer Instrument Company LLC). Las mediciones de las absorbancias para la cuantificación de proteína se realizaron en el espectrofotómetro *AgileReader* (ACTGene Inc.). Las mediciones de las absorbancias para la cuantificación de ácidos nucleicos se realizaron en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo). La transferencia de proteínas se realizó empleando un sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad

Laboratories, Inc.). Las mediciones de quimioluminiscencia se realizaron en un C-Digit (Li-Cor, Inc.).

Toda la cristalería para la síntesis de nanopartículas fue lavada en agua regia y enjuagada extensamente con agua desionizada (18 MΩ).

4 Expresión de GST-GFP

4.1 Transformación

Para poder expresar la proteína GST-GFP a partir del plásmido pGST-GFP, este se transformó en células químicamente competentes BL21 (DE3). Brevemente, con técnica aséptica se mezclaron de 500 ng del plásmido y 50 µL de células químicamente competentes ($CaCl_2$), esta se incubó por 30 min en hielo, se sometieron a choque térmico por 2 min a 42 °C, seguidos de una incubación por 3 min en hielo. Posteriormente se les adicionó 1 ml de medio SOC y la mezcla se incubo por 45 minutos a 37 °C y 200 rpm. Se centrifugó durante 1 min a 15,000 g, se desecharon 900 µL del sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en los 100 µL restantes. La suspensión fue espatulada en medio LB-Agar Amp [200 µg/ml] y se incubaron durante 16 h A 37 °C. Las transformantes capaces de crecer en presencia de antibiótico se consideraron estables.

4.2 Expresión y purificación de la proteína GFP del VPH16

Inducción. Para inducir la expresión de la proteína GST-GFP transformantes estables BL21(DE3)/pGST-GFP se inocularon en 9 ml de medio LB Ampicilina (Amp) [200 µg/ml], con técnica aséptica, se incubaron por 16 h, 37 °C y 200 rpm. El cultivo fue diluido en 150 ml de LB Amp [50 µg/ml], se incubó por 3 h, 30 °C y 200 rpm. A continuación, se adicionaron 1.5 ml de IPTG 100 mM y se incubo 1 h, 37 °C y 200 rpm. Se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 1000 g durante 15 min, se resuspendió en 800 µL de buffer de lisis para bacterias [NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; AEBSF 0.5 mM; Tris-HCl pH 8 20 mM; inhibidor de proteasas *Complete*™],

inmediatamente se sonicó en lapsos de 30 s por 4 min. El lisado se transfirió a microtubos de 1.5 ml y se centrifugó a 15 000 g durante 5 min para recuperar la fracción soluble. Los lisados fueron cuantificados utilizando el método BCA, utilizando una curva de referencia con BSA a 600 nm.

Purificación y liberación. Para purificar la proteína GST-GFP, la fracción soluble se incubó con perlas de glutatión-agarosa durante 1 h a 4 °C. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante al cual se denominó fracción soluble no unida. Para escindir a la proteína L1 de GST, las perlas de agarosa-glutatión-GST-GFP se lavaron 5 veces con DPBS [KCl 2.67, KH2PO4 1.47, NaCl 137.93 y Na_2HPO_4 8.1 mM] y se resuspendieron en un volumen final de 150 µL al cual se le adicionaron 2 U de trombina, esta mezcla se incubo por 16 h en agitación a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó 1 min a 15 000 g y se recuperó el sobrenadante.

Electrotransferencia. La fracción soluble y la proteína purificada fueron separados mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) y electrotransferidas a una membrana de PVDF como hemos descrito (Palomino-Vizcaino et al., 2018). Brevemente el gel fue equilibrado en el amortiguador de transferencia [192 mM glicina; 10 % (v/v) de metanol; 25 mM Tris-HCl pH 8.3]; la membrana de PVDF fue activada en metanol y se preparó el sistema de transferencia tipo emparedado. Finalmente, se procedió a realizar la transferencia a 1.3 amperios constantes y >25 volts por 21 min en un Trans-Blot® Turbo™.

Inmunodetección. Inmediatamente después de la electrotransferencia, la membrana fue tratada durante 2 h con solución de bloqueo [10 % de leche descremada en polvo *Svelty™ Nestle®*; 0.1 % *Tween®* 20; KCl 2.67 mM; KH_2PO_4 1.47 mM; NaCl 137 mM; Na_2HPO_4-$7H_2O$ 8 mM; pH 7.5]. El reconocimiento primario se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal de conejo anti-GFP (1:2,000) durante 16 h a 4 °C. La membrana se lavó con buffer T-DPBS [0.1% *Tween®* 20; KCl 2.67 mM; KH_2PO_4 1.47 mM; NaCl 137 mM; Na_2HPO_4-$7H_2O$ 8 mM; pH 7.5] durante 30 min (3x, 10 min). El reconocimiento secundario fue realizado un anticuerpo policlonal

de burro anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1:2,000) durante 2 h. La membrana fue lavada con T-DPBS durante 30 min (3x, 10 min). Finalmente, el reconocimiento indirecto fue revelado cubriendo la membrana con la solución de revelado Luminata™ Forte, e inmediatamente se expuso durante 12 minutos en un equipo C-Digit.

5 Producción de partículas tipo virus de L1

5.1 Obtención de baculovirus recombinantes

Se produjeron baculovirus recombinantes mediante el sistema Bac-to-Bac® de Invitrogen™ (Ilustración 9), empleando una serie de construcciones donadas por el Dr. Martin Sapp las cuales contienen la secuencia nativa y varias mutantes (L1m6, L1m12, L1m24 y L1m25) de la proteína L1 del VPH16 (Palomino-Vizcaino et al., 2018).

Las secuencias blanco se amplificaron empleando el juego de oligonucleótidos FwdL1XhoI y RvL1HindIII-EcoRI, los amplicones se clonaron en el vector pFastBac (plásmido donador recombinante) empleando los sitios de restricción XhoI y HindIII. Las construcciones resultantes fueron caracterizadas por la liberación del fragmento correspondiente al gen de L1 mediante.

Para la producción de VLPs formadas por la proteína L1 del VPH18, la secuencia fue amplificada del plásmido pSHPV18 (Woodworth et al., 1989), utilizando el par de cebadores L118FB y L118FBRev, los amplicones se clonaron en el vector pFastBac (plásmido donador recombinante) empleando los sitios de restricción BglII y HindIII. Las construcciones resultantes fueron caracterizadas por la liberación del fragmento correspondiente al gen L1 (Palomino-Vizcaino et al., 2018).

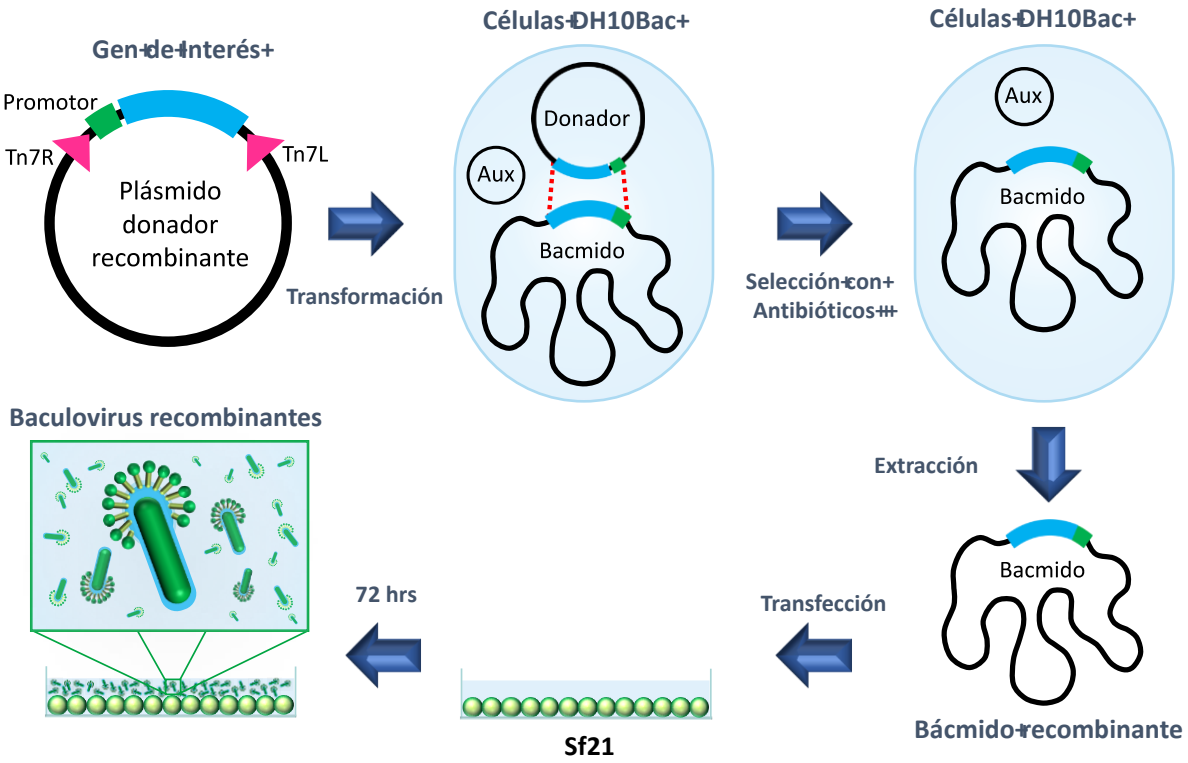

Ilustración 9. Sistema Bac-to-Bac.

El gen de interés fue clonado en el plásmido donador recombinante pFastBac. Se transformaron células DH10Bac con el plásmido y se realizó una extracción del bácmido recombinante para transfectar células Sf21, 72 hrs post-infección los baculovirus recombinantes fueron recuperados en el sobrenadante y usados como stock viral para la producción de VLPs.

Posteriormente las construcciones fueron transformadas en células DH10Bac™, siguiendo las instrucciones del fabricante se obtuvieron baculovirus recombinantes, los cuales serán empleados para la producción de las VLPs, además se emplearon también stocks virales de baculovirus recombinantes que contienen las secuencias que codifican para la proteína L1 y L1/L2 (Leija-Montoya et al., 2014).

5.2 Infección viral, lisis celular y maduración

Los baculovirus recombinantes fueron empleados para infectar una botella 75 cm^2 de células Sf21 al 70 % de confluencia en 14 ml de Sf-900 II SFM, empleando una multiplicidad de infección de una unidad formadora de placa de baculovirus recombinante (Ilustración 10). 72 horas post-infección las células

fueron recuperadas y resuspendidas en 4 volúmenes de buffer de lisis para baculovirus [$MgCl_2$ 9.5 mM y 0.25 % Brij® 58] en DPBS [KCl 2.67 mM; KH_2PO_4 1.47 mM; NaCl 137.93 mM; Na_2HPO_4-$7H_2O$ 8.06 mM pH 7.2-7.7] complementado con el cocktail de inhibidores de proteasas cOmplete™ en microtubos siliconizados. La suspensión de células se lisó por sonicación en un sonicador GEX 130 PB (Cole Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL) a una amplitud de 60 % durante 3 ciclos de 5 segundos. Los lisados totales fueron incubados durante toda la noche a 37 °C para permitir la maduración de las cápsides virales (Buck et al., 2003).

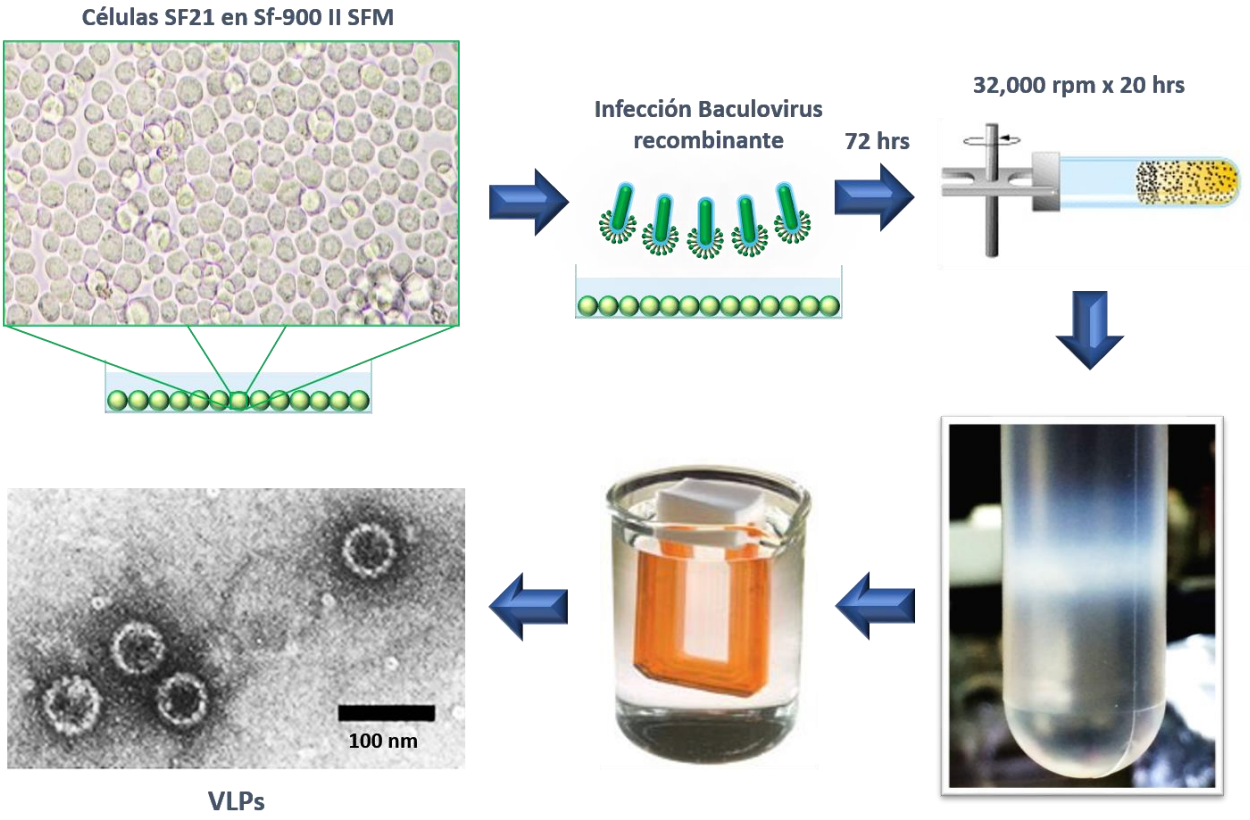

Ilustración 10. Producción de VLPs

Células SF21 fueron infectadas con el baculovirus recombinante. A 72 hrs post-infección las células fueron recuperadas y lisadas. El lisado total clarificado se sometió a una purificación en gradiente de CsCl, las partículas virales fueron recuperadas, dializadas y analizadas por TEM.

Los lisados totales madurados fueron digeridos con la nucleasa de *Serratia marcescens* (Benzonasa) a una concentración final de 0.1 % a 37 °C e inmediatamente enfriados en hielo, se adicionaron 0.17 volúmenes de NaCl 5M y clarificado por centrifugación a 2,000 *g* por 15 minutos (Ilustración 10).

5.3 Purificación de VLPs

El clarificado se colocó sobre una cama de 10 ml de CsCl 27 % peso/peso en un tubo para ultracentrífuga 14 x 89 mm #331372 (Becman-Coulter, Inc.) y fue centrifugado a 175,274 *g* (32,000 rpm), 16 °C por 20 hrs empleando una aceleración máxima y sin freno, en una ultracentrífuga Becman XL-90 (Beckman) con un rotor SW41-Ti (Beckman).

Las VLPs fueron fácilmente inidentificadas como una banda opaca y blanquecina en el gradiente isopícnico. La banda fue recuperada picando el tubo con una jeringa de 3 ml y se dispuso en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer® (10 KDa) #66380 (Thermo). Las VLPs fueron extensamente dializadas contra DPBS a 4 °C en agitación. Después de la diálisis las VLPs fueron recuperadas en un microtubo siliconizados y almacenadas a 4 °C, la concentración de proteína total se determinó empleando el método de BCA (Pierce®). Los diferentes lotes de VLPs fueron analizados por western blot y TEM.

Para el análisis por TEM, se emplearon rejillas de cobre 200 mesh con una membrana de Formvar/carbón, las VLPs se adsorbieron sobre la membrana y fueron teñidas con acetato de uranilo 2%.

5.4 Análisis de los complejos de VLPs

El tamaño de los complejos de VLPs en solución se evaluó empleando DLS, en un Nano-ZS90 (Malvern Instruments Ltd.) con un ángulo de detección de 90° a temperatura constante (25 °C), empleando como material de medición "proteína" (Índice de refracción (RI) 1.450; Absorbancia (Abs) 0.001) y agua como dispersante (Viscosidad 0.8872; RI 1.330). En una celda para DLS (DTS0012) se colocaron 500 ng de VLPs en la cantidad necesaria de agua para llevar la mezcla a 1 ml de volumen total. El tamaño de partículas se recabó durante 10 segundos empleando 15 segundos como tiempo de equilibrio, se graficó el promedio del tamaño de 5 repeticiones de la misma muestra y desviación estándar.

6 Producción de los aptámeros

6.1 Amplificación por PCR

Para producir el aptámero, se montaron reacciones de amplificación (50 μL), empleando un molde de DNA denominado T3GGSc5-c3 (0.25 μM) el cual contiene la secuencia del promotor para la RNA polimerasa del fago T3 seguida de la secuencia del aptámero. Como cebadores se emplearon FwAptLib (0.3 μM) para el aptámero completo, FwD18 (0.3 μM) para el aptámero corto y como cebador reverso RvAptLib (0.3 μM) para ambos. Las mezclas de reacción se incubaron en buffer de PCR [Tris-HCl 200 mM pH8.4, KCl 500 mM] adicionado con $MgCl_2$ 1.5 mM y 1 U de Taq DNA polimerasa en las siguientes condiciones: precalentamiento 5 minutos 94 °C, 20 ciclos compuestos por un paso de desnaturalización a 94 °C por 2 min, un paso de alineamiento a 55 °C por 1 minuto y un paso de extensión a 72 °C por 2 minutos. Se añadió un paso de extensión final a 72 °C por 7 min para completar los fragmentos parcialmente amplificados. Este procedimiento también se empleó para la amplificación de los aptámeros mutados.

6.2 Transcripción *in vitro* (TIV)

La reacción de TIV (60 μL) se realizó empleando como molde el producto de la amplificación de los aptámeros (no purificados). Se colocaron 30 μL de la reacción de PCR incubados en buffer de transcripción [Tris-HCl 200 mM pH 7.9, $MgCl_2$ 30 mM, espermidina 10 mM, NaCl 50 mM] con 0.4 mM de cada rNTPs, 20 U de T3 RNA polimerasa (Thermo) y se incubo a 37 °C 16 horas. Posteriormente el molde de DNA fue removido adicionando 8 U de DNAsa RQ1 (Promega Corporation) y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

6.3 Purificación de TIV

Una vez finalizada la digestión del molde de DNA, se adicionaron 60 µL de buffer stop 2x [Formamida 80 % (v/v), EDTA 10 mM azul de bromo-fenol 0.01 % (p/v) y xylen-cyanol 0.01 % (p/v)] a cada reacción y se calentaron 10 min a mínimo 65 °C, posteriormente se colocaron en hielo durante 10 min, las muestras se sometieron a una electroforesis en poliacrilamida al 8 % [19:1, acrilamida: bis-acrilamida] 250 V durante 45 minutos. El patrón de migración de los fragmentos fue verificado por tinción con bromuro de etidio. La banda correspondiente al producto del aptámero Sc5c3 se localiza justo por debajo del colorante xylen-cyanol, por el contrario, Sc5c3Δ18 se localiza justo por arriba del colorante azul de bromo-fenol. Se cortaron los fragmentos de gel correspondientes y trituraron haciéndolos pasar a través de una jeringa sin aguja de 3 ml, los fragmentos triturados se colocaron en un microtubo y se cubrieron con suficiente buffer de elusión [acetato de amonio 0.5 M, EDTA 1 mM y SDS 0.1 % (p/v)], se agitaron en vórtex y se eluyeron por 16 horas a 4 °C.

Para eliminar los fragmentos de acrilamida del eluido, las muestras se filtraron a través de un filtro de 0.45 µm de acetato de celulosa libre de surfactantes (SFCA). Se le realizo una extracción fenólica al eluido empleando 400 µL de TRIzol y 80 µL de cloroformo y se mezcló por inversión, la mezcla se sometió a centrifugación durante 5 min 15,000 *g*, se recuperó la fase acuosa y se colocó en un nuevo microtubo al cual se le adicionó 1 ml de isopropanol y se incubo a -20 °C por 16 horas.

El aptámero purificado se precipitó mediante una centrifugación a 15,000 *g* durante 60 minutos. El botón de RNA se lavó 3 veces con 1 ml de etanol 75 % seguido de centrifugación durante 15 minutos a 15,000 *g*, el botón de RNA lavado fue resuspendido en 50 µL de agua libre de nucleasas, se cuantifico y visualizó en geles de poliacrilamida para verificar su integridad, se almacenó a -80 °C hasta su uso.

6.4 Producción de aptámeros marcados radiactivamente

6.4.1 Marcados radiactivamente por incorporación

La reacción de TIV (20 µL) se realizó empleando como molde el producto de la amplificación de los aptámeros (no purificados). Se colocaron 2 µL de la reacción de PCR incubados en buffer de transcripción [Tris-HCl 200 mM pH 7.9, $MgCl_2$ 30 mM, espermidina 10 mM, NaCl 50 mM] con 0.4 mM de rGTP, rATP y rCTP, 20 U de T3 RNA polimerasa (Thermo) y se incubó a 37 °C 16 horas. Posteriormente el molde de DNA fue removido adicionando 8 U de DNAsa RQ1 (Promega) y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

6.4.2 Marcados radiactivamente en el extremo 5´

Para llevar a cabo el marcaje terminal (extremo 5´) fue necesario seguir el procedimiento antes descrito para la producción del aptámero en la seccion 6.3. 500 ng del aptámero purificado se defosforilan empleando 4 U de la enzima fosfatasa alcalina (CIAP) (Thermo) en presencia de 2 µL de buffer de reacción 10x [Tris-HCl 200 mM pH 8.0, $MgCl_2$ 100 mM] en un volumen final de 20 µL. La reacción se incubó a 37 °C durante 16 horas posteriores a las cuales se le adicionó 1 ml de isopropanol y se incubó a -20 °C por 16 horas. El aptámero defosforilado se precipitó mediante una centrifugación a 15,000 *g* durante 60 minutos. El botón de RNA se lavó 3 veces con 1 ml de etanol 75 % seguido de centrifugación durante 15 minutos a 15,000 *g*, el botón de RNA lavado fue resuspendido en 20 µL de agua libre de nucleasas, se cuantificó y almacenó a -80 °C hasta su uso.

Para incorporar el ^{32}P en la molécula se procedió a realizar una reacción de fosforilación (20 µL) empleando 200 ng del aptámero a marcar, 1 µL de ɣ-[^{32}P]-ATP 111 TBq/mmol (3,000 Ci/mmol) (Perkin Elmer, Inc.), 20 U de T4 poli-nucleótido cinasa (Thermo) y 2 µL del buffer de reacción "A" 10x [Tris-HCl 500 mM pH 7.6, $MgCl_2$ 100 mM, DTT 50 mM, espermidina 1 mM], la reacción se incubó durante 16 horas a 37 °C.

6.4.3 Purificación de los aptámeros marcados radiactivamente

Seguidos a la reacción de marcaje radiactivo se adicionaron 20 µL de buffer stop 2x, las reacciones se calentaron 10 minutos a 65 °C y se incubaron 10 minutos en hielo. Las muestras se sometieron a una electroforesis en poliacrilamida al 8 % [19:1, acrilamida: bis-acrilamida] 250 V durante 45 minutos, posteriores a los cuales el gel fue retirado de la cámara de electroforesis y se expuso el gel a una placa fotográfica Kodak X-Omat (Eastman Kodak Company) durante 5 min y se cortaron los fragmentos de gel que correspondían a las bandas del aptámero marcado. Los fragmentos de gel correspondientes se trituraron haciéndolos pasar a través de una jeringa sin aguja de 3 ml y se colocaron en un microtubo con buffer de elusión [acetato de amonio 0.5 M, EDTA 1 mM y SDS 0.1 % (p/v)], se agitaron en vórtex y se eluyeron por 16 horas a 4 °C. Para eliminar los fragmentos de acrilamida residuales del eluido, las muestras se filtraron a través de un filtro de 0.45 µm de SFCA. Se le realizo una extracción fenólica al eluido empleando 400 µL de TRIzol y 80 µL de cloroformo y se mezcló por inversión, la mezcla se sometió a centrifugación durante 5 min 15,000 *g*, se recuperó la fase acuosa y se colocó en un nuevo microtubo al cual se le adicionó 1 ml de isopropanol y se incubo a -20 °C por 16 horas en un recipiente adecuado. El aptámero purificado se precipitó mediante una centrifugación a 15,000 *g* durante 60 minutos. El botón de RNA se lavó 3 veces con 1 ml de etanol 75 % seguido de centrifugación durante 15 minutos a 15,000 *g*, el botón de RNA lavado fue resuspendido en suficiente agua libre de nucleasas para obtener entre 200-300 cpm/µL del aptámero directo en el contador Geiger. Posteriormente, se gotearon 5 µL del aptámero marcado en un papel filtro hasta sequedad por triplicado, el papel filtro se colocó en un vial para contador se centelleo conteniendo 5 ml de líquido de centelleo. Los viales incluyendo un blanco se analizaron en el contador de centelleo y se determinó el número de desintegraciones por minuto (dpm) y empleando la actividad específica de la marca radiactiva al día de la cuenta, se calculó la concentración de la solución de aptámero radiactivo.

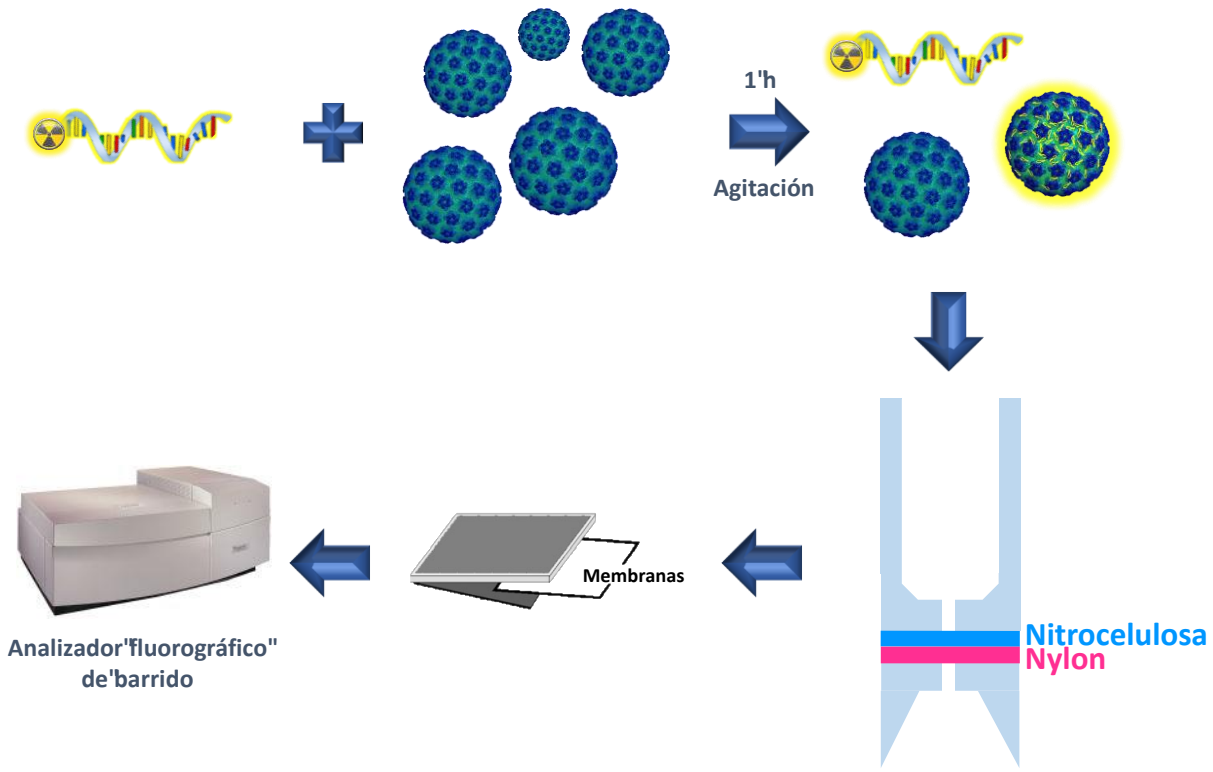

Ilustración 11. Ensayo de unión

El aptámero marcado radiactivamente se incubó con las VLPs en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Las mezclas de reacción fueron pasados a través de un sándwich de membranas (nitrocelulosa/nylon) empleando vacío. Las membranas se expusieron en una placa de almacenamiento fluorográfico y se analizaron en un analizador fluorográfico de barrido que construye una imagen digital que revela la radiactividad residual en cada membrana. Con estas imágenes digitales se cuantificó la radiactividad residual y se graficó la unión de los aptámeros a la proteína empleada.

7 Ensayos de unión

Para estudiar la interacción entre los aptámeros y las VLPs o proteínas control, se empleó un sistema de "sándwich" slot-blot. Como primer paso se realizó la interacción aptámero marcado radiactivamente (completo, deletado; silvestre, mutado o modificado) vs. proteína de interés (VLPs, GFP o BSA) en un volumen final de 80 µL. Para esto, se adicionan ~425 pg de RNA de aptámero (cf = 30 pM) y 1000 ng o 250 ng de proteína en tubos siliconizados en presencia de 40 U de RiboLock. Las reacciones de interacción se llevaron a cabo en DPBS y se sometió a agitación suave en orbital durante una hora a temperatura ambiente (Ilustración 11). Las reacciones de interacción se cargaron en un aparato de slot-

blot, se hicieron fluir a través de dos membranas empleando vació. La primera membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) retiene las proteínas y el aptámero unido a ellas, la segunda membrana de nylon cargado positivamente (GE Life Sciences) por lo que retiene el aptámero libre (no unido a la proteína). Ambas membranas se exponen en una placa de almacenamiento fluorográfico y se analizan en un analizador fluorográfico de barrido Typhoon 8600 (Thermo) que revela la radiactividad residual en una imagen digital que podemos cuantificar empleando el programa ImageQuant 5.2. La proporción del aptámero unido a las proteínas (radiactividad en la membrana de nitrocelulosa) y la del aptámero no unido (radiactividad en la membrana de nylon) se emplea para construir graficas de unión.

8 Determinación de la constante de disociación

Concentraciones crecientes del aptámero Sc5c3D18 marcado radiactivamente en el extremo 5´ (0.88, 1.77, 3.55, 7.10, 14.2, 28.4 y 56.8 pM) se colocaron en tubos siliconizados en un volumen final de 80 µL y se adicionaron 850 ng de VLPs de L1 del VPH16. Las reacciones de unión se llevaron a cabo en DPBS con 40 U de RiboLock, las mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente en agitación suave en orbital durante una hora para alcanzar el equilibrio. Los porcentajes de unión se determinaron como anteriormente se describe empleando el sistema de "sándwich" slot-blot (Leija-Montoya et al., 2014). Para calcular la constante de disociación, se empleó la función no lineal f=Bmax*abs(x)/(Kd + abs(x)), asumiendo un solo sitio de unión (Sabouri and Moosavimovahedi, 1994).

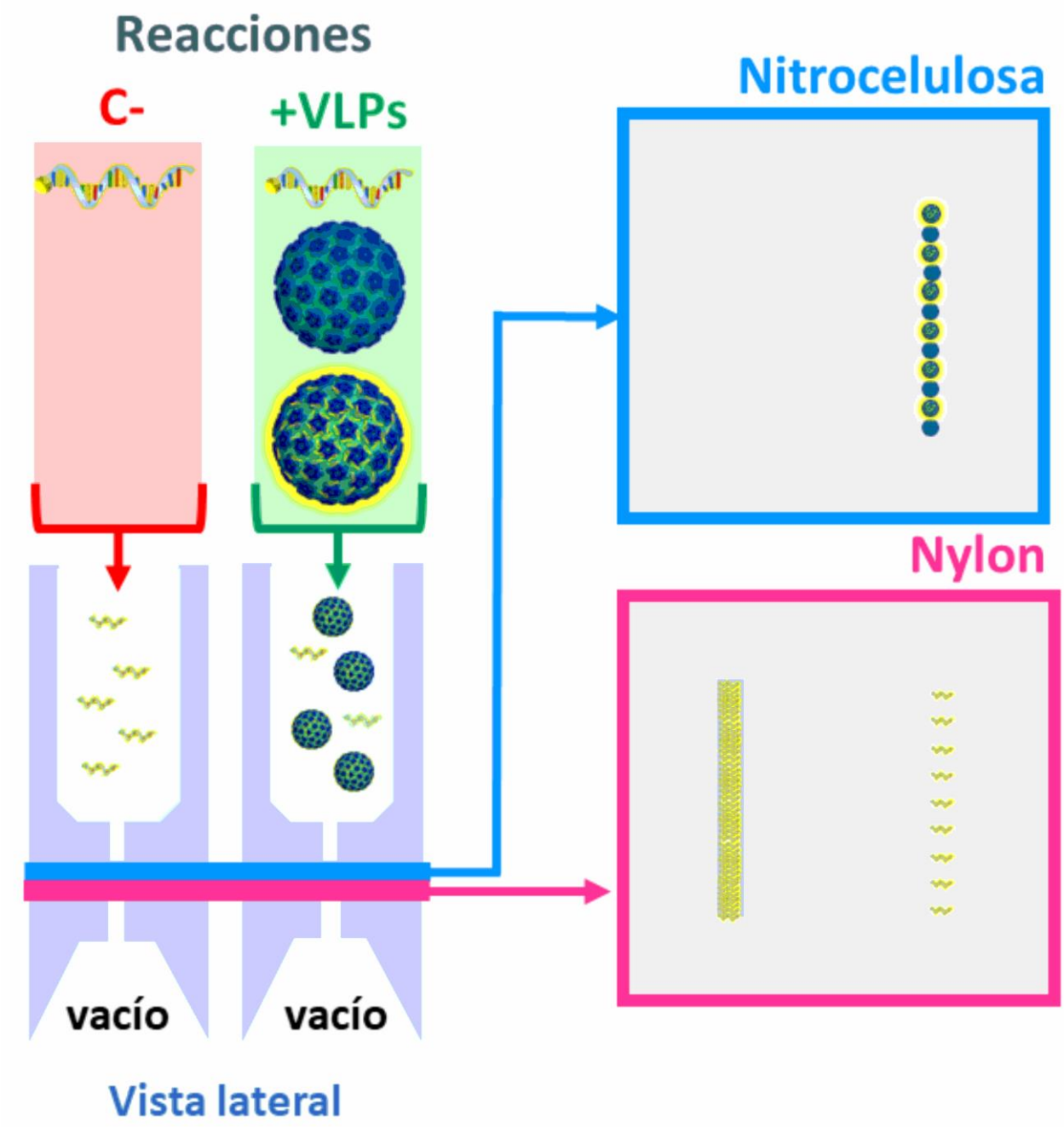

Ilustración 12. Slot-Blot

Para determinar el porcentaje de unión del aptámero a una proteína se requirieron dos reacciones: Un control negativo sin proteína que nos muestra la unión residual del aptámero a la membrana de nitrocelulosa y la reacción con la proteína a analizar. Las mezclas de unión aptámero/proteína, se hacen fluir a través de una membrana de nitrocelulosa y una de nylon, la membrana de nitrocelulosa retiene las proteínas y el aptámero unido a ellas (fracción unida) y en la membrana de nylon se retiene el aptámero libre (fracción no unida). La radiactividad residual en las membranas fue revelada exponiendo estas a una placa de almacenamiento fluorográfico y se analizaron en un analizador fluorográfico de barrido.

9 Análisis in silico de los aptámeros

Con el propósito de conocer la estructura secundaria de las mutantes 27 de los aptámero, se usó la herramienta en línea Mfold (http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold), que fue alimentada con las secuencias de cada uno de los aptámero Sc5c3 y Sc5c3D18, y sus mutantes (Zuker, 2003).

10 Síntesis de nanopartículas de oro

Para la síntesis de GNPs, a 45 ml de agua (18 MΩ) en reflujo y con agitación vigorosa, se les agregó por goteo una mezcla de reacción conteniendo, 5 ml de HAuCl4 2 %, 2 ml de citrato trisódico 1 %, 42.5 µL de $AgNO_3$ 0.1 %. Inmediatamente es posible observar como la solución transparente toma un color rojo. La mezcla se mantuvo en reflujo por 1 hora. Posteriormente se apagó la fuente de calor, manteniendo la agitación contante hasta que la mezcla de reacción alcanzó la temperatura ambiente. Las GNPs se almacenaron a 4 C hasta su uso (Shwetha et al., 2013; Turkevich et al., 1951).

11 Caracterización de las GNPs

11.1 Determinación de la concentración de GNPs

La concentración de las GNPs se determinó por el espectro de UV-vis empleando la ecuación $c = A_{450} / \varepsilon_{450}$ donde c es la concentración en moles por litro, A_{450} es la absorbancia a 450 nm y ε_{450} es el coeficiente de extinción molar de las GNPs de 21 nm ($6.31 \times 10^8 M^{-1}cm^{-1}$) (Haiss et al., 2007).

11.2 Análisis de las GNPs en TEM de alta resolución

La forma y composición química de las GNPs se analizó empleando microscopía electrónica de transmisión en modo barrido de campo oscuro

anular de alto ángulo (HAADF-STEM). La muestra de GNPs se preparó realizando una dilución de las GNPs 1:10 en agua (18 MΩ), 20 µL de la solución se colocaron sobre una rejilla de cobre 200 mesh con una membrana de Formvar/carbón y se incubaron a temperatura ambiente hasta sequedad (Plascencia-Villa et al., 2014).

11.3 Dispersión de luz dinámica

El tamaño promedio de la población de GNPs se evaluó empleando DLS en un Nano-ZS90 (Malvern Instruments, UK) con un ángulo de detección de 173° a temperatura constante (25 °C), empleando como material de medición "GNPs" (Índice de refracción (RI) 0.470; Absorbancia (Abs) 0.100) y agua como dispersante (Viscosidad 0.8872; RI 1.330). En una celda para DLS (DTS0012) se colocó un mililitro del coloide de oro. El tamaño de partículas se recabó empleando 120 segundos como tiempo de equilibrio. Se eligió el despliegue de los resultados en el modo Volumen (%) (Nicholls et al., 2016).

12 Ensayos de agregación

Con el propósito de evaluar la concentración mínima necesaria de NaCl para agregar las GNPs. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 100 µL de GNPs (200 pM), 100 µL de H_2O (18 Ω), y en 50 µL se adicionaron concentraciones crecientes de NaCl e inmediatamente se determinó la absorbancia (abs) a 650 y 520 nm y se graficó el cociente abs 650 nm/abs 520 nm. Cuando se obtiene un cociente muy pequeño (0.05) las GNPs se encuentran dispersas como un coloide y presentan un color rojo; cuando el cociente es grande (1.00) entonces la GNPs se encuentran agregadas y presentan un color azul. Un valor cociente entre 0.05 y 1.00 implica cierto grado de agregación y presentan un color violeta.

13 Funcionalización de GNPs

Para funcionalizar las GNPs se empleó polietilenglicol tiolado. La cantidad necesaria de la molécula a inmovilizar se calculó de acuerdo a los resultados publicados por Hill *et al.* (Hill et al., 2009), para llevar acabo el anclaje de las moléculas tioladas se empleó el método de inmovilización reportado por Zhang *et al.* (Zhang et al., 2013b). Brevemente, en un microtubo se colocaron las GNPs seleccionadas y se mezclaron con la cantidad de molécula a inmovilizar, la mezcla de reacción de agito a temperatura ambiente en un agitador por 5 min. Posteriormente se adicionó un buffer de citratos a una concentración final de 20 mM pH 3 y se incubo en agitación por 10 min. Para eliminar la molécula tiolada no anclada en las GNPs se procedió a realizar una purificación empleando 10 volúmenes de agua y centrifugando 10 min (21,000 x g) el sobrenadante fue eliminado y se repitió el proceso.

Capítulo 7

Resultados

"Muchas veces el éxito consiste en ir de fracaso en fracaso sin perder el entusiasmo por el camino"
–Winston Churchill

1. Diseño del Biosensor

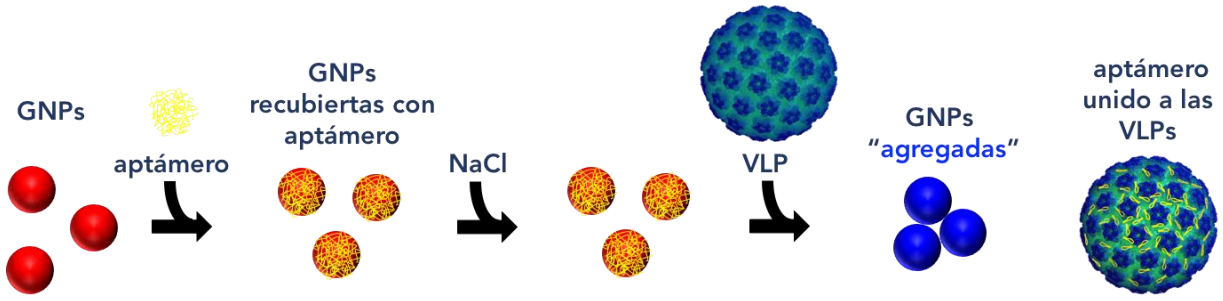

Figura 1. Biosensor para la detección de HPV16

Diseño de un aptasensor usando GNPs y el aptámero Sc5-c3Δ18. Las nanopartículas de oro son recubiertas con el aptámero para impedir su agregación en presencia de NaCl. La presencia de las VLPs en una muestra, desplazará al aptámero de las GNPs permitiendo su agregación y por lo tanto un cambio de color.

El diseño de aptasensor propuesto está basado en el publicado por Shwetha *et al.*, modificando los componentes para aplicarlo para la detección de VPH16 (Figura 1). Las GNPs son recubiertas con el aptámero de RNA Sc5-c3 capaz de unirse con alta especificidad y afinidad a VLPs de VPH16. El aptámero adsorbido sobre la superficie de las GNPs las protege de la agregación inducida por NaCl, cuando el blanco del aptámero está lo suficientemente cerca, el aptámero se unirá a las VLPs ya que posee una alta afinidad por ellas, en ese momento las GNPs quedarán descubiertas y se agregarán generando un cambio de color de rojo a azul (Shwetha et al., 2013).

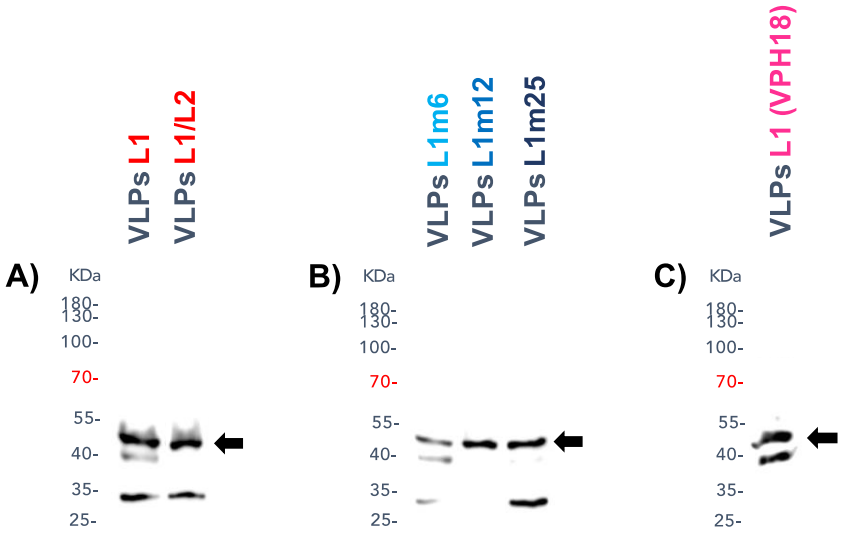

Figura 2. Inmunodetección de la proteína L1.
Las VLPs mostraron la presencia de la proteína L1. Western blot anti-L1 VPH16, con 15 µg de VLPs purificadas. A) VLPs de **L1** y **L1/L2** del VPH16. B) VLPs de **L1m6**, **L1m12** y **L1m25** del VPH16. C) VLPs de **L1** del **VPH18**. Se marca con una flecha la señal correspondiente a la proteína L1 completa. Se presume las bandas 40 y 30 KDa se tratan de productos de digestión de la proteína.

2 Caracterización de VLPs

Se produjeron VLPs infectando células Sf21 con baculovirus recombinantes de **L1 (VPH16)**, **L1/L2 (VPH16)**, **L1m6 (VPH16)**, **L1m12 (VPH16)**, **L1m25 (VPH16)** y **L1 (VPH18)**. Para mantener la calidad y la uniformidad de los lotes producidos de VLPs, se verificó la identidad de la proteína L1 de VPH16 por Western blot (WB) y

para analizar la integridad estructural de las VLPs se utilizó microscopia electrónica de transmisión (TEM). El tamaño de las VLPs en solución se determinó por dispersión de luz dinámica (DLS).

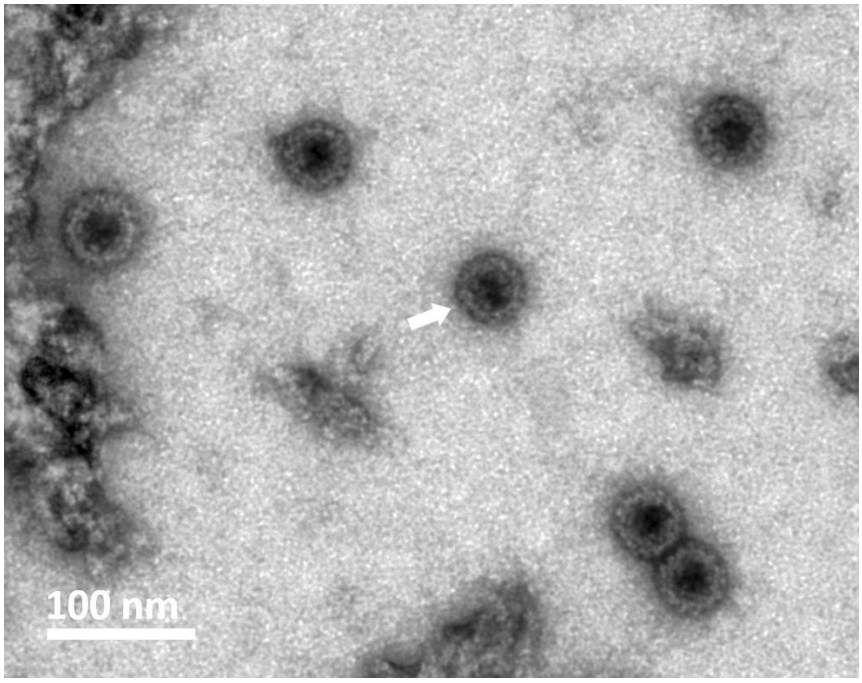

Figura 3. TEM de las VLPs

Microfotografía electrónica de las VLPs de L1 VPH16. Se indica con una flecha una estructura circular de 55 nm, con un centro electrodenso rodeado por un aro circular claro, con un aspecto característico de collar de perlas. Barra de escala = 100 nm.

Las VLPs purificadas mediante gradiente de CsCl, mostraron a la proteína L1 del tamaño esperado 55 KDa en ensayos de WB, donde se observó en todas las preparaciones de VLPs del VPH16. Incluso se observa una banda con el peso esperado en las VLPs del VPH18 implicando un reconocimiento cruzado del anticuerpo utilizado (Figura 2). En la mayoría de las preparaciones es posible observar una serie de bandas de menor tamaño molecular que pueden representar productos de la digestión de la proteína L1 ya que estos son detectados por el anticuerpo anti-L1.

La TEM de las VLPs de L1 VPH16 mostró las típicas cápsides icosahédricas vacías de 55 nm, comprobando que la proteína L1 se ensambló en su estructura

cuaternaria esperada para formar VLPs con características estructurales semejantes al virión natural (Figura 3).

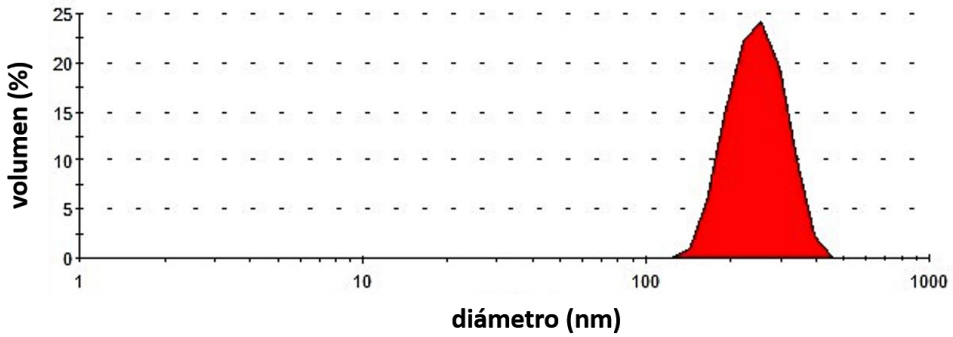

Figura 4. las VLPs se agregan en DPBS

El análisis por DLS de las VLPs mostró, una amplia distribución para las partículas virales con un tamaño promedio de 240 nm característico de las VLPs en soluciones con baja fuerza iónica. La población de VLPs mostró un índice de polidispersividad de 0.32 que indica una amplia distribución de tamaño de partícula.

El análisis de la población de las VLPs en solución mostró que estas forman cúmulos de aproximadamente 240 nm, con un alto índice de polidispersividad (Figura 4), comportamiento anteriormente reportado(Shi et al., 2005).

Todas las preparaciones de VLPs que presentan la banda de la proteína L1 completa en el WB se consideraron de buena calidad y se usaron para experimentos posteriores. No se tomó en cuenta la presencia de las bandas de productos de digestión ya que se asumió, que estos productos se encuentran integrando la estructura cuaternaria de la VLP y no como contaminantes en la preparación de VLPs purificadas por gradiente isopícnico.

3 Caracterización de GNPs

Con el propósito de identificar la forma y tamaño de las GNPs sintetizadas, cada lote de GNPs se analizó por microscopía electrónica de transmisión en modo barrido de campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF-STEM) y se realizó un análisis químico para determinar la composición de las nanoestructuras por transformada rápida de Fourier (FFT) y energía dispersiva de rayos X (EDS).

Además se analizó el tamaño de la población de GNPs por dispersión de luz dinámica (DLS).

Las TEM de campo oscuro de GNPs muestran un grupo de GNPs semiesféricas y con una distribución de tamaños entre 10-20 nm (Figura 5A). En un acercamiento a una nanopartícula de 20 nm, fue posible observar las columnas de átomos de oro que la componen. Éstas columnas se identifican como puntos blancos en la superficie de la nanoestructura (Figura 5B).

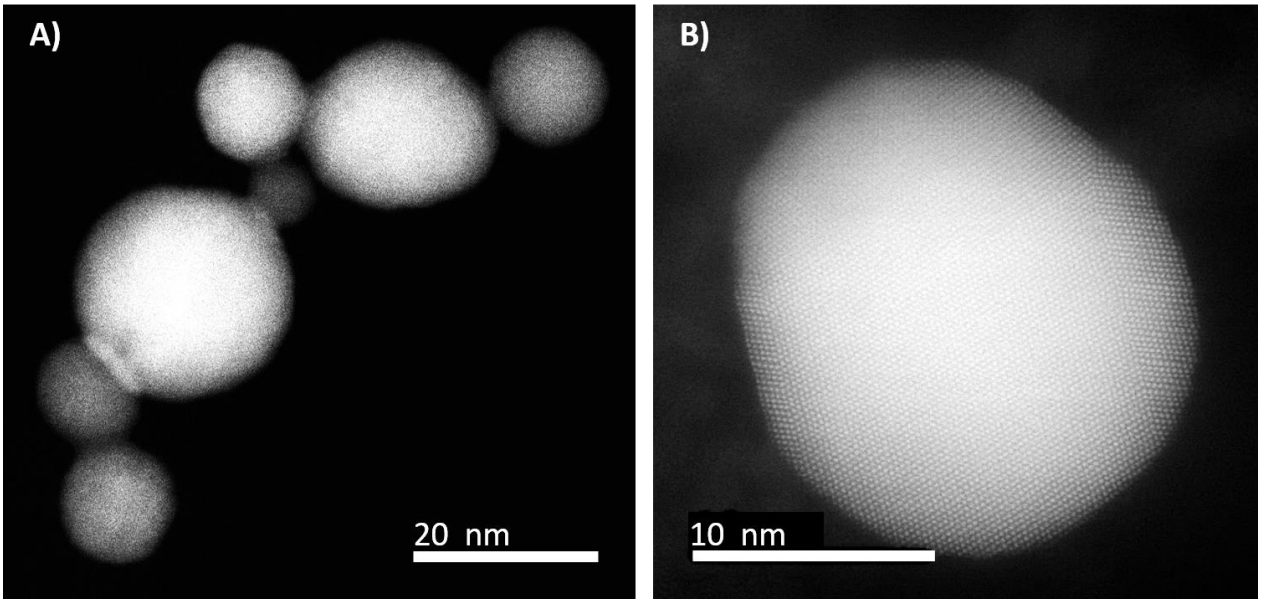

Figura 5. HAADF-STEM de las GNPs

Microfotografías de GNPs. A) Grupo de GNPs. Conglomerado de varios esferoides de 10-20 nm (escala = 20 nm). B) Acercamiento a GNP (20 nm). Cada punto blanco en la superficie de las nanopartículas, representa una columna de átomos de oro (escala = 10 nm).

Para confirmar la naturaleza química (oro) de las nanoestructuras visualizadas por HAADF-STEM, empleamos FFT y EDS**.** La FFT mostró el patrón de difracción obtenido sobre la nanoestructura visualizada en la Figura 6A. Éste resultado es el esperados para una estructura mono cristalina de nanopartículas de oro [111] y [200] (Reyes-Gasga et al., 2007). El perfil EDS de una nanopartícula (se marca con una línea roja el área analizada en el inserto) (Figura 6B), mostró el perfil esperado para una GNP esféricas y corresponde al tamaño e intensidad de una GNP de 7 nm, la señal registrada es baja en la periferia y abundante en el centro, lo que concuerda con una estructura esférica.

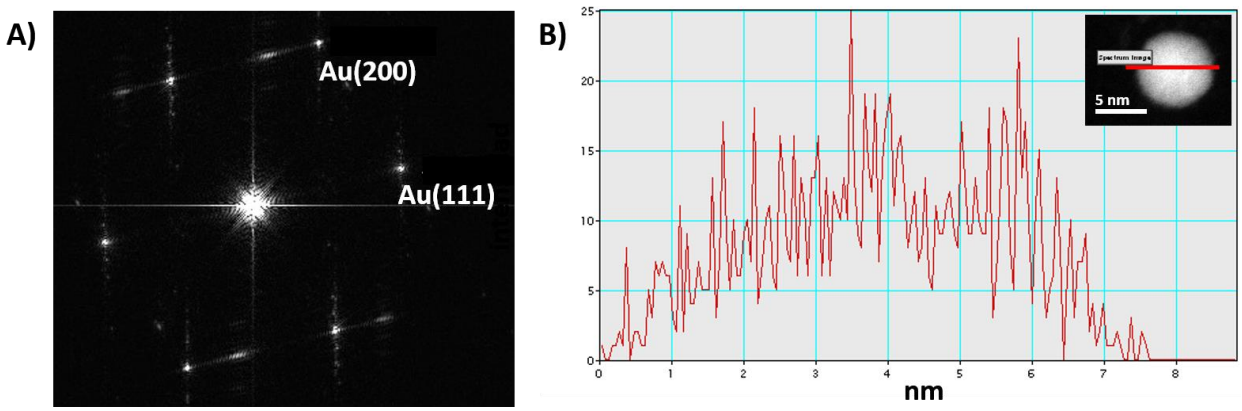

Figura 6. Análisis de las GNPs

Análisis elemental de GNPs. A) Transformada rápida de Fourier (FFT). Patrón de difracción monocristalino, se indican las distancias para [111] y [200], confirmando la naturaleza química de las nanopartículas como oro. B) EDS. Perfil de intensidad de oro a través de una nanopartícula, se marca en rojo el área analizada en el inserto.

Las imágenes y el análisis elemental realizados durante la TEM, nos proporcionaron información individual sobre las GNPs. Para evaluar el tamaño de la población de GNPs usamos el análisis DLS (volumen) que mostró un pico único con un tamaño promedio de 20 nm y con un índice de polidispersividad de 0.15, lo que cataloga al producto de la síntesis como una suspensión de GNPs (Figura 7).

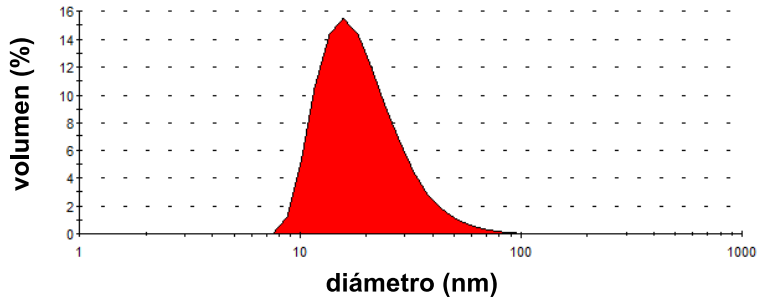

Figura 7. Distribución de tamaño de GNPs

Perfil de distribución de tamaño de la población de nanopartículas por DLS. Se muestra un único pico, con un tamaño promedio de 20 nm y un índice de polidispersividad de 0.15.

Para determinar si la síntesis de GNPs es reproducible, evaluamos el tamaño promedio de la población de cinco lotes de producción de GNPs por DLS. El

tamaño promedio de cada población osciló entre 19.5 y 22.4 nm (Tabla 6), con un tamaño promedio de 21 nm. Estas GNPs fueron usadas en experimentos posteriores.

Tabla 6. Tamaños de partícula por lotes de síntesis de GNPs

Lote	Tamaño (nm)
GNP.1	20.78
GNP.2	22.47
GNP.3	20.58
GNP.4	19.58
GNP.5	21.54

4 La versión de DNA de Sc5-c3 no reconoce VLPs

Con el propósito de facilitar la síntesis e incrementar la resistencia a nucleasas del aptámero de RNA Sc5-c3, generamos un oligonucleótido homólogo de DNA con la misma secuencia nucleotídica. Para determinara si la versión de DNA de Sc5-c3 es funcional, se realizó un ensayo de unión comparando Sc5-c3 (RNA) y Sc5-c3 (DNA) marcados radioactivamente y como blanco se usaron VLPs de L1 de VPH16. Como control de especificidad, se incluyeron las proteínas no relacionadas GFP y BSA.

Los complejos Aptámero-Proteína fueron analizados mediante un ensayo de "sándwich" slot-blot (Nitrocelulosa/Nylon) por triplicado. Como se puede observar en la gráfica de unión relativa a Sc5-c3, solo la versión de RNA fue capaz de reconocer las VLPs, además presentó una alta especificidad ya que no se unió a las proteínas control. La versión de DNA del aptámero no se une significativamente a las VLPs, sólo mostró una unión residual en presencia de las VLPs y no a GFP ni BSA (Figura 8). La falta de unión por Sc5-c3 (DNA) implica una participación importante del 2´-OH libre y/o uracilos del RNA en la interacción

aptámero-blanco. De esta manera, modificaciones químicas a la secuencia de Sc5-c3 pueden ser relevantes para su capacidad de reconocimiento de las VLPs por lo que deben de ser evaluadas antes de incorporarse en sistemas de detección.

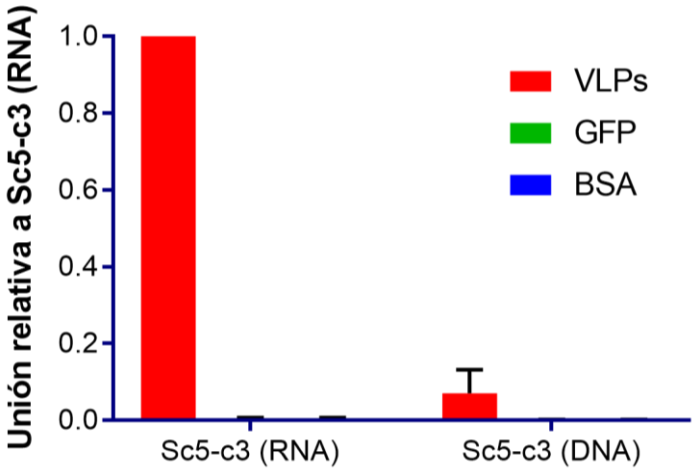

Figura 8. La versión de DNA de Sc5-c3 no reconoce VLPs.
Ensayo de unión para determinar si la versión de DNA de Sc5-c3 es capaz de unirse con alta afinidad y especificidad a las VLPs. El ensayo de unión se llevó acabo colocando la versión de RNA o DNA del aptámero marcadas radiactivamente en el extremo 5´, en presencia de 1 µg VLPs o GFP y BSA como proteínas control. El grafico muestra la unión relativa al aptámero de RNA. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

5 El aptámero sintético reconoce a las VLPs

Para evaluar cómo modificaciones químicas a la molécula o al método de producción afectan el reconocimiento de Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18 por las VLPs, se comparó el método de producción enzimático reportado (Leija-Montoya et al., 2014), contra la producción por síntesis química automatizada. Ésta última es muy importante ya que permite la producción de la molécula a gran escala y la modificación química del aptámero durante la síntesis.

Se realizaron ensayos de unión en donde las versiones producidas por métodos enzimático y por síntesis química del aptámero Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18 fueron marcadas radiactivamente en el extremo 5´y se retaron contra VLPs de

VPH16. La formación de los complejos aptámero-proteína fue analizada mediante ensayos de "sándwich" slot-blot (Nitrocelulosa-Nylon) por triplicado y se graficó el promedio y desviación estándar de la unión relativa a Sc5-c3 o Sc5-c3Δ18. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas entre el reconocimiento del aptámero Sc5-c3 producido por métodos enzimáticos y síntesis química automatizada (Figura 9). Sc5-c3Δ18 producido mediante síntesis química automática también fue capaz de unirse con alta afinidad a las VLPs. Dado que ambos aptámeros se unieron a las VLPs, se demuestra la factibilidad de producir el aptámero por métodos químicos y en grandes cantidades evitando los problemas asociados con la producción enzimática (Figura 10).

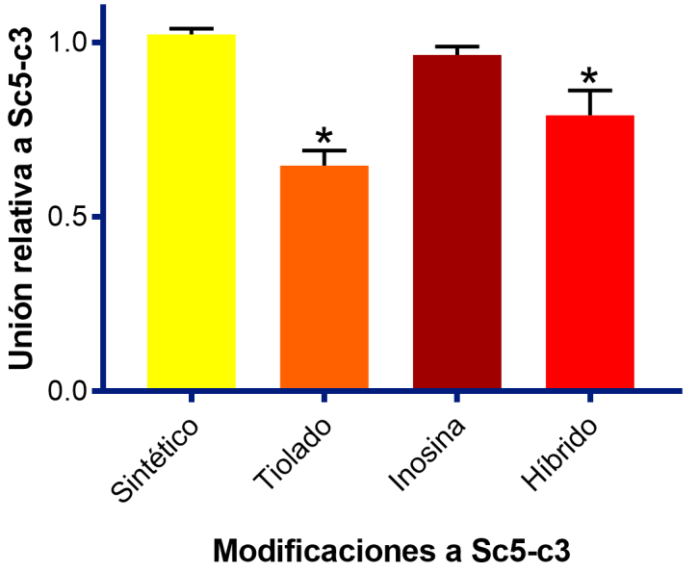

Figura 9. El híbrido Sc5-c3 es capaz de reconocer las VLPs

Ensayo de unión para determinar los efectos de las modificaciones en el reconocimiento del aptámero Sc5c3 por las VLPs. El ensayo de unión se llevó acabo colocando la versión nativa de Sc5-c3 y Sc5-c3 producido por síntesis química (Sintético), modificada Sc5-c3-SH (Tiolado), Sc5-c3-Inosina (Inosina) y modificada Sc5-c3DNA/RNA (Híbrido) del aptámero marcadas radiactivamente en el extremo 5´ (30 pM), en presencia de 250 ng VLPs. El grafico muestra la unión relativa al aptámero nativo. Se muestran los promedios y desviación estándar de 3 experimentos independientes. *, indica los resultados estadísticamente significativos comparados con el aptámero no modificado (p 0.05).

6 El ML como cadena sencilla no modifica la unión de Sc5c3

La reportada caracterización estructural de Sc5-c3 (Leija-Montoya et al., 2014), reveló la coexistencia de dos estructuras secundarias que difieren únicamente en la formación de una doble cadena entre las GG (19-20) y CC (26-28) dentro de la región del loop mayor (ML), en (Ilustración 8). Dado que esta región es necesaria para el reconocimiento de las VLPs, se procedió a analizar su contribución en el reconocimiento del aptámero por el blanco, mediante la sustitución de los dos residuos G implicados en la formación de la doble cadena por inosinas. Esto produce un cambio en la estabilidad (Tm) de la doble cadena por reducción de la formación de puentes de hidrógeno por el apareamiento inosina-citosina. El aptámero Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18 y sus versiones modificadas con inosinas (Sc5-c3-Inosina y Sc5-c3Δ18-Inosina) fueron marcadas radiactivamente en el extremo 5´ y se retaron contra VLPs, en ensayos de "sándwich" slot-blot. Los resultados mostraron que tanto Sc5-c3 y Sc5-c3-Inosina (Figura 9), como Sc5-c3Δ18 y Sc5-c3Δ18-Inosina (Figura 10) son capaces de reconocer con alta afinidad a las VLPs L1 VPH16, implicando que la formación de un posible apareamiento guanina-citosina en el ML no modifica la manera en la cual el aptámero interactúa con el blanco.

7 El hibrido DNA/RNA Sc5-c3 reconoce VLPs

Una vez que se determinó que la versión de DNA del aptámero no es capaz de unirse a las VLPs, comprendimos que la estructura química del RNA es fundamental para el reconocimiento aptámero-blanco. Para profundizar en el conocimiento de los requerimientos estructurales para el reconocimiento de VLPs por Sc5-c3, diseñamos moléculas híbridas DNA/RNA para Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18, manteniendo como RNA solo las bases que se describieron en contacto con las VLPs (Leija-Montoya et al., 2014). La molécula híbrida fue marcada radiactivamente y se retó contra VLPs, la formación de los complejos aptámero-proteína fueron analizados mediante un ensayo de unión.

El aptámero híbrido Sc5-c3 fue capaz de unirse a las VLPs en un 80% respecto a el aptámero Sc5-c3 no modificado (Figura 9), demostrando que algunas las bases que se mantuvieron como RNA son indispensables para el reconocimiento del blanco. Sin embargo, el hibrido DNA/RNA Sc5-c3Δ18 sólo fue capaz de unirse con un 30 % de eficiencia relativo al control no modificado, demostrando que la mayoría de las bases que se mantuvieron como RNA no median el reconocimiento de Sc5-c3Δ18 por VLPs (Figura 10), sugiriendo diferentes sitios de interacción para Sc5-c3/VLPs y Sc5-c3Δ18/VLPs.

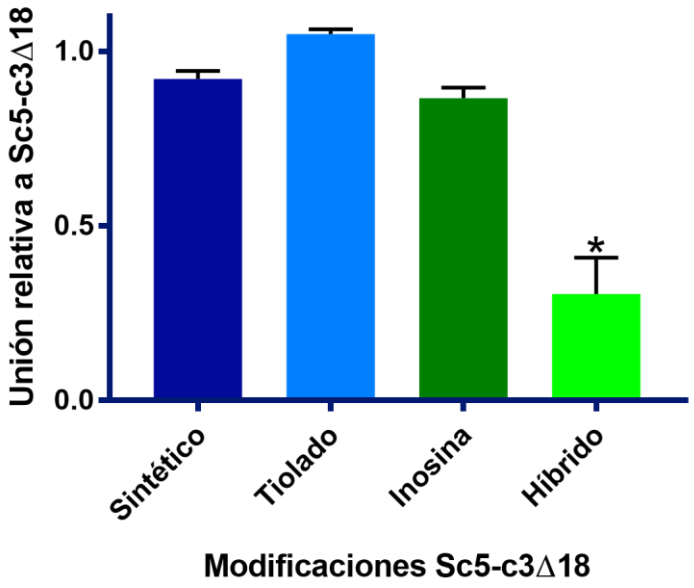

Figura 10. El híbrido Sc5-c3Δ18 no reconoce a las VLPs

Ensayo de unión para determinar los efectos de las modificaciones en el reconocimiento del aptámero Sc5-c3Δ18 por las VLPs. El ensayo de unión se llevó acabo colocando la versión nativa de Sc5-c3Δ18 y Sc5-c3Δ18 producido por síntesis química (Sintético), modificada Sc5-c3Δ18-SH (Tiolado), Sc5-c3Δ18-Inosina (Inosina) y modificada Sc5-c3Δ18DNA/RNA (Híbrido) marcadas radiactivamente en el extremo 5´ (30 pM), en presencia de 250 ng VLPs. El grafico muestra la unión relativa al aptámero Sc5-c3Δ18 nativo. Se muestran los promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes. *, indica los resultados estadísticamente significativos comparados con el aptámero silvestre no modificado (p 0.01).

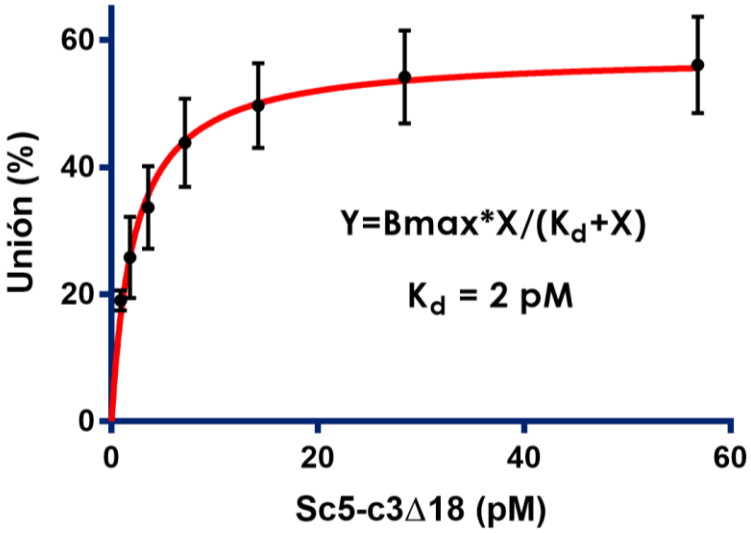

Figura 11. K_d de la interacción Sc5-c3Δ18 con VLPs L1 VPH16
La determinación de la K_d se llevó a cabo mediante un ensayo de "sándwich" slot-blot empleando 850 ng de proteína y concentraciones crecientes del aptámero marcado con ^{32}P en el extremo 5´ (0.88, 1.77, 3.55, 7.1, 14.2, 28.4, 56.8 y 113 pM) y 40 U de RiboLock®. Se cuantificaron los datos del complejo aptámero-proteína y se graficaron como porcentaje de unión contra concentración de aptámero. La K_d fue calculada empleando el modelo $Y=Bmax*X/(K_d+X)$, resultado en una K_d de 2 pM. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

8 Sc5-c3-SH también reconoce a las VLPs

La adición de un grupo tiol (-SH) a la molécula de Sc5-c3, es la mejor forma de anclarlo en la superficie de las GNPs. Para evaluar si la adición de un grupo tiol (-SH) en el extremo 3´ de Sc5-c3 modificará el reconocimiento del aptámero por las VLPs.

Las moléculas modificadas fueron marcadas radiactivamente y se retaron contra VLPs, la formación de los complejos aptámero-proteína fueron analizados por "sándwich" slot-blot (Nitrocelulosa-Nylon) por triplicado. Éste análisis también se realizó con Sc5-c3Δ18 modificada en el 3´.

El ensayo de unión entre Sc5-c3-SH y VLPs mostró que la adición del grupo tiol al extremo 3´ de Sc5-c3, modifica el reconocimiento del aptámero por el blanco significativamente, ya que el aptámero modificado se unió en un 60 % con respecto al no modificado (Figura 9).

El ensayo de unión entre Sc5-c3Δ18-SH y VLPs mostró que la adición del grupo tiol a Sc5-c3Δ18 en el extremo 3´ no modificó el reconocimiento del aptámero por el blanco (Figura 10).

9 Sc5-c3Δ18 se une fuertemente a VLPs L1 VPH16

Ya que la constante de disociación (K_d) entre el aptámero Sc5-c3Δ18 y VLPs de L1 de VPH16 no había sido determinada, concentraciones crecientes del aptámero marcado radiactivamente se incubaron con una cantidad fija de VLPs en ensayos de unión. La curva de saturación muestra el comportamiento clásico para una interacción entre dos moléculas con un único sitio de interacción (Leija-Montoya et al., 2014). Los datos fueron analizados asumiendo una unión específica y la K_d fue calculada empleando una regresión no lineal, bajo el modelo $Y=Bmax*X/(K_d+X)$ (Sabouri and Moosavimovahedi, 1994), resultado en una K_d de 2 pM, indicando que el aptámero se une fuertemente a las VLPs (Figura 11).

10 La Fuerza iónica bloquea la unión aptámero-VLPs

Una parte importante en el diseño del biosensor propuesto, es la presencia de NaCl en el sistema que desencadena la agregación de las GNPs sin afectar el reconocimiento Sc5-c3/VLPs, por lo cual es relevante determinar si el aptámero se puede unir a las VLPs en soluciones con alta fuerza iónica. Para determinar la fuerza iónica máxima en la cual el aptámero es capaz de reconocer al blanco, se realizaron ensayos de unión empleando concentraciones crecientes de NaCl con Sc5-c3 o Sc5-c3Δ18 marcados radiactivamente y VLPs. La cuantificación de los datos obtenidos mostró que la interacción de VLPs Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18 no es afectada significativamente entre agua desionizada y 0.2 M de NaCl en comparación con DPBS (medio de aislamiento). No obstante, NaCl 0.3 M es suficiente para disminuir significativamente la interacción (40-60 %) y a partir de 0.4 M el reconocimiento decae por debajo de 20 % para ambas moléculas,

implicando que la [NaCl] es determinante para la interacción con blanco y que NaCl 0.2 M es la concentración máxima en la cual se puede llevar acabo el reconocimiento específico del aptámero por las VLPs (Figura 12). Los datos sugieren que Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18 interactúan a través de interacciones electrostáticas con las VLPs.

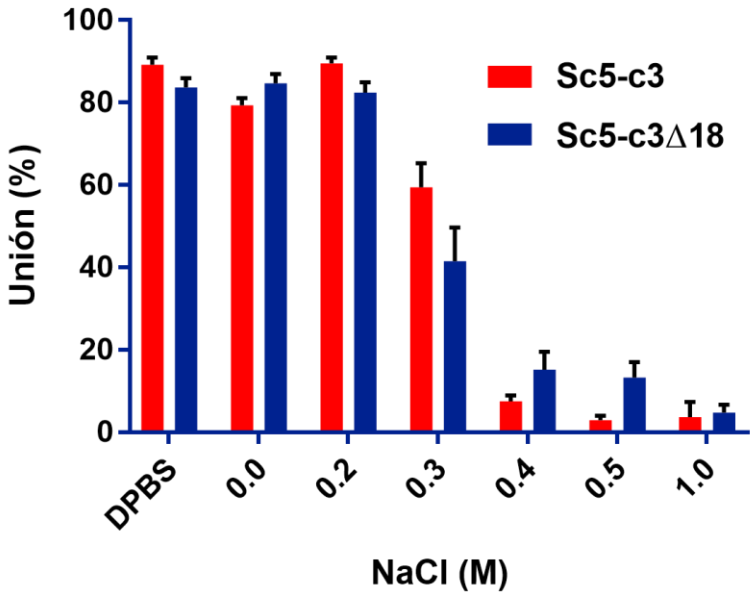

Figura 12. Efecto de la [NaCl] en el reconocimiento por VLPs L1 VPH16
Ensayo de unión para determinar los efectos de la fuerza iónica en el reconocimiento por VLPs. El ensayo de interacción se llevó acabo colocando Sc5-c3 o Sc5-c3Δ18 del aptámero marcadas radiactivamente en el extremo 5´ (30 pM), en presencia de 250 ng VLPs. El grafico muestra el porcentaje de unión. Se muestran los promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

11 La mutante C27A no reconoce VLPs L1 VPH16

Con el propósito de analizar la susceptibilidad a modificación de cada una de las bases que componen el ML de Sc5-c3, se introdujeron mutaciones puntuales en las posiciones 22 a la 28 y una doble mutación en las posiciones 19-20. Los aptámeros de Sc5-c3 o Sc5-c3Δ18 mutados fueron marcados radiactivamente en el extremo 5´ y se retaron contra VLPs L1 de VPH16. Las

mutantes de Sc5-c3 U22A, A23U, C24A, C25A, C26A, C28A y G19C:G20T no mostraron diferencias significativas comparadas contra Sc5-c3 en ensayos de unión. Sin embargo, la mutante Sc5-c3 C27A muestra una disminución dramática en la unión del 90 %, sugiriendo que esta posición es extremadamente importante para el reconocimiento de las VLPs y por lo tanto esta posición es poco susceptible a modificaciones (Figura 13).

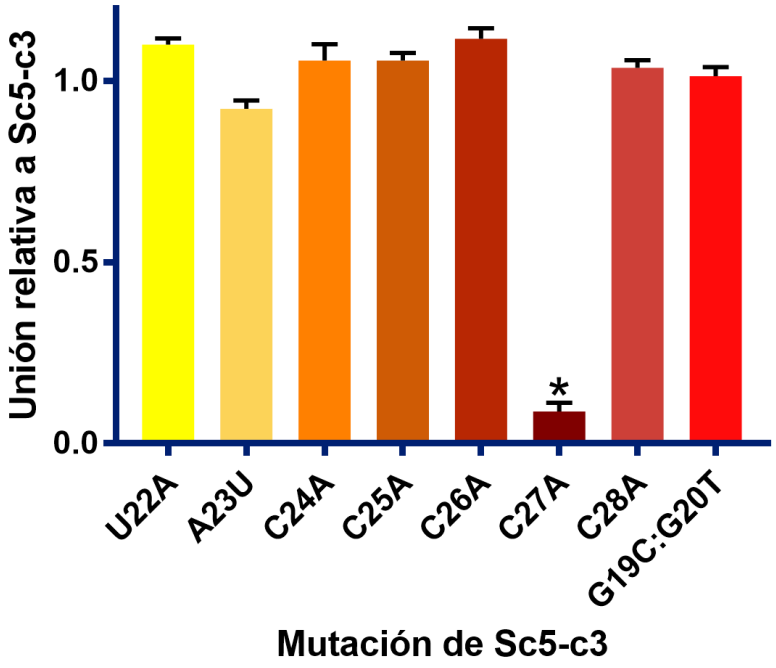

Figura 13. Sc5-c3 C27A no se une a VLPs L1 VPH16

Los aptámeros mutados de Sc5-c3 fueron marcados radiactivamente en el extremo 5´ y se retaron contra VLPs L1 VPH16. La formación de los complejos aptámero-proteína fueron analizados mediante un ensayo de "sándwich" slot-blot (Nitrocelulosa-Nylon) por triplicado, se grafica la unión relativa a Sc5-c3. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes. (P = 0.0002).

Por otro lado, las mutantes de Sc5-c3Δ18 U22A, A23U, C24A, C26A, C27A, C28A y G19C:G20T no mostraron diferencias significativas en unión a VLPs comparadas contra Sc5-c3 nativo, a diferencia de la mutante Sc5-c3Δ18 C25A que muestra una disminución ligera pero significativa del 10 % (Figura 14).

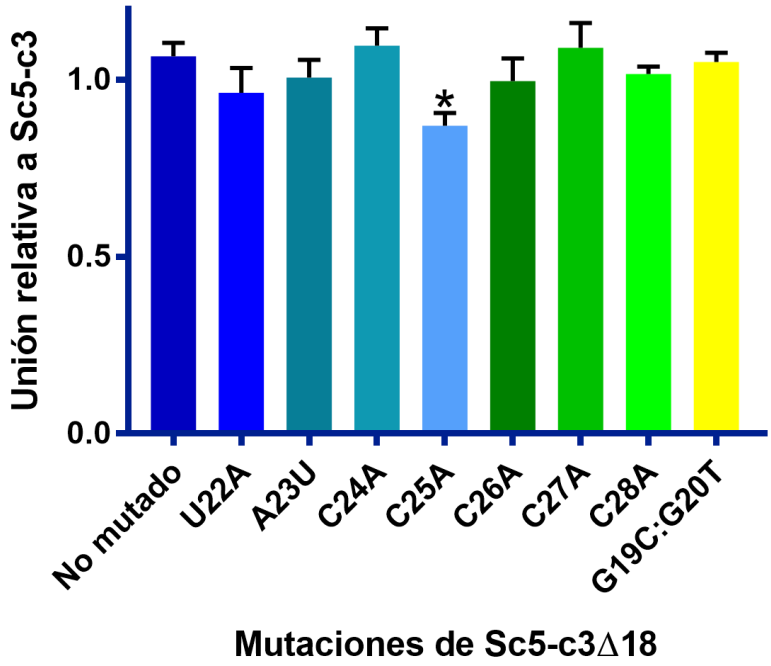

Figura 14. La mutación Sc5-c3Δ18 C25A disminuye la unión por VLPs L1 VPH16
Los aptámeros mutados de Sc5-c3Δ18 fueron marcados radiactivamente en el extremo 5´ y se retaron contra VLPs L1 VPH16. La formación de los complejos aptámero-proteína fueron analizados mediante un ensayo de "sándwich" slot-blot (Nitrocelulosa-Nylon) por triplicado, se grafica la unión relativa a Sc5-c3. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes. (P = 0.03).

12 GNPs se agregan completamente con 70 mM NaCl

Con el propósito de caracterizar las GNPs sintetizadas, se determinó la concentración mínima de NaCl necesaria para desencadenar un cambio completo de color de rojo a azul (650 nm y 520nm, respectivamente). Para esto las GNPs se pusieron en contacto con cantidades crecientes de NaCl (20-100 mM) e inmediatamente se obtuvieron las absorbancias a 520 y 650 nm. En la gráfica se muestra que es posible observar agregación de GNPs (cambio del cociente Abs 650/520) a partir de 20 nM, pero se consideró completa hasta 70 mM ya que a esta concentración fue posible observar a simple vista el cambio de color a azul y no se observó un cambio significativo en el cociente 650/520 con concentraciones mayores a NaCl (Figura 15).

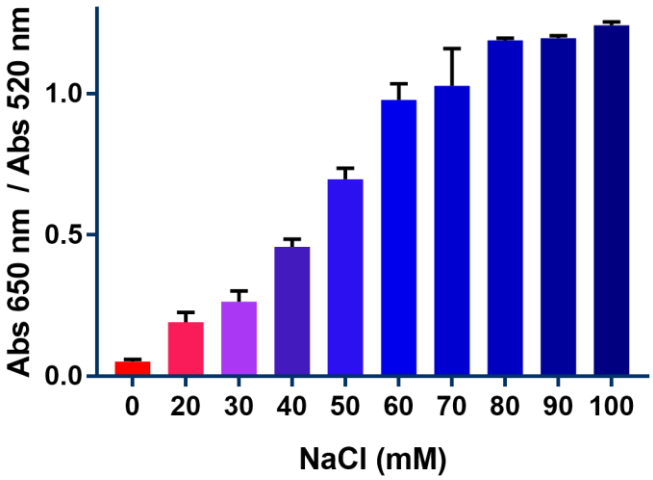

Figura 15. 70 mM de NaCl agrega completamente las GNPs
Ensayo de agregación de GNPs empleando concentraciones crecientes de NaCl. En una microplaca se colocaron 100 µL GNPs (200 pM), 100 µL de H_2O (18 Ω) y en 50 µL se adicionó el NaCl total. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

12 Las VLPs inhiben la agregación de las GNPs

Para determinar si las VLPs afectan en el proceso de agregación de las GNPs no funcionalizadas, se realizaron ensayos de agregación de GNPs en presencia de VLPs. Para esto, 80 pM de GNPs se incubaron con cantidades crecientes de VLPs (10-1000 ng), en NaCl 70 mM, e inmediatamente se obtuvieron las absorbancias a 520 y 650 nm. Como proteína control se usó BSA con el fin de evaluar la interacción de la asociación natural ("Corona") de proteínas con GNPs (Docter et al., 2015). El ensayo de agregación mostró que las VLPs inhibieron rápidamente la agregación de las GNPs desde 100 ng, encontrando el punto máximo con 300 ng de VLPs. A altas cantidades (1000 ng), BSA también exhibió un efecto inhibitorio significativo (50 %) en la agregación de GNPs, por lo que este efecto se atribuyó a la saturación de la solución y no a una interacción especifica como la que sugiere la rápida interacción GNPs-VLPs (Figura 16).

Para elucidar el mecanismo de bloqueo de la agregación de las GNPs por las VLPs realizamos TEM de las VLPs en presencia de GNPs. Las microfotografías

de las GNPs y VLPs mostraron que las GNPs (círculos negros) interactúan directamente con las VLPs. Inclusive, se pudo apreciar que algunas VLPs estaban rodeadas por nanopartículas (flechas blancas). Otras GNPs se encontraron sobre las VLPs (flecha roja) y algunas GNPs se encuentran interactuando con fragmentos de VLPs (flechas amarillas), lo que sugiere que la interacción se establece entre la proteína L1 y GNPs (Figura 17).

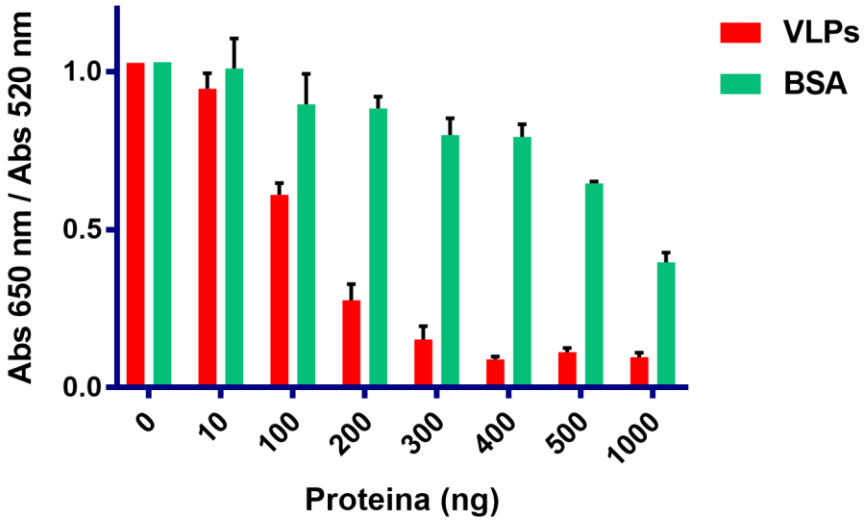

Figura 16. Las VLPs bloquean la agregación de las GNPs
Ensayo de agregación de GNPs empleando concentraciones crecientes de VLPs. En una microplaca se colocaron GNPs (80 pM), VLPs o BSA (0, 10, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 ng) y 70 mM de NaCl en un volumen final de 250 µL. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

13 Disgregación de los complejos de VLPs

Si las GNPs no funcionalizadas interactúan directamente con las VLPs entonces las GNPs podrían funcionar como puentes entre las VLPs, formando grandes complejos VLP-GNP-VLP incremento su tamaño. La formación de estos complejos fue evaluada por DLS. en una celda para DLS, colocamos VLPs y concentraciones crecientes de GNPs e inmediatamente se determinó el tamaño de los complejos GNPs-VLPs.

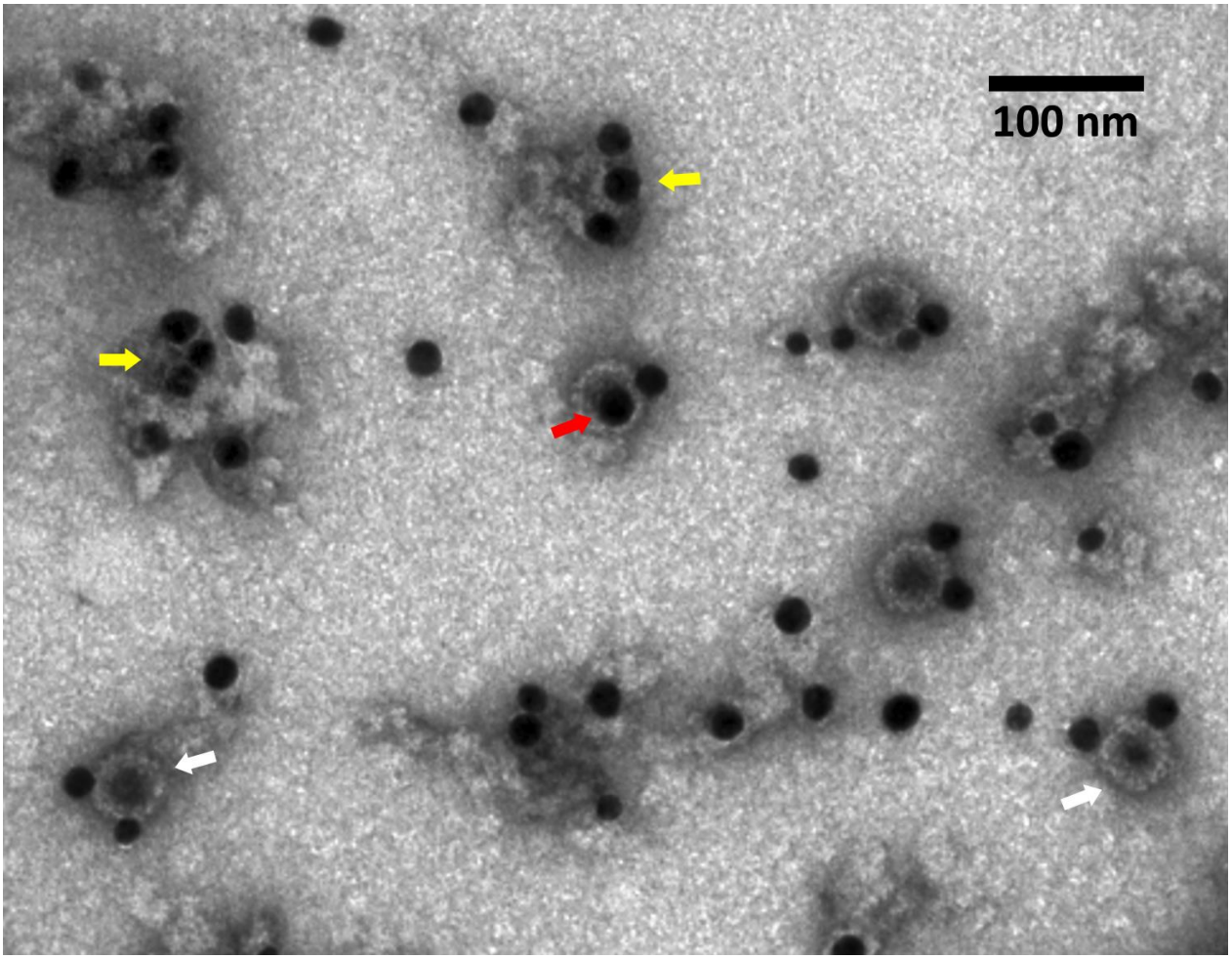

Figura 17. TEM de complejos GNPs-VLPs

Tinción negativa de VLPs de L1 VPH16 en presencia de GNPs. Se indica con flecha blanca las VLPs que interactúan con las GNPs (círculos negros) en la periferia, con flecha roja se muestra una GNP sobre una VLP, con flecha amarilla se muestra la interacción de GNPs con fragmentos de VLPs. (escala = 100 nm).

Las VLPs solas mostraron un tamaño promedio de 240 nm característico de las VLPs en DPBS, ya que las VLPs forman estos conglomerados moleculares debido a su carácter hidrofóbico en este medio (Shi et al., 2005). Al incluir a las GNPs en la mezcla de reacción, el tamaño de partícula comenzó a disminuir hasta estabilizarse en 60 nm aproximadamente sugiriendo que las GNPs disgregan los cúmulos de VLPs. Cabe destacar que no se registraron GNPs solas, por lo que se asumió que todas las GNPs se encuentran unidas a la superficie de las VLPs (Figura 18). Es remarcable que las GNPs hayan estabilizado a las VLPs en solución como partículas individuales y confirma las observaciones de TEM donde las GNPs rodean a las VLPs impidiendo la formación de conglomerados.

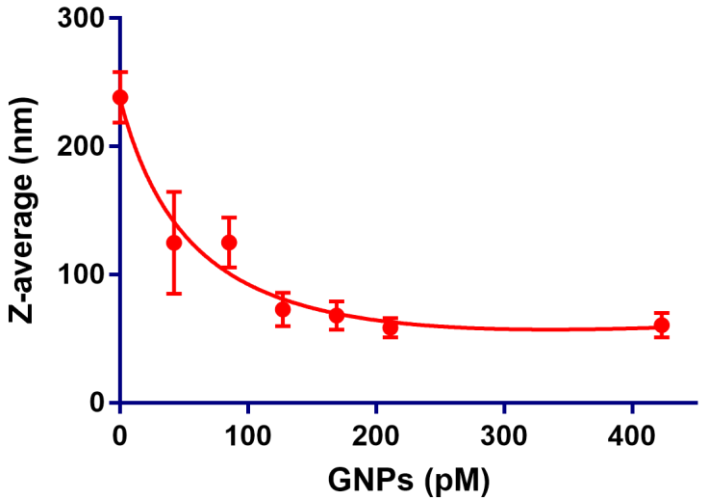

Figura 18. Las GNPs disgregan los complejos de VLPs
Se determinó el tamaño de los complejos de VLPs en presencia de GNPs. Se colocaron 400 ng de VLPs y concentraciones crecientes de GNPs (42, 85, 127, 169, 211 y 423 pM), en un volumen final de 1 ml, en H_2O (18 MΩ) como diluyente,

Para determinar el tiempo que tardan en interactuar GNPs-VLPs se realizaron unas cinéticas de la interacción GNPs-VLPs, recabando el tamaño de partícula de los complejos durante 20 min. La cinética del tamaño de partícula de la interacción GNPs-VLPs mostró un tamaño promedio esperado de 240 nm, cuando se introducen las GNPs en el sistema, que disminuyó rápidamente desde los 5 min a un tamaño promedio de 60 nm que se mantiene estable por al menos 20 min (Figura 19).

14 La interacción GNPs/VLPs es reversible

Para determinar si las GNPs que se encuentran adsorbidas en la superficie de las VLPs conservan su capacidad de agregarse, se realizaron ensayos de agregación empleando de GNPs inhibidas con VLPs con concentraciones crecientes de NaCl (100-800 mM). Los resultados mostraron que conforme se aumentó la concentración de NaCl, la agregación fue recuperada, sugiriendo que la interacción entre GNPs-VLPs no es covalente y que las GNPs conservan sus capacidades fisicoquímicas aún en presencia de las VLPs (Figura 20).

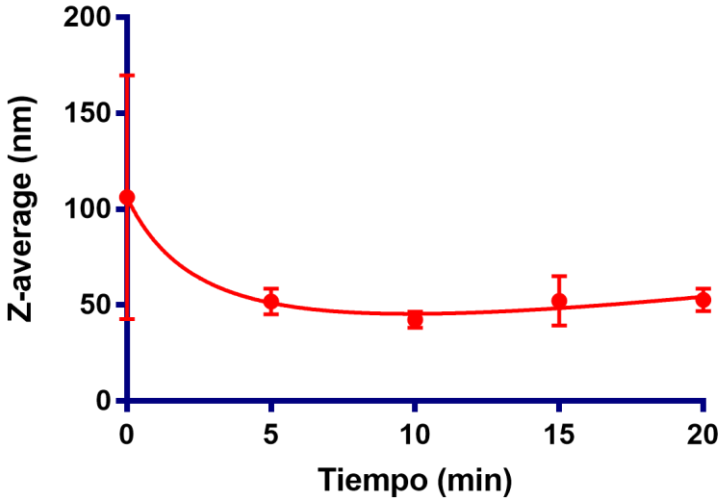

Figura 19. Cinética de interacción GNPs/VLPs

Para determinar el tiempo en que la interacción GNPs/VLPs se lleva acabo. Se realizó una cinética midiendo el tamaño de partícula cada 5 min durante 20 min, para esto colocamos en una celda para DLS 400 ng de VLPs y 50 pM de GNPs en un volumen final de 1 ml. La cinética muestra que a los 5 min la interacción GNPs/VLPs ya es estable mostrando un tamaño promedio de 60 nm.

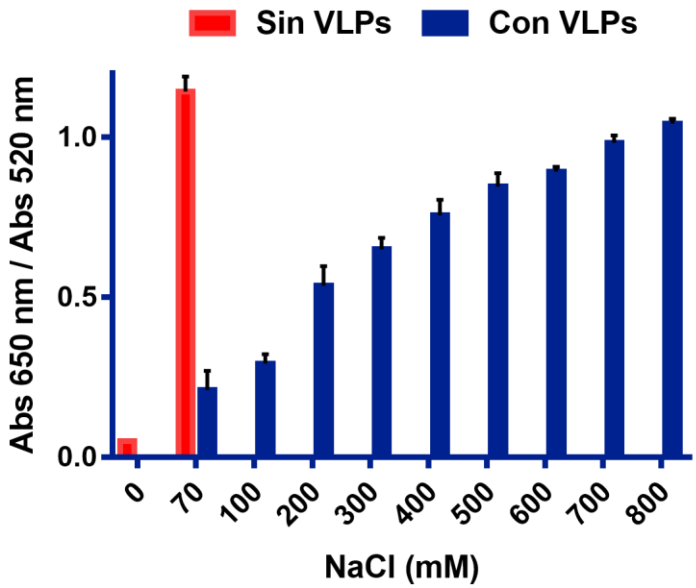

Figura 20. La interacción GNPs/VLPs es reversible

Ensayo de agregación para determinar la recuperación de la agregación de las GNPs aumentando la [NaCl]. Se colocaron GNPs (80 pM), VLPs (400 ng) y NaCl (0, 70, 100 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 mM). Se muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

15 La interacción GNPs/VLPs no es electrostática

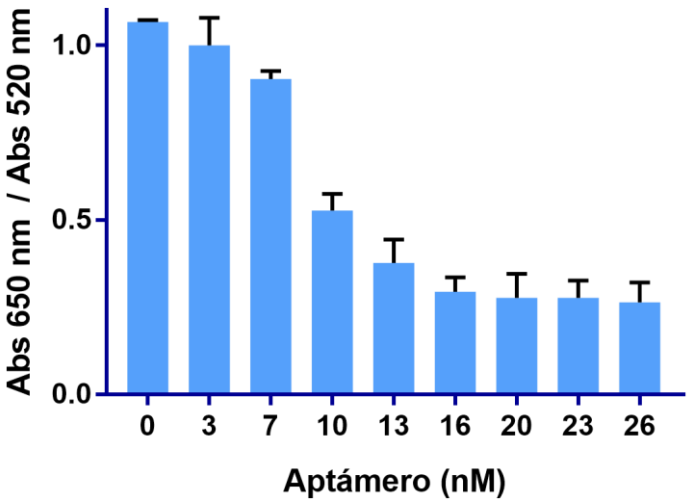

Figura 21. Sc5-c3Δ18 protege a las GNPs de la agregación
Ensayo de agregación para determinar la concentración de aptámero necesaria para bloquear la agregación de las GNPs. Se colocaron GNPs (200 pM), concentraciones crecientes de Sc5-c3Δ18 (0, 3, 7, 10, 13, 16, 20, 23 y 26 nM), NaCl (70 nM) y se determinó su cociente de absorbancia 650 nm / 520 nm. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Para evaluar la naturaleza electrostática de la interacción GNPs-VLPs, adsorbimos sobre la superficie de las GNPs al aptámero Sc5-c3Δ18. Como ocurre con otros ácidos nucleicos de cadena sencilla, se esperaba que Sc5-c3Δ18 supere la repulsión electrostática e interactúe con las GNPs principalmente a través de interacciones hidrofóbicas (Nelson and Rothberg, 2011). A pesar de que el aptámero ocupa un espacio en la superficie de las GNPs no desplazará completamente los iones citrato en la superficie de estas, que confieren su carga negativa. Por lo tanto, si las VLPs inhiben la agregación de GNPs parcialmente recubiertas con el aptámero, entonces la carga electrostática podría no mediar la interacción GNPs/VLPs. Para demostrar si el aptámero Sc5-c3Δ18 puede interactuar con la superficie de nuestras GNPs no funcionalizadas e inhibir la agregación de las mismas, se realizaron ensayos de agregación de GNPs en presencia de concentraciones crecientes del aptámero (3-26 nM) y NaCl [70 mM]. Los resultados mostraron que 10 nM del aptámero inhiben la agregación de

GNPs en un 50 %. Una concentración del aptámero de 16 nM es suficiente para obtener la máxima inhibición de la agregación de las GNPs (Figura 21).

Como primer acercamiento para analizar el papel de las cargas electrostáticas en la interacción GNPs-VLPs. GNPs no funcionalizadas (80 pM) parcialmente recubiertas con Sc5c3Δ18 (10 mM) se incubaron con concentraciones crecientes de VLPs (100-300 ng) y NaCl 70 mM en ensayos de agregación. Se observó un efecto aditivo de la inhibición de la agregación de GNPs mediada por VLPs y Sc5c3Δ18 (Figura 22). Estos datos sugieren que la carga electrostática no es responsable por la interacción GNPs/VLPs.

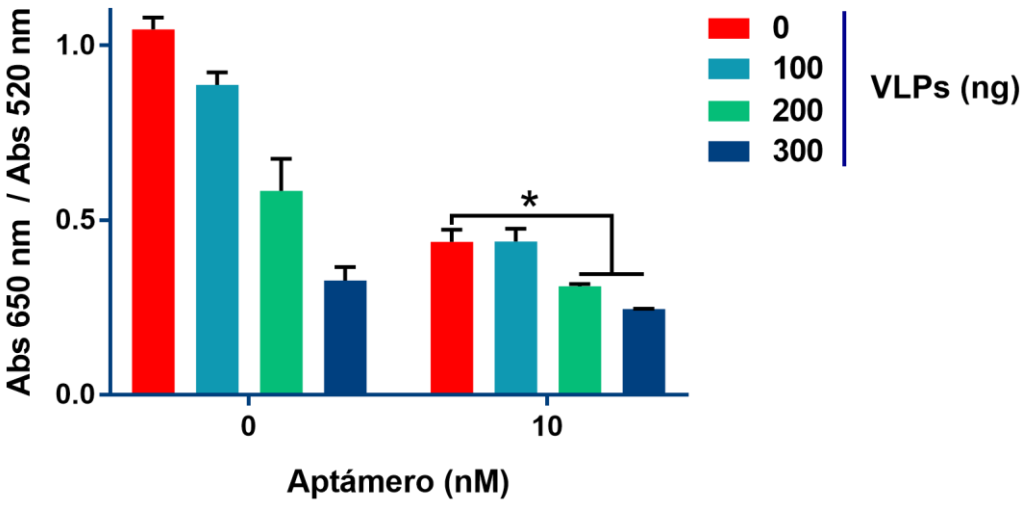

Figura 22. El aptámero y las GNPs poseen un efecto aditivo

Ensayo de agregación para determinar la participación de las interacciones electrostáticas en la interacción GNPs/VLPs. Se colocaron GNPs (80 pM), Sc5-c3D18 (0 y 10 nM), concentraciones crecientes de VLPs (0, 100, 200 y 300 ng), NaCl (70 nM) y se determinó su coeficiente de absorbancia 650 nm / 520 nm. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes. (P = 0.05).

Para demostrar la naturaleza electrostática de la interacción GNPs/VLPs, se usaron VLPs mutantes (L1m6, L1m12 y L1m25), las cuales presentan sustituciones hidrofóbicas (Alanina) en dos o más residuos con carga positiva (Lisina y Arginina), disminuyendo así la carga neta positiva de la superficie de la VLP. Así las VLPs mutantes proveen una plataforma más electronegativa que la L1 silvestre

como lo demuestra su pI calculado (L1 silvestre (wt) pI = 8.55, L1m6 pI = 8.31, L1m12 pI = 7.88 y L1m25 pI = 7.10). Concentraciones crecientes de VLPs wt y mutantes (10-1000 ng) fueron colocadas con GNPs no funcionalizadas (80 pM) con NaCl 70 mM en ensayos de agregación. Los resultados mostraron que las VLPs mutantes (L1m6, L1m12 y L1m25) poseen un mayor efecto inhibitorio que las VLPs wt (L1), indicando que la interacción GNPs-VLPs no es de naturaleza electrostática (Figura 23). De hecho, el mayor efecto inhibitorio de las VLPs mutantes sugiere que un efecto de repulsión de cargas reprime la interacción con VLPs wt. No se observaron diferencias significativas entre la inhibición de cada una de las VLPs mutantes evidenciando que otros factores (hidrofobicidad, fuerzas de Van der Waals, etc), pueden jugar un papel más prominente en la interacción GNPs-VLPs.

16 La interacción GNPs-VLPs es hidrofóbica

Reportes previos han determinado el carácter hidrofóbico de la superficie de las VLPs y que éste es al menos parcialmente responsable por la agregación de las VLPs en suspensión (Shi et al., 2005). Para analizar la posible naturaleza hidrofóbica de la interacción GNPs-VLPs, se realizaron ensayos de agregación en presencia de concentraciones crecientes de etanol (16 a 45 %), solvente menos polar para aumentar la solubilidad de las VLPs reduciendo así la unión hidrofóbica a la superficie de las GNPs no funcionalizadas y promoviendo la agregación de las GNPs (Kang et al., 2001). Los resultados muestran que la agregación de las GNPs se recupera significativamente conforme aumenta la concentración de etanol, confirmando que al menos parcialmente la interacción es de naturaleza hidrofóbica (Figura 24).

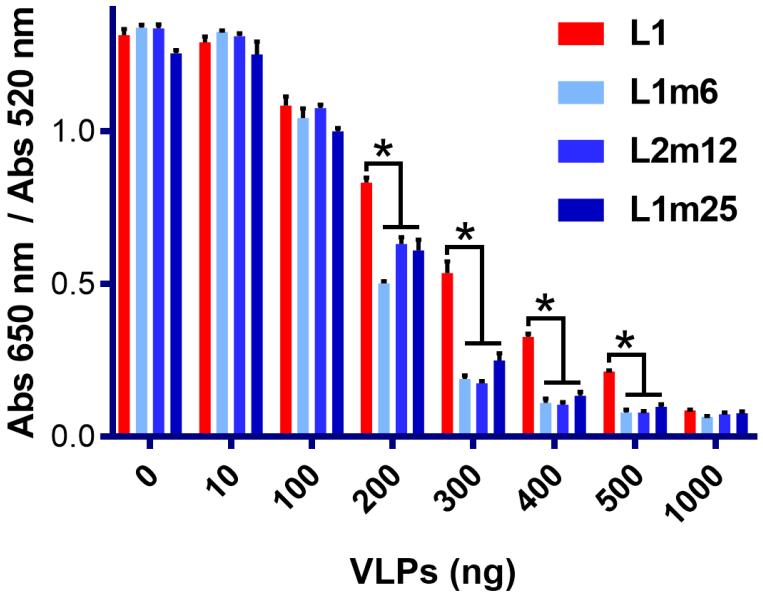

Figura 23. La interacción GNPs-VLPs no es electrostática

Ensayo de agregación para determinar la naturaleza electrostática de la interacción GNPs-VLPs. Se colocaron GNPs (80 pM), concentraciones crecientes de VLPs (0, 10, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 ng), **L1 silvestres** (**rojas**), **L1m6** (K278A-K361A) (**cielo**), **L1m12** (K54A-K278A-K356A-K361A) (**rey**), **L1m25** (K54A-N57A-K59A-K278A-K361A-K442A-K443A) (**marino**) en NaCl (70 nM) y se determinó su cociente de absorbancia 650 nm / 520 nm. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes. (P = 0.0005).

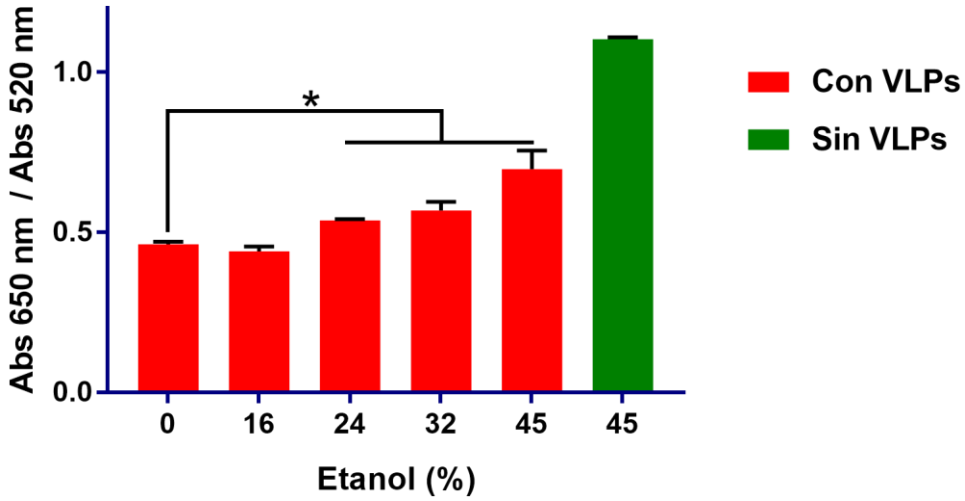

Figura 24. La interacción GNPs/VLPs es hidrofóbica

Para analizar la naturaleza hidrofóbica de la interacción GNPs/VLPs, empleamos un solvente menos polar en el sistema aumentando la solubilidad de las VLPs. Se realizó un ensayo de agregación incubando GNPs no funcionalizadas (80 pM) en concentraciones crecientes de etanol (0, 16, 24, 32 y 45 %) y se adicionaron 500 ng de VLPs en NaCl 70 nM y se determinó su cociente de absorbancia 650 nm / 520 nm.

17 Las GNPs funcionalizadas no interactúan con las VLPs

Los resultados obtenidos demuestran que al menos parcialmente la interacción GNPs-VLPs esta mediada por interacciones hidrofóbicas en la superficie de la GNPs no funcionalizadas y los aminoácidos presentes en la superficie de las VLPs. Por lo tanto, el bloqueo de las interacciones hidrofóbicas en la superficie de las GNPs con una molécula hidrofílica impedirá la interacción con las VLPs. La forma más eficiente de recubrir a las GNPs es tener una molécula con un grupo tiol (-SH), que formar fácilmente un enlace Au-S de tal manera que cualquier molécula con un grupo tiol puede ser fácilmente inmovilizada en la superficie de la nanopartícula (Bain and Whitesides, 1989; Dubois and Nuzzo, 1992). GNPs (40 nm) funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) a través de un grupo tiol fueron incubadas con VLPs de L1 VPH16 y analizadas por TEM. Las microfotografías mostraron que las GNPs funcionalizadas con PEG no interactúan directamente con las VLPs. Las imágenes de TEM muestran un delgado halo blanco alrededor de las GNPs funcionalizadas que demuestran el recubrimiento con PEG (Figura 25).

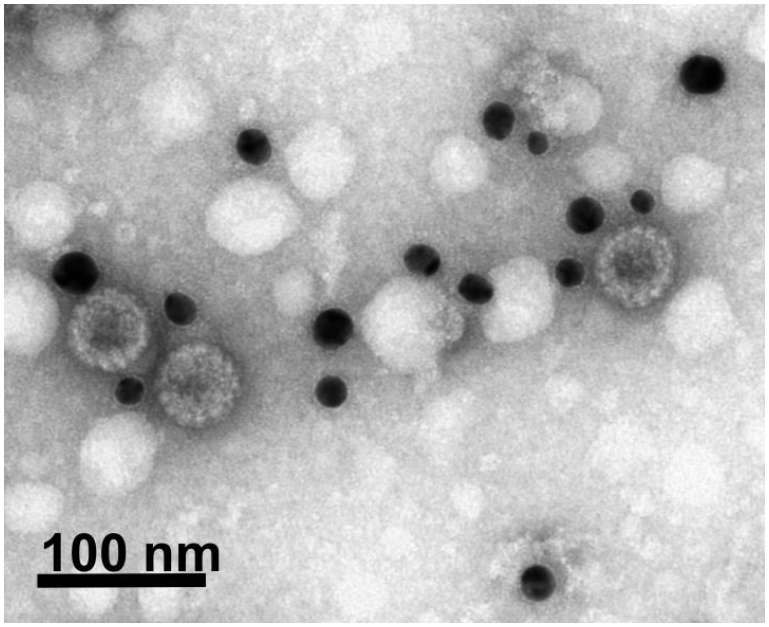

Figura 25. TEM GNPs-PEG y VLPs

TEM de GNP-S-PEG y VLPs. Las VLPs no interactúan con las GNPs con cubierta hidrofílica. Las GNP-S-PEG exhiben un halo blanco perceptible alrededor de la GNP que confirma su funcionalización.

18 Los PsV también inhiben la agregación de las GNPs

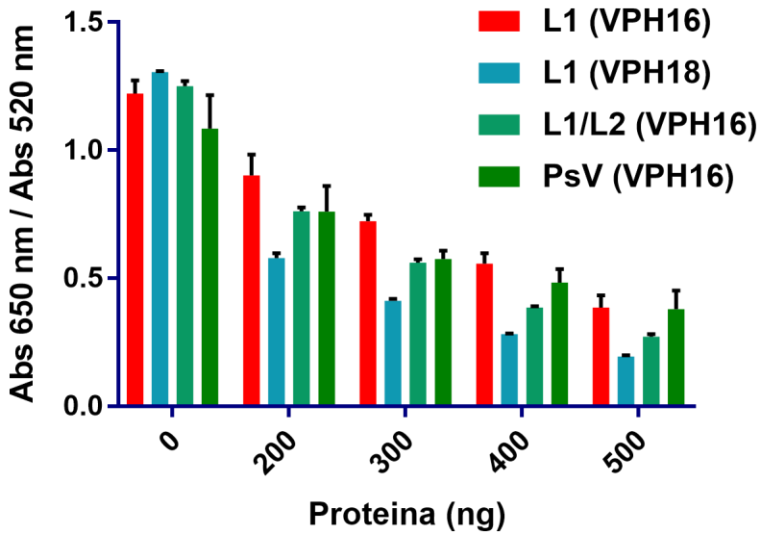

Figura 26. Los PsVs inhiben la agregación de las GNPs
Para determinar si las GNPs interactúan con VLPs L1 VPH18, VLPs L1/L2 VPH16 y PsVs VPH16. Se colocaron concentraciones crecientes de VLPs o PsVs (200, 300, 400 y 500 ng) en 80 pM de GNPs en NaCl 70 nM y se determinó su cociente de absorbancia 650 nm / 520 nm.

Para analizar la relevancia biológica de la interacción GNPs-VLPs, se realizaron ensayos de agregación de GNPs no funcionalizadas usando concentraciones crecientes (200-500 ng) de VLPs y pseudovirus (PsVs) ambos constituidos por las proteínas L1 y L2 del VPH16 (Los PsVs fueron producidos por la M. en C. Diana Gabriela Valencia Reséndiz). Cabe mencionar que los PsVs son el modelo de laboratorio más cercano a los viriones infectivos de VPH16 (Conway and Meyers, 2009). Además, para establecer la especificidad de la interacción también se realizaron ensayos de agregación con VLPs formadas únicamente por la proteína L1 del VPH18. Como control positivo se usaron VLPs de L1 de VPH16. Se observó que la interacción GNPs-VLPs no es exclusiva de las VLPs del VPH16, sino que las VLPs del VPH18 también interactúan con las GNPs (Figura 26). Esto se explica porque las proteínas L1s son muy similares entre los VPHs. Sin embargo, se pudo apreciar que una diferencia significativa en el cociente 650 nm / 520 nm entre las VLPs de los VPH16 y 18, lo que sugiere que los ensayos de agregación son sensibles a diferencias en el contenido aminoacídico de L1

(Figura 27). Las VLPs constituidas por las proteínas L1/L2 bloquean la agregación de las GNPs de manera semejante a las VLPs de L1, ya que la proteína L2 interactúa con L1 en la parte interna de las VLPs y solo un pequeño fragmento puede estar expuesto en la superficie que no afectó la interacción con GNPs. Los PsVs constituidos por L1 y L2, también bloquean la agregación de las GNPs sugiriendo que las GNPs no funcionalizadas podrían interactuar con viriones infecciosos de VPH16 (Figura 26).

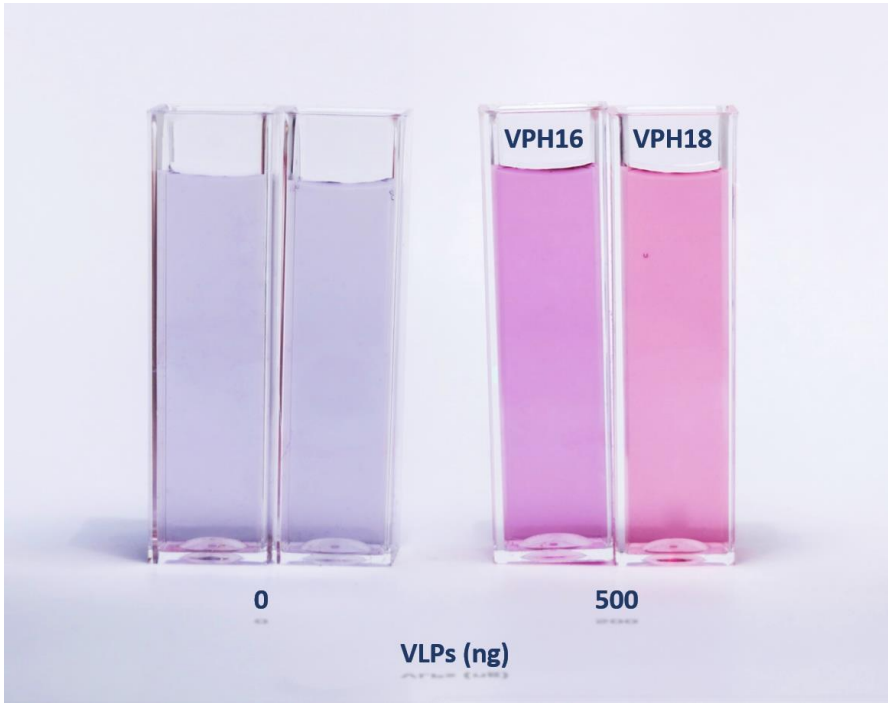

Figura 27. Fotografia de la inhibición de GNPs del VPH16 y VPH18
Fotografía de la inhibición de la agregación de las GNPs por VLPs. Se realizaron ensayos de agregación empleando 500 ng de VLPs de VPH16 y VPH18, en 80 pM de GNPs. Las GNPs presentan un color azul característico, en presencia de VLPs VPH16 presentan un color rojo, las GNPs con VLPs del VPH18 presentan un color más rojo que las GNPs-VLPs del VPH16 lo que indica que las VLPs del VPH18 interactúan más con las GNPs, inhibiendo mejor su agregación.

Capítulo 8

Discusión

"Todo el mundo es un genio. Pero si juzgas a un pez por su habilidad para trepar árboles, vivirá toda su vida pensando que es un inútil"

Albert Einstein

Las GNPs se han convertido en una importante herramienta para el desarrollo de biosensores ópticos; sin embrago, sus interacciones con materiales y otras entidades biológicas no se han comprendido por completo. El presente trabajo muestra por primera vez la interacción no covalente entre GNPs no funcionalizadas y estructuras virales del VPH16 (VLPs y PsV) y brinda la oportunidad de estudiar las fuerzas estabilizadoras de la interacción de un aptámero de RNA con materiales de diferente naturaleza química como lo son las GNPs (oro) y las VLPs (proteínas).

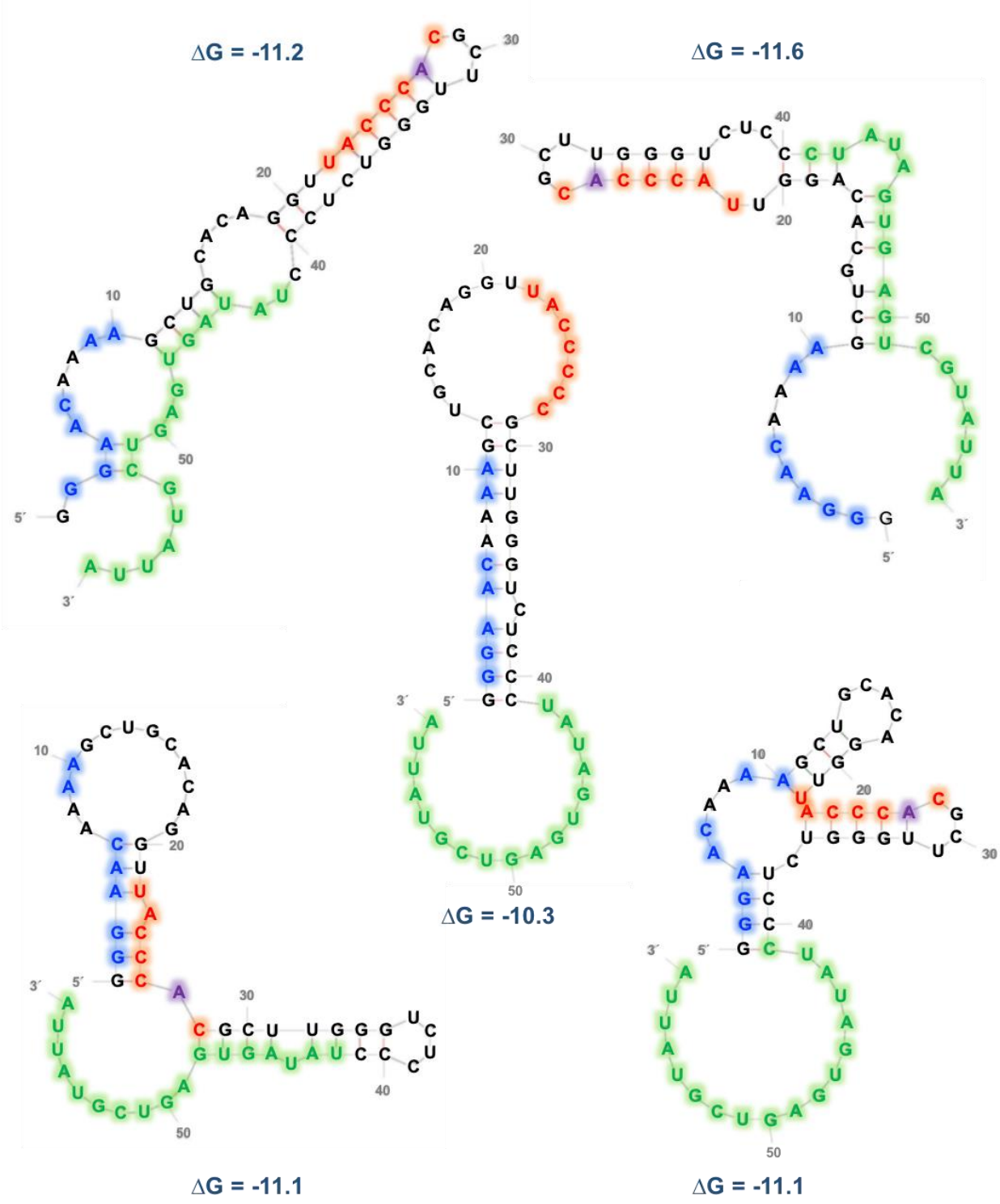

Figura 28. Sc5-c3 y predicción estructural de Sc3-c3 C27A

Predicción de estructura secundaria de Sc5-c3 C27A (mFold), se indican los ΔG. En el centro se muestra la estructura secundaria de Sc5-c3 obtenida empleando mapeo con RNasas. En **verde** se marcan las bases de la región 3´no estructurada, en **rojo** y **azul** se marcan las bases protegidas por las VLPs al corte con RNasas, en **rojo** la cadena sencilla y en **azul** la doble cadena, en **morado** se marca la mutación C27A.

La interacción reportada entre Sc5-c3 y las VLPs estableció que el ML interactúa directamente con la estructura cuaternaria de L1 dentro de la VLP (Leija-Montoya et al., 2014), pero no estableció los puntos de contacto. Los resultados presentados aquí no demuestran una participación directa de las bases nitrogenadas A, C y G ubicadas dentro del ML en la formación del complejo Sc5-c3-VLPs, como lo sugiere la ausencia de interacción de la versión de DNA de Sc5-c3. Por su parte, el híbrido DNA/RNA de Sc5-c3 reconoce a las VLPs, confirmando que el aptámero interactúa con las VLPs a través de grupos 2´-OH y/o el uracilo. Las posiciones de naturaleza ribonucleotídica en el híbrido sólo incluyen un uracilo, lo que fuertemente sugiere que el grupo 2´-OH mediar la interacción con las VLPs, implicando que cualquier secuencia de RNA podría tener al menos una unión residual, como se reportó anteriormente (Leija-Montoya et al., 2014). El grupo 2´-OH es un potencial donador de puentes de hidrogeno lo que sugiere que las VLPs exponen potenciales aceptores de puentes de hidrogeno como grupos amino. Se han reportado numerosos grupos amino importantes para la interacción con heparan sulfato, receptor primario de las VLPs (Dasgupta et al., 2011). Esta teoría no es consistente con la observación de la disminución dosis dependiente del reconocimiento de los aptámeros en presencia de NaCl, el cual no es capaz de romper los puentes de hidrógeno, pero si podría modificar la estabilidad molecular de los aptámeros o modificar la estructura proteica de las VLPs (Shi et al., 2005). Es remarcable que el híbrido Sc5-c3 haya perdido 20 % del reconocimiento, lo que sugiere fuertemente que existen otros puntos de contacto en el RNA del aptámero que son necesarios para alcanzar la máxima unión. Sin embargo, el híbrido DNA/RNA Sc5-c3Δ18 conservó solo 40 % de la unión a las VLPs, por lo que los puntos de contacto con el blanco son probablemente distintos entre Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18. La Kd de Sc5-c3Δ18 es de 2 pM, 40 veces más grande que la reportada para Sc5-c3 (Leija-Montoya et al., 2014), lo que demuestra que Sc5-c3Δ18 no interactúa tan fuertemente como Sc3-c3. Esto se puede deber a que al deletar 18 bases del extremo 3´ se elimina algún punto de contacto no identificado o interacciones inespecíficas conducidas por

el 2´-OH que contribuyen a la determinación de la unión total, estos resultados contribuyen a la hipótesis de que los Sc5-c3 y Sc5-c3Δ18 poseen diferentes puntos de contacto y por ende exhiben diferentes constantes de unión. En este punto no es claro si la región no estructurada 3' de Sc5-c3 participa en la unión a VLPs o bien su ausencia provoca una re-estructuración del aptámero.

La estabilización de la cadena sencilla en el ML de Sc5-c3 entre G19-G20 y C25-C27 no modificó la unión con las VLPs, y podría no ser representativa de la estructura que adopta el aptámero unido al blanco, también es posible que la unión adaptiva del aptámero desplace este apareamiento o que el reconocimiento sea independiente de la cadena sencilla en el ML.

La mutante Sc5-c3 C27A pierde el 90 % del reconocimiento por las VLPs. Hipotetizamos que el cambio de base de citosina por adenina en la posición 27 modifica radicalmente la estructura del aptámero. Empleando el servidor mFold (http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold) se realizaron predicciones estructurales de la mutante Sc5-c3 C27A. En la Figura 28 se muestran las cuatro estructuras más estables, cabe destacar que estas poseen un ΔG más negativo que Sc5-c3 implicando mayor estabilidad, lo que apoya fuertemente que la idea que la mutante Sc5-c3 C27A esté adoptando alguna de las configuraciones calculadas. También, realizamos la predicción estructural para Sc5-c3Δ18 y sus mutantes (datos no mostrados), pero no se obtuvieron estructuras diferentes a las adoptadas por el aptámero, lo cual explica porque todas las Sc5-c3Δ18 mutantes se unieron eficientemente a las VLPs, probablemente la ausencia de la región 3´ no estructurada de Sc5-c3 limita la diversidad estructural de Sc5-c3Δ18.

Realizamos un análisis profundo de las estructuras calculadas para Sc5-c3 C27A (Figura 28) e identificamos que la región 3´no estructurada de Sc5-c3 (bases en **verde**), se encuentra envuelta en la formación de dobles cadenas en 3 de las cuatro estructuras predichas, de tal manera que está región aumenta la diversidad estructural de Sc5-c3. Por otro lado, con el propósito de analizar la perdida de la funcionalidad de Sc5-c3 C27A, en las estructuras predichas *in silico* marcamos en **rojo** y **azul** las bases que se encuentran en contacto directo con

las VLPs. En **rojo** se marcan las bases en cadena sencilla y en **azul** las bases en doble cadena en la estructura de Sc5-c3. En todas las estructuras calculadas las bases que en Sc5-c3 se encontraban en cadena sencilla (**rojas**) ahora se encuentran formando doble cadena en Sc5-c3 C27A, implicando que probablemente ya no son capaces de interactuar con el blanco. Para todos los casos al menos 2 bases que estaban formando doble cadena (**azules**) ahora se encuentran en cadena sencilla. Este hecho podría perturbar fuertemente la interacción con el blanco ya que las bases azules adoptarían una estructura compacta de doble cadena y ahora esta región se estructura parcialmente como cadena sencilla impidiendo la interacción con las VLPs debido a que adopta una estructura tridimensional relajada que podría no ser compatible con el nicho para una doble cadena.

Las GNPs han sido ampliamente utilizadas para generar métodos de detección de bajo costo, combinadas con tecnologías de reconocimiento de proteínas basadas en novedosos ácidos nucleicos (tales como aptámeros y aptazimas) de asequible y fácil síntesis en masa (Zhang et al., 2013a). Sin embargo, las características distintivas de la cápside del VPH y otras proteínas de VPH requieren un conocimiento más profundo de su interacción con GNPs. El presente trabajo descubrió y caracterizó la interacción directa entre GNPs no funcionalizadas y VLPs y PsVs de VPH16 y VLPs de VPH18 (Palomino-Vizcaino et al., 2018).

Las VLPs impiden la agregación de la GNPs en 70 mM de NaCl, este fenómeno no había sido reportado previamente en la literatura. Como proteína control empleamos BSA, la cual se comporta de acuerdo a lo esperado interactuando con las GNPs. A diferencia de la BSA, las VLPs tienen una marcada predilección por las GNPs, como muestra la gráfica de inhibición de la agregación de GNPs, las VLPs interactúan rápida y fuertemente con las GNPs de tal manera que tenemos un efecto inhibitorio de >90 % con 400 ng, mientras que con BSA solo 20 %. Las microfotografías electrónicas muestran que las GNPs se adhieren a las VLPs alrededor o sobre ellas y que las GNPs funcionalizadas con

polietilenglicol (GNP-S-PEG) no interactúan con las VLPs. Los resultados también muestran que la interacción GNPs-VLPs no es exclusiva de VPH16, sino que también se presenta empleando VLPs L1 (VPH18), VLPs L1/L2 (VPH16) y PsV (VPH16).

La gran variedad de efectos funcionales del oro y otros nanomateriales con las proteínas, justifica la necesidad de entender y controlar las interacciones entre GNPs no funcionalizadas y proteínas (Bailes et al., 2012). Estudios extensivos en la estabilidad de las VLPs sugiere que son inherentemente inestables debido a interacciones superficiales hidrofóbicas, las cuales son, al menos, parcialmente responsables de la agregación de grandes conglomerados con un tamaño de 240 nm (Shi et al., 2005). Los agregados formados por VLPs purificadas fueron disgregados en partículas individuales de 60 nm por la interacción con GNPs no funcionalizadas. Sin embargo, no se observaron GNPs libres en la suspensión, indicando una sustancial interacción GNP-VLPs, en la que cada nfGNPs interactúa con la superficie de las VLPs.

La adición de concentraciones más altas de NaCl después de la formación de los complejos nfGNPs-VLPs gradualmente restauró su agregación, sugiriendo la existencia de dos estados estructurales de las VLPs: 1) una "estructura hinchada" en un ambiente de baja sal con una superficie expuesta altamente hidrofóbica (0.08 M NaCl); y 2) una "estructura compacta" en ambientes de alta sal con menos superficie hidrofóbica expuesta (1 M NaCl) (Shi et al., 2005). Entonces, una vez que la concentración de NaCl es suficientemente alta, la agregación de las GNPs se desencadena debido al cambio en la hidrofobicidad de la superficie de las VLPs permitiendo la agregación de las GNPs y el consecuente cambio de color.

Cuando las GNPs, VLPs y el aptámero de RNA coexisten en el mismo sistema, se esperaba que la interacción específica del aptámero con las VLPs prevaleciera (Leija-Montoya et al., 2014). No obstante, la interacción de las GNPs no funcionalizadas con ambos, las VLPs y el aptámero, conduce el sistema hacia la inhibición de la agregación de GNPs. La reducción de la carga neta positiva

en la superficie de las VLPs mutantes no incrementó la agregación de las GNPs como lo establece una interacción exclusivamente electrostática. Por el contrario, la substitución de residuos positivamente cargados (Lisina y Asparagina) por el aminoácido de carácter hidrofóbico Alanina, potenció la agregación, revelando que una carga positiva en la superficie de la VLPs es de hecho un impedimento para una rápida unión entre nfGNPs-VLPs, como ocurre con una interacción hidrofóbica. A pesar de que no existe información disponible acerca de la hidrofobicidad de las cápsides de VPH, nuestros resultados muestran que la superficie VLPs VPH18 es más hidrofóbica que las VLPs VPH16 basados en el color que adoptan las nfGNPs, sugiriendo una sencilla herramienta de tipificación de VPH.

El efecto de un solvente medianamente polar (etanol) en la interacción GNPs-VLPs mostró una solubilidad incrementada de las VLPs, ocasionando una menor disponibilidad de VLPs para interactuar con la superficie de las GNPs recuperando parcialmente su agregación. En una superficie hidrofóbica las moléculas de agua en contacto con las dos superficies hidrofóbicas serán desplazadas hacía del ambiente circundante reduciendo la energía total del sistema, resultando en una interacción favorable entre las superficies hidrofóbicas de las VLPs y GNPs, como se reportó recientemente para una plataforma de detección del virus de influenza (Ahmed et al., 2017). Cabe mencionar que la adición de etanol en el sistema podría modificar fuertemente la estructura proteica de las VLPs a pesar de emplear concentraciones bajas de etanol y se requerirán experimentos complementarios para determinar hasta qué punto la recuperación de la agregación de las GNPs observada es debida efectivamente a un aumento en la solubilidad de las VLPs o a la perdida de la estructura de las mismas. Sin embargo, el uso de GNPs como una plataforma para el diagnóstico de VPH debe primero superar el fuerte efecto hidrofóbico presente en VLPs y oligonucleótidos de cadena sencilla a través de la neutralización de los grupos funcionales específicos de la superficie de las GNPs (iones citrato), empleando agentes bloqueadores y/u otras estrategias de síntesis.

Previos reportes de la interacción de GNPs con cápsides virales emplearon GNPs funcionalizadas específicamente adaptadas al tipo viral. Maerjomaki *et al.* reportaron una conjugación covalente sitio-especifica de GNPs funcionalizadas con maleimida a cisteínas especificas en las proteínas de la cápside viral del enterovirus echovirus 1 y coxsackievirus B3. La incubación con GNPs no funcionalizadas no mostró asociación con las cápsides virales (Marjomaki et al., 2014). En una aproximación diferente empleando GNPs-SO_4Na para inhibir la unión del virus de la estomatitis vesículas a la superficie celular, se mostró que las GNPs funcionalizadas de diámetros iguales o mayores al del virus (>50 nm) actuaban como puentes (cross-linkers) entre viriones. En contraste, mientras más pequeño el diámetro de las GNPs, éstas sólo se depositaban en la superficie de los viriones individuales. De nuevo, las GNPs no funcionalizadas no mostraron unión al virus (Vonnemann et al., 2014).

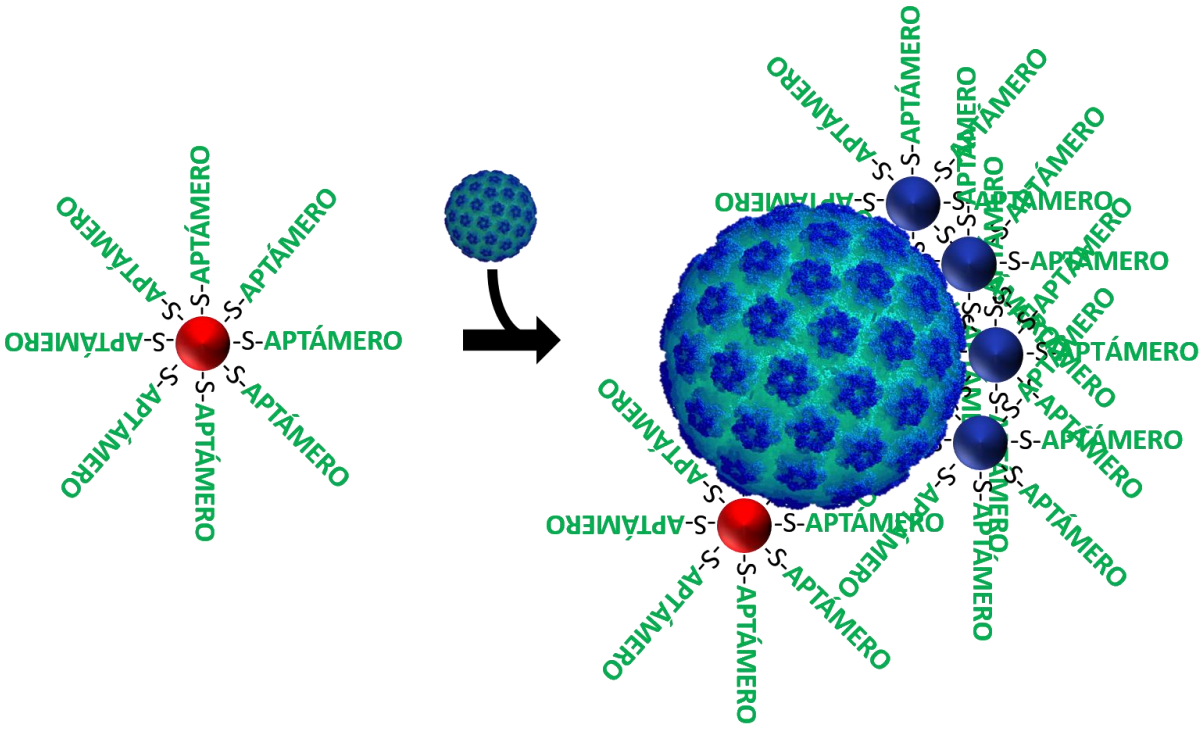

Figura 29. Segundo diseño de biosensor

Segundo diseño de un biosensor. Las GNPs serán funcionalizadas con el aptámero, el aptámero dirigirá a las GNP a la superficie de las VLPs, cuando dos o más GNPs se encuentren a una distancia menor a la de su diámetro, entonces las GNPs pasaran de un color rojo a azul.

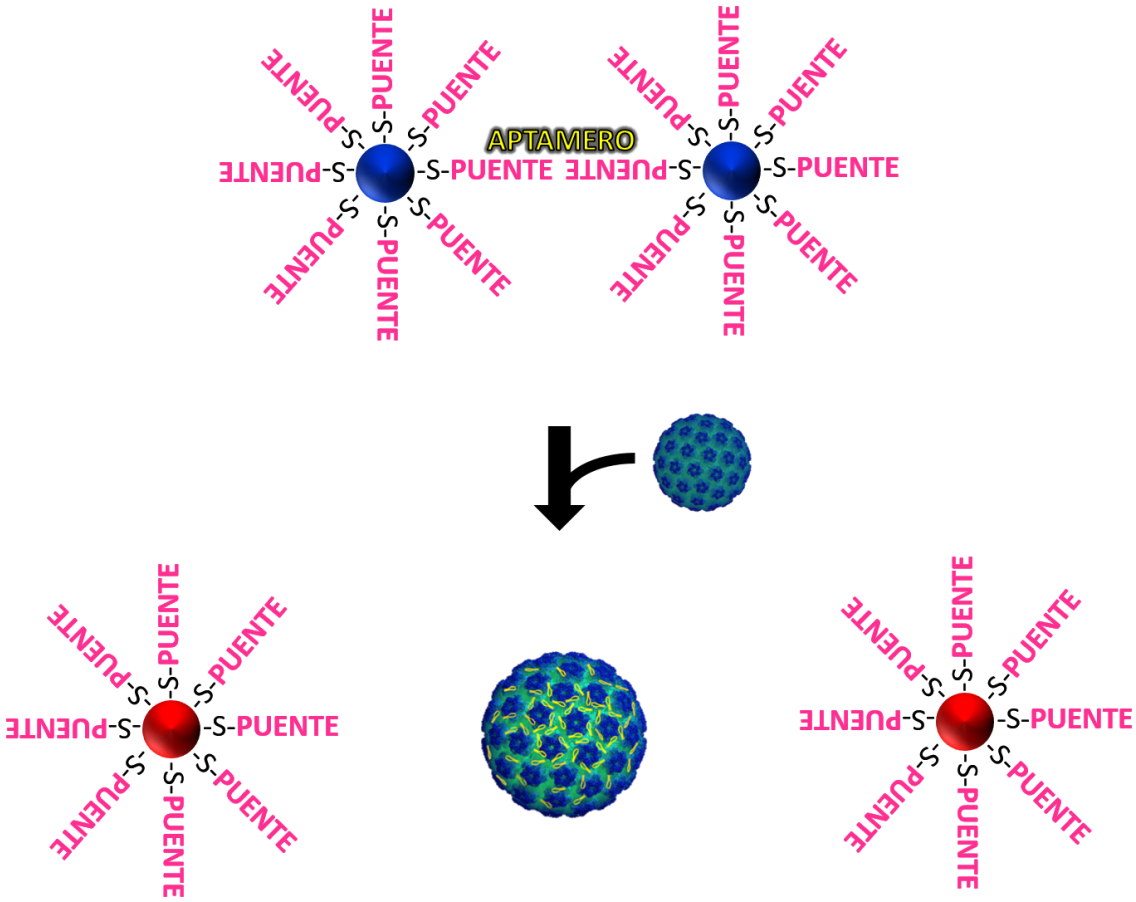

Figura 30. Tercer diseño de biosensor

Tercer diseño de un biosensor. Las GNPs serán funcionalizadas con oligonucleótidos parcialmente complementarios al aptámero Sc5-c3. El aptámero hibrida con dos oligodeoxinucleotidos a la vez, de tal manera que anclara dos GNPs lo suficientemente cerca para que estas exhiban un color azul. Cuando las partículas virales se encuentren en el sistema el aptámero se unirá a las VLPs liberando las GNPs que cambiaran de color de azul a rojo.

Ya que la interacción entre GNPs no funcionalizadas y VLPs imposibilita el desarrollo del biosensor bajo el diseño propuesto y que se demostró que la funcionalización de las GNPs bloquea la interacción GNPs-VLPs, planteamos dos diseños adicionales para detectar VPH empleando GNPs funcionalizadas. En un diseño alternativo, las GNPs son funcionalizadas completamente con el aptámero Sc5-c3 inmovilizado en la superficie de las GNPs a través de un grupo tiol. Las GNPs recubiertas serán dirigidas específicamente por el aptámero a la superficie de las VLPs, de tal manera que cuando se encuentren 2 o más GNPs

sobre una VLP a una distancia menor a la de sus diámetros, se generará un cambio de color de rojo a azul (Figura 29).

El otro diseño usaría GNP funcionalizadas completamente con oligonucleótidos "puentes" parcialmente complementarios al aptámero Sc5-c3. Al hibridar con los oligonucleótidos "puente" anclados a las GNPs, el aptámero acercaría las GNPs lo suficiente para que las nanopartículas muestren un color azul. La hibridación Watson-Crick del aptámero-puente formaría aglomerados de GNPs que serán separados por la presencia de viriones de VPH que desplazaría el aptámero al ser más afín a las VLPs que las secuencias hibridadas de los puentes. Un biosensor bajo este diseño generará un cambio de color de azul a rojo cuando las partículas virales sean identificadas por el aptámero (Figura 30).

Capítulo 9

Conclusiones

"Lo más difícil de todo es tomar la decisión de pasar a la acción. El resto es meramente tenacidad"
– Amelia Earhart

La interacción GNPs-VLPs es reversible, no covalente, y es el resultado de fuerzas hidrofóbicas no caracterizadas previamente en la superficie del virión.

La interacción GNPs-VLPs reportada aquí puede contribuir al desarrollo de biosensores confiables para el diagnóstico y prognosis de VPH para controlar y prevenir el cáncer cervical.

Capítulo 10

Perspectivas

"El científico no es aquella persona que da las respuestas correctas, sino aquél quien hace las preguntas correctas."

-Claude Lévi-Strauss

Comprobar si la pérdida del reconocimiento de Sc5-c3 C27A por VLPs esta mediada por una diferente estructuración.

Elucidar si los puntos de contacto entre Sc5-c3Δ18 y VLPs difieren de los reportados para Sc5-c3 empleando ensayos de protección a nucleasas.

Evaluar los dos nuevos diseños del biosensor para VPH16 basados en nanopartículas funcionalizadas y Sc5-c3 antes propuestos.

Valorar si usando etanol evitamos la interacción GNPs-VLPs a bajas concentraciones de VLPs.

Capítulo 11

Anexo

"La ciencia no es más que sentido común
amaestrado y organizado.
-Thomas Huxley

Biosensors and Bioelectronics 100 (2018) 176–183

Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios

Effect of HPV16 L1 virus-like particles on the aggregation of non-functionalized gold nanoparticles

Giovanni Palomino-Vizcaino[a], Diana Gabriela Valencia Reséndiz[a], María Luisa Benítez-Hess[a], Natalia Martínez-Acuña[a], Juana Virginia Tapia-Vieyra[a], Daniel Bahena[b], Mauricio Díaz-Sánchez[c], Octavio Patricio García-González[c], Brenda Arizaí Alvarez-Sandoval[c], Luis Marat Alvarez-Salas[a,*]

[a] Laboratorio de Terapia Génica, Departamento de Genética y Biología Molecular, México
[b] Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica (LANE), Centro de Investigación y de EstudiosAvanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México D.F., México
[c] R,D & Innovation Department, Genes2Life S.A.P.I. de C.V., Irapuato, Guanajuato, México

ARTICLE INFO

Keywords:
Papillomavirus
Gold nanoparticles
Viral proteins
HPV
Virus-like particles
Molecular interaction
Binding

ABSTRACT

Colorimetric assays based on gold nanoparticles (GNPs) are of considerable interest for diagnostics because of their simplicity and low-cost. Nevertheless, a deep understanding of the interaction between the GNPs and the intended molecular target is critical for the development of reliable detection technologies. The present report describes the spontaneous interaction between HPV16 L1 virus-like particles (VLPs) and non-functionalized GNPs (nfGNPs) resulting in the inhibition of nfGNPs salt-induced aggregation and the stabilization of purified VLPs. Ionic-competition experiments suggested that the nature of nfGNPs-VLPs interaction is non-covalent. Adsorption of an RNA aptamer on nfGNPs surface showed an additive aggregation-inhibitory effect. The use of mutant VLPs confirmed that the interaction nfGNPs-VLPs is not mediated by the opposing superficial electrostatic charges, suggesting that non-electrostatic forces participate in the arrangement of nfGNPs on the VLPs surface. Competition experiments using increasing ethanol concentrations on nfGNPs-VLPs complexes suggested hydrophobic interactions as the main stabilizing force. Therefore, the nfGNPs-VLPs interaction described here should facilitate the development of adsorption assays based on nfGNPs for HPV detection and cervical cancer prevention.

1. Introduction

In the last few years, metallic nanoparticles (MNPs) such as gold nanoparticles (GNPs) and silver nanoparticles (SNPs) became a valuable aid for the biodetection of molecules with high sensitivity, specificity and accuracy. These MNPs nanostructures range in size from 1 to 100 nm and display distinctive physicochemical properties depending on the size and shape, including well-known surface plasmon resonance and fluorescence enhancement effects (Grzelczak et al., 2010). Plasmonic nanoparticles (GNPs and SNPs) act as transducers that convert changes in the local refractive index into spectral shifts of the localized surface plasmon resonance (LSPR) band. GNPs and SNPs have been used as small-volume, ultra-sensitive label-free optical sensors, GNPs are often preferred because, unlike SNPs, they present as chemically stable in biofluids and laboratory conditions and resist surface oxidation, plus they exhibit a wide plasmon line width have a narrow plasmon line width (Szunerits and Boukherroub, 2012).

Colorimetric detection is one of the easiest and most powerful methods available using GNPs. The strong color change from red to blue is a result of particle-particle plasmonic coupling. As the distance between the GNPs decreases, near-field coupling becomes dominant resulting on strong enhancement of the localized electric field within the interparticle spacing, producing a pronounced red shift in the LSPR frequency. The clearly distinguishable color red shift facilitates a very simple sensor readout that often can be performed with the naked eye. N. Shwetha *et. al.* reported a simple colorimetric system based on the interaction of GNPs with an aptamer for detection of p53, a tumor suppressor protein (Elghanian et al., 1997; Liu et al., 2015; Shwetha et al., 2013; Vilela et al., 2012). Other colorimetric technologies have also been reported using H_2O_2-driven biomimetic catalysts to detect a variety of molecules (Deng et al., 2017; Liu et al., 2015, 2017; Sun

* Corresponding author.
E-mail address: lalvarez@cinvestav.mx (L.M. Alvarez-Salas).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.001
Received 27 January 2017; Received in revised form 28 August 2017; Accepted 1 September 2017
Available online 04 September 2017
0956-5663/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

et al., 2017; Zhang et al., 2017).

GNPs are biocompatible and have unique optical and electric features that contribute to new developments for the so-called theranostics technologies (therapy and diagnostics) (Adura et al., 2013; Hirsch et al., 2003; Kogan et al., 2007). Different forms of GNPs, such as nanospheres, nanorods, nanoshells and hollow nanospheres, have been studied for biomedical applications such as imaging and biosensing as well as the delivery of either genes or antitumor drugs for cancer diagnosis and therapy (Hirsch et al., 2003; Kohler et al., 2005).

GNPs conjugation (functionalization) with biomolecules such as oligonucleotides, proteins and small molecules has been extensively used in several novel biodetection methods due to the high surface-to-volume signaling ratio produced by GNPs-enabled conjugates. However, the native physicochemical properties of nfGNPs in suspension may render them unstable and will gradually undergo aggregation and precipitate as metallic gold powder. nfGNPs stabilization by protective or capping agents such as thiols or citrate prevents uncontrolled aggregation allowing for long-term storage. The protecting agent generally forms a monolayer coat (ligand shell) that plays an essential role against aggregation, improving solubility and electron-transfer efficiency while allowing controlled shape and assembly, thus providing a suitable platform for functionalization (Alex and Tiwari, 2015). Thus, a deep understanding of the interaction between the protective coat, the functionalization group and the intended molecular target is critical for the development of reliable GNPs-based technologies.

High-risk human papillomaviruses (HPVs), particularly HPV type 16 (HPV16) and type 18 (HPV18), are causally associated with the onset and prevalence of anogenital tumors including cervical carcinoma (Zur Hausen, 2002). The small (55 nm) icosahedral HPV capsids are composed by the L1 (the major component of the capsid) and the L2 proteins. L1 is arranged in 72 capsomers in a T = 7d icosahedral surface lattice (360 L1 units in total) stabilized via interlocking L1 peptidic arms through hydrophobic interactions and disulfide bridging (Buck et al., 2008). Each capsomer usually contains five L1 55 kDa monomers (pentamer) with a central doughnut-like cavity occupied by a monomeric L2 protein (Bishop et al., 2007; Finnen et al., 2003). Because the embedded location of the L2 protein, the exterior surface of HPV capsids mainly exposes five electropositive loops contained within L1 structure (Buck and Trus, 2012).

HPV16 L1 lysine residues K278 and K361 located atop the pentamer are recognized as the primary attachment sites to heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) on the epithelial cell surface or on the basal membrane (Johnson et al., 2009; Knappe et al., 2007; Richards et al., 2013). Cell-surface HSPGs are linear and negatively charged oligosaccharides covalently linked to superficial proteins. Other L1 binding sites encompassing residues K54 and K356; N57, K59, K442, and K443, do not affect attachment to the cell surface or basement membrane, but the virus infectivity is significantly impaired (Selinka et al., 2007). HSPGs are also described as binding receptors for other genital HPV types such as HPV11 and HPV18 (Chen et al., 2000; Joyce et al., 1999; Shafti-Keramat et al., 2003). All these studies suggest that the HPV capsid is strongly electropositive in nature and may engage in electrostatic interactions with any material with exposed electronegative charges.

The present work analyzed and characterized a previously unknown interaction of HPV16 L1 virus-like particles (VLPs) with 20 nm non-functionalized GNPs (nfGNPs). VLPs binding prevented nfGNPs aggregation thus inhibiting the characteristic color-shift (red to blue) of aggregated nfGNPs in the presence of NaCl. The inhibition was lifted by addition of higher NaCl concentrations and was similarly observed for HPV18 VLPs. The inhibitory aggregation effect of the adsorption of an RNA aptamer on nfGNPs surface added but not competed to the VLPs inhibitory effect. nfGNPs-VLPs interaction also disrupted purified VLPs clusters (a known hydrophobic feature of HPV VLPs). Less electropositive mutant HPV16 L1 VLPs showed a better inhibition of aggregation, demonstrating that electrostatic interactions are dispensable for nfGNPs-VLPs interaction. Moreover, nfGNPs aggregation inhibition was lifted by using a mildly polar competitor, confirming the participation of hydrophobic forces in the nfGNPs-VLPs interaction. Therefore, the nfGNP-VLPs interaction can be considered for the future development of GNPs-based methods for HPV and cervical cancer theranostics.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All reactives were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis MO, USA) unless otherwise indicated. Prior to GNPs synthesis, all glassware and stir bars were submerged in *aqua regia* (3:1 HCl:HNO_3) and thoroughly rinsed with deionized water (18.2 MΩ).

2.2. Synthesis of GNPs

GNPs were prepared by a modified Turkevich method essentially as described (Schneider and Decher, 2008). Briefly, deionized water (45 ml) was added to a reaction flask and refluxed on a hot plate. A mixture of 5 ml 0.1% tetrachloroauric acid, 2 ml 1% trisodium citrate and 42.5 μL 0.1% silver nitrate was slowly added dropwise. Synthesis reactions were carried out for 60 min and allowed to cool-down to room temperature to assure even GNPs size distribution. The reduction of suspended gold metal ions (Au^{3+}) to yield GNPs (Au°) was confirmed by the appearance of a characteristic dark cherry red color. Colloidal GNPs were stored at 4 °C until used. GNPs concentration was determined by UV–vis spectra, using the equation $c = A_{450}/\varepsilon_{450}$ where c is the concentration in mol per liter, A_{450} is the absorbance at 450 nm and ε_{450} is the molar extinction coefficient for GNPs of 21 nm (6.31×10^8 $M^{-1}cm^{-1}$) (Haiss et al., 2007). GNPs size was determined using dynamic light scattering (DLS) in a Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, UK) with detection at 90° (Zheng et al., 2016) and GNPs shape was confirmed by high-angle annular dark field scanning transmission electron microscopy (HAADF-STEM) in a JEM-ARM200F transmission electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) (Khanal et al., 2014).

2.3. Oligonucleotides and plasmids

All oligonucleotides were purchased from T4 oligo® (ADN Sintético S.A.P.I., Gto. México). Mutant HPV16 L1 clones were kindly donated by Dr. Martin Sapp (Department of Microbiology & Immunology, LSU Health Sciences Center). The L1 mutants L1m6 (K278A-K361A), L1m12 (K54A-K278A-K356A-K361A) and L1m25 (K54A-N57A-K59A-K278A-K361A-K442A-K443A) were amplified with primers FwL1*Xho*I (5′-ATC TCG AGT AAT GAG CCT GTG GC-3′) and RvL1*Hin*dIII-*Eco*RI (5′-CGG CCA TGA ATT CAA AAA GCT TCA CAG CTT CCT CTT-3′) using *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™, Carlsbad CA, USA). The PCR products were digested with the endonuclease *Xho*I and *Hin*dIII New England BioLabs® (Ipswich Massachusetts, USA). The theoretical isoelectric point (pI) was calculated using ProtParam server (http://web.expasy.org/protparam/). HPV18 L1 was amplified from pSHPV18 (Woodworth et al., 1989), with primers L118FB (5´-AAG AAT TCA TGG CCC TCT GGA-3´) and L118FBrev (5´-AAA AGC TTT CAT TTG CGT GCC CTC A-3´) using *Taq* DNA polymerase. The PCR product was digested with the endonuclease *Bgl*II and *Hin*dIII New England BioLabs®. Digested PCR products were ligated in the pFB1 using a T4 DNA ligase New England BioLabs®. The Ligation and PCR reaction were prepared according to the manufacturer's directions.

2.4. HPV16 L1 virus-like particles (VLPs) production

HPV16 and 18 L1 recombinant baculoviruses were produced using Invitrogen™ Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen), with the shuttle construct pFB1 (*Xho*I/*Hin*dIII) and *Escherichia coli* DH10Bac™ (F¯*mcr*A Δ(*mrr*-hsdRMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 Δ(*ara, leu*)7697 *gal*U *gal*K λ¯*rps*L *nup*G/ pMON14272/pMON7124) cells as described by the manufacturer. Production of HPV16 and 18 L1 virus-like particles (VLPs) were made by recombinant baculovirus infection essentially as described (Buck et al., 2004; Leija-Montoya et al., 2014). Briefly, L1-producing recombinant baculovirus were used to infect proliferating *Spodoptera frugiperda* Sf21 cells (Life Technologies Corporation, Carlsbad CA) in Sf900™II medium (Life Technologies) for 72 h at 26 °C. Infected cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 4 cell pellet volume of Lysis buffer (9.5 mM $MgCl_2$ and 0.25% Brij® 58) in 1X Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4, 137.93 NaCl mM and 8.06 mM Na_2HPO_4–$7H_2O$ pH 7.2–7.7) complemented with cOmplete™ protease inhibitor cocktail (Sigma Chemicals Co., St. Louis MO) in siliconized microtubes and lysed by sonication in a GEX 130 PB ultrasonic processor (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL) at 60% cycle duty 3 times (5 s each). Total lysates were incubated overnight at 37 °C for VLPs maturation (Buck et al., 2005), and digested at 37 °C for 1 h with *Serratia marcescens* nuclease (Sigma) at 0.1% final concentration and immediately chilled on ice, mixed with a 0.17 vol of 5 M NaCl, and clarified by centrifugation at 2000*g* for 15 min. The resulting supernatant was purified through CsCl isopycnic centrifugation and extensively dialyzed against 1X D-PBS at 4 °C. VLPs production was verified by negative stain in TEM (Kirnbauer et al., 1992) and immunoblotting and VLPs stocks stored in 1X D-PBS at 4 °C until use.

2.5. Immunoblotting

For polyacrylamide electrophoresis (PAGE), VLPs (25 μg) were denatured in Laemmli loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 2% (v/v) β-mercaptoethanol, 0.01% (w/v) bromophenol blue) and boiled before electrophoresis in denaturing 8% polyacrylamide/SDS gels. Gels were electro-transferred to Immobilon®-P membranes (Millipore Corporation, Bedford MA). For native structure analysis, VLPs (15 μg) were directly loaded into a slot-blot apparatus and filtered through a nitrocellulose membrane (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh PA) at constant pressure. Membranes were blocked and incubated with a primary mouse monoclonal antibody (sc-57834) against HPV16 L1 (aa 289–16981) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz CA) and a secondary donkey anti-mouse IgG-HRP antibody (sc-2314) (Santa Cruz Biotechnology). Detection was attained with the Luminata™ Forte HRP Substrate (EMD Millipore, Billerica MA) in a C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences Inc., Lincoln NE).

2.6. GNPs aggregation assays

Non-functionalized GNPs aggregation was implemented in 96-well microplates by adding 200 pM nfGNPs (100 μL), VLPs and/or aptamer and NaCl in 250 μL final volume. Absorbance at 520 and 650 nm was measured immediately using an Epoch™ microplate spectrophotometer (Biotek Instruments, Winooski VT). The RNA aptamer Sc5c3Δ18 (IMPI Patent 327972) was produced by in vitro transcription as previously reported (Leija-Montoya et al., 2014). The mean and standard deviation of the color-shift 650/520 ratio from each sample were plotted by triplicate.

2.7. Dynamic light scattering (DLS)

Sample measurements were performed at 25 °C using a Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, UK) with detection at 90°. The hydrodynamic size of the VLPs was recorded as Z-average hydrodynamic diameter (Dh). The plotted data represent the average size of five measurements from the same sample.

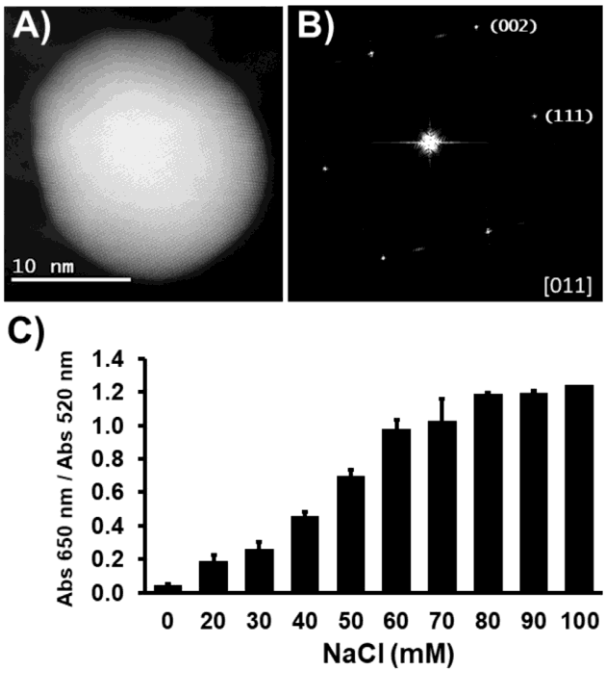

Fig. 1. Non-functionalized gold nanoparticles (nfGNPs) characterization. A) nfGNPs were prepared by the Turkevich method and directly visualized by HAADF-STEM. Quasi-spherical nfGNPs populations were within 10–20 nm in size (scale bar = 10 nm). B) Fast Fourier Transformation (FFT) imaging. C) nfGNPs salt-induced aggregation. Increasing NaCl concentrations were used to determine the minimum concentration required to trigger nfGNPs aggregation (Color shift from 650 to 520 nm). Bars represent the mean and standard deviation of three independent experiments.

3. Results

3.1. Synthesis of GNPs and production of VLPs

GNPs were synthesized by a modified citrate reduction method (Schneider and Decher, 2008). The resulting nfGNPs were characterized by HAADF-STEM showing spheroids of about 10–20 nm indicating uniform shape and size (Fig. 1A). Fast Fourier transform (FFT) analysis showed that the GNPs were monocrystalline and oriented in [011] direction (Fig. 1B). Physical characterization by DLS confirmed an average nanoparticle size of 21 nm with a low polydispersity index (PdI) again indicating a low variation in size distribution (Table 1).

As functional characterization, non-functionalized nfGNPs aggregation was tested by incubating 200 pM nfGNPs with increasing NaCl concentrations (20–100 mM) and reading red-blue color shifting by absorbance wavelength ratio 650/520 nm. As expected, color shifting was apparent from 20 mM (as indicated by an increase in the 650/520 ratio), but was considered complete at 70 mM NaCl because color

Table 1
Characterization of the nfGNP and HPV16 L1 VLPs population by DLS.

	Z-Average (nm)	PdI	Peak-1 (nm)	Volume (%)
nfGNPs	24.87	0.15	19.58	100
VLPs	246.52	0.32	234.98	100

nfGNPs, non-functionalized Gold nanoparticles.
VLPs, HPV16 L1 Virus-like particles.

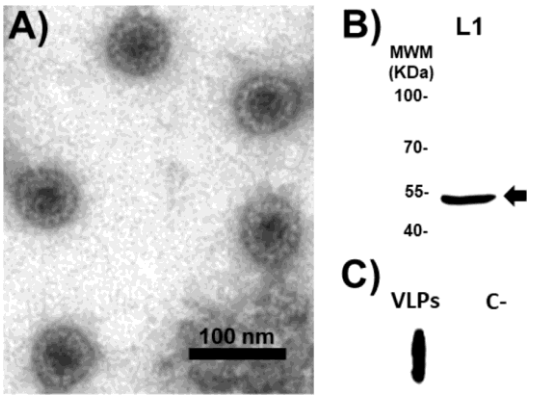

Fig. 2. HPV16 L1 VLPs characterization. A) Negative-stain TEM microphotography of HPV16 L1 virus-like particles (VLPs) forming typical void polyhedral structures 50–60 nm in size (scale bar = 100 nm). B) HPV16 L1 VLPs immunoblotting. Purified VLPs were electrophoresed by denaturing PAGE and immunoblotted against a HPV16 L1 monoclonal antibody. A prominent 55 kDa band (Black arrow) corresponding to the L1 monomer confirmed VLPs (VLPs) purity. MWM, molecular weight marker. C) Native immunodetection of HPV16 L1 VLPs. Purified VLPs (VLPs) were loaded on nitrocellulose membranes in a slot-blot apparatus and incubated with a HPV16 L1 monoclonal antibody to determine structural competence. C-, negative control.

shifting is complete and naked-eyed observable in comparison with nfGNPs without NaCl (Fig. 1C).

VLPs production was accomplished by infecting Sf21 cells with HPV16 L1-producing recombinant baculoviruses. TEM of the VLPs showed typical 50–60 nm empty icosahedral capsids (Fig. 2A). DLS analysis indicated that purified VLPs tend to aggregate in 240 nm clusters with a high PdI (Table 1). This behavior is characteristic of purified VLPs in DPBS and has been previously reported (Shi et al., 2005). VLPs reactivity was tested by denaturing PAGE and slot-blot followed by immunoblotting. Purified HPV16 L1 VLPs were readily recognized by an anti-L1 antibody at the expected molecular size of 55 kDa in denaturing PAGE (Fig. 2B). Native VLPs were also observed in slot-blot immunodetection, suggesting that the produced VLPs were functionally competent (Fig. 2C).

3.2. HPV L1 VLPs inhibit nfGNPs aggregation

The effect of HPV16 L1 VLPs on nfGNPs aggregation was tested using increasing VLPs concentrations (100–1000 ng) with 200 pM GNPs in 70 mM NaCl. As a control, parallel experiments were made using increasing bovine serum albumin (BSA) concentrations (100–1000 ng) with 70 mM NaCl and 200 pM GNPs. VLPs significantly inhibited nfGNPs aggregation (decrease of the 650/520 ratio) from 100 up to 400 ng where inhibition became asymptotic. No significant effect on nfGNPs aggregation was observed at 400 ng BSA, indicating a specific interaction with VLPs (Fig. 3A). TEM of the nfGNPs-VLPs complexes showed VLPs interacting with nfGNPs, although VLPs structure did not appear compromised by interaction with nfGNPs (Fig. 3B). The use of HPV18 L1 VLPs (500 ng) and nfGNPs (200 pM) in aggregation assays also resulted in inhibited nfGNPs aggregation, suggesting that the stabilizing forces involved in nfGNPs-VLPs interaction may be common to HPV capsids although HPV18 VLPs produced a stronger inhibition than the observed for HPV 16 VLPs (Fig. 3C and Supplementary Fig. S1).

To analyze the speed of nfGNPs-VLPs complex formation, a kinetics experiment was made using DLS with 400 ng of VLPs and 200 pM nfGNPs by up to 20 min (Fig. 3D). The nfGNPs-VLPs complexes formed immediately after mixing the components (0 min) and showed 85 nm average size with high standard deviation, suggesting a wide variety of nfGNPs-VLPs complex sizes. After 5 min, nfGNPs-VLPs complexes reached 60 nm with a narrow standard derivation and remained steady for the rest of the experiment. To further analyze the effect of the nfGNPs concentration on the nfGNPs-VLPs complex size (240 nm), purified VLPs were incubated with increasing nfGNPs amounts (50–400 pM) and immediately analyzed by DLS. A disaggregation of VLPs clusters from the observed size of 240 nm into 60 nm particles was observed (Fig. 3E). These results confirmed that HPV16 L1 VLPs inhibit nfGNPs aggregation possibly by a non-covalent molecular binding mechanism that sequesters nfGNPs on the VLPs surface thus, impeding nfGNPs aggregation and destabilizing VLPs clusters.

To test this hypothesis, aggregation-inhibited nfGNP-VLP suspensions at 70 mM NaCl were challenged with further increasing NaCl concentrations (100–800 mM). The nfGNPs aggregation significantly increased the 650/520 ratio with 800 mM NaCl, eleven-fold the observed NaCl concentration required, thus confirming the non-covalent nature of the nfGNPs-VLPs binding (Fig. 4). Furthermore, this result suggested that nfGNPs-VLPs interaction may be related to the opposing surface electrostatic charges present on the nfGNPs and VLPs.

3.3. Characterization of the nfGNPs-VLPs interaction

To first analyze the electrostatic nature of the nfGNPs-VLPs interaction, a well-characterized RNA aptamer (Sc5c3Δ18) (Leija-Montoya et al., 2014), was adsorbed on the nfGNPs surface. As with other single-stranded oligonucleotides we expected that Sc5c3Δ18 will overcome electrostatic repulsion and interact with nfGNPs mainly through hydrophobic forces (Nelson and Rothberg, 2011). Although the aptamer will certainly occupy space on the nfGNPs surface, it will not completely displace the citrate ion that confers the negative charge to the nfGNPs surface thus allowing electrostatic interactions with VLPs. Thus, if nfGNPs half-coated with aptamer form complexes with VLPs still inhibit aggregation, then the electrostatic charge may be excluded of the nfGNPs-VLPs interaction. Conversely, if aggregation is restored then electrostatic forces direct nfGNPs-VLPs interaction.

Aptamer adsorption to the nfGNPs surface was tested in aggregation assays incubating increasing aptamer concentrations (3–26 nM) with 200 pM GNPs in 70 mM NaCl. The presence of the Sc5c3Δ18 RNA resulted in dose-dependent aggregation inhibition as can be expected for a single-stranded oligonucleotide (Fig. 5A). To analyze the electrostatic charge effect, increasing amounts of VLPs 100–300 ng) were added to partially-loaded (10 mM Sc5c3Δ18) nfGNPs in 70 mM NaCl, resulting in additive and dose-dependent inhibition of nfGNPs aggregation, suggesting that electrostatic charge is not responsible of the nfGNPs-VLPs interaction (Fig. 5B).

To confirm the previous result, VLPs mutants L1m6, L1m12 and L1m25 (which change lysine and asparagine residues by non-charged alanine) were used in aggregation assays with nfGNPs. The mutant VLPs provide differentially electrocharged platforms relative to the electropositive wild-type L1 (pI = 8.55) and the progressively electronegative L1m6 (pI = 8.31), L1m12 (pI = 7.88) and L1m25 (pI = 7.10). Increasing mutant VLPs concentrations 10–1000 ng) incubated with 200 pM nfGNPs in 70 mM NaCl again resulted in enhanced inhibition of nfGNPs aggregation relative to the wild-type (Fig. 6A), evidencing that electrostatic attraction is not responsible of the nfGNPs-VLPs interaction, but the enhanced nfGNPs aggregation inhibition in mutant VLPs reveals a charge repulsion effect that dampens interaction with the wild-type. No aggregation inhibition difference was noted among the mutants evidencing that other factors (hydrophobicity, Van der Waals forces, etc.) play a more significant role in the nfGNPs-VLPs interaction.

3.4. The nfGNP-VLPs hydrophobic interaction

Previous reports have established that the hydrophobic character of the VLPs surface can be at least partially responsible of VLPs self-

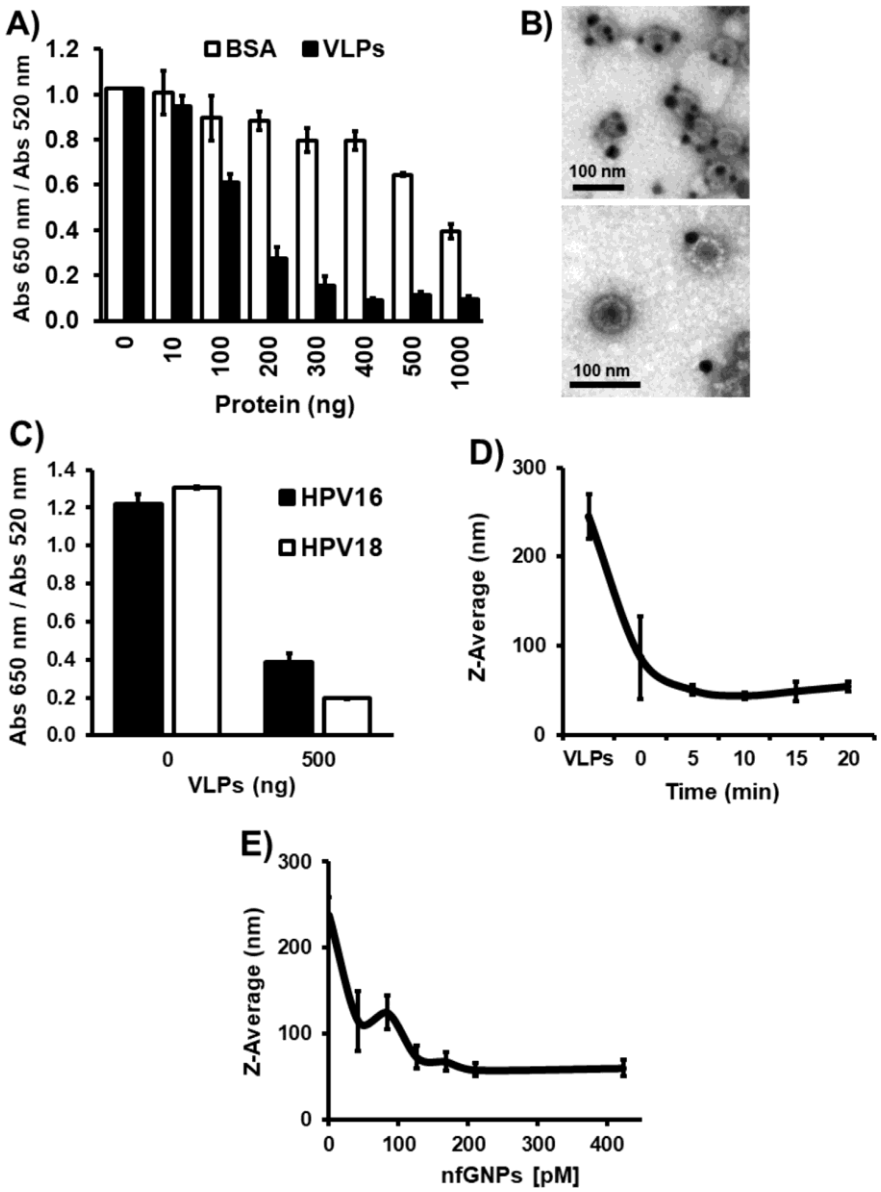

Fig. 3. HPV16 L1 VLPs inhibit nfGNPs aggregation. A) Increasing VLPs concentrations (VLPs) (Black bars) were incubated with 200 pM nfGNPs in 70 mM NaCl to evaluate blocking of nfGNPs aggregation. Increasing concentrations of purified bovine serum albumin (BSA) (White bars) were used as negative control. The color-shift plot represents the mean and standard deviation of three independent experiments (White bars, BSA; Black bars, VLPs). B) Electron microphotographs of nfGNPs-laden HPV16 L1 VLPs. Purified HPV16 L1 VLPs were mixed with nfGNPs and visualized by negative-staining TEM (scale bar = 100 nm). C) HPV18 L1 VLPs inhibit the nfGNPs aggregation. nfGNPs (200 pM) were incubated with HPV16 (Black bars) or HPV18 (White bars) L1 VLPs in 70 mM NaCl. Plots represent the mean color shift (650/520) and standard deviation of three experiments. D) nfGNPs-VLPs binding kinetics. Purified HPV16 L1 VLPs (400 ng) were mixed with nfGNPs (200 pM) and particle size was measured by dynamic light scattering (DLS). The average particle size (Z-Average) of five measurements from the same sample. E) nfGNPs destabilize VLPs aggregates. Purified HPV16 L1 VLPs (400 ng) were incubated with increasing nfGNPs concentrations and particle size was measured by DLS. The DLS vs. nfGNPs concentration plot represents the average size of five measurements from the same sample.

aggregation in suspension (Shi et al., 2005). To further analyze the possible hydrophobic nature of the nfGNPs-VLPs interaction, a less polar solvent was used to promote the VLPs solubility and reduce hydrophobic binding, increasing nfGNPs aggregation (Kang et al., 2001). Wild-type VLPs were incubated with nfGNPs with increasing ethanol concentration ranging from 16% to 45% in 70 mM NaCl. The nfGNPs aggregation was significantly increased with higher ethanol concentrations 24–45%) compared to the ethanol-free control strongly suggesting that nfGNPs-VLPs binding heavily relies on hydrophobic interactions (Fig. 6B).

4. Discussion

GNPs have been widely used to produce low-cost detection methods and can be combined with novel nucleic acid-based protein-recognition technologies (such as aptamers and aptazymes) whose synthesis is affordable and readily available in mass quantities (Zhang et al., 2013). Nevertheless, the distinctive features of the HPV capsid and other HPV proteins require a deeper understanding of their interaction with nfGNPs. Here, we first report and characterize the direct interaction between nfGNPs and HPV16 L1 VLPs.

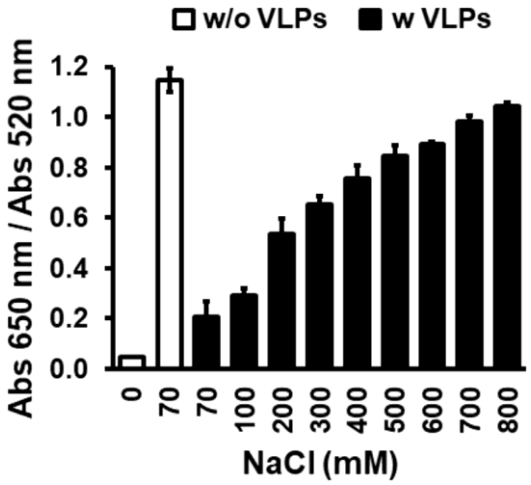

Fig. 4. The nfGNPs-VLPs interaction relies on non-covalent interactions. Increasing NaCl concentrations were used to restore nfGNPs aggregation with fully-formed nfGNPs-VLPs complexes. White bars, nfGNPs aggregation without VLPs (w/o VLPs); Black bars, nfGNPs aggregation with VLPs (w VLPs). The plot represents the mean and standard deviation of three independent experiments.

Previous reports on GNPs interaction with viral capsids used functionalized GNPs specifically adapted to the virus type. Marjomaki *et al.* reported a site-specific covalent conjugation of maleimide-functionalized GNPs clusters to specific cysteines on the viral capsid proteins from enteroviruses echovirus 1 and coxsackievirus B3 that allows virus entry and uncoating. Interestingly, incubation with nfGNPs clusters showed virtually no association to virus particles (Marjomaki et al., 2014). A different approach using SO_4Na-functionalized GNPs to inhibit vesicular stomatitis virus (VSV) binding to cells showed that functionalized GNPs of diameters equal or larger to the virus diameter (> 50 nm) act as efficient cross-linkers between virions, whereas smaller GNPs decorate the surface of individual virus particles. Again, nfGNPs did not show any binding to the virus (Vonnemann et al., 2014).

The structure of the HPV L1 pentamer in complex with heparin fragments (analog to HSPGs), revealed multiple binding sites for highly negatively charged oligosaccharide fragments on the capsid surface through charge-charge interactions (Dasgupta et al., 2011). Also, the large variety of functional effects of gold and other nanomaterials on proteins justifies the need to understand and control the interactions of nfGNPs with proteins (Bailes et al., 2012). Extensive studies on VLPs stability suggest that they are inherently unstable due to hydrophobic surface interactions that are at least partially responsible for aggregation in larger conglomerates of 240 nm in size (Shi et al., 2005). Purified VLPs aggregated were disassembled into 60 nm particles by interaction with nfGNPs. However, no free GNPs were found in the suspensions, suggesting that every single nfGNP is interacting with the VLPs surface. Further studies will be required to establish the functionality of nfGNPs-laden VLPs.

Addition of higher NaCl concentrations after nfGNPs-VLPs complex formation gradually restored aggregation, suggesting the existence of two structural states of the VLPs: 1) a “swelled-structure” state in a low salt environment with highly hydrophobic surface exposed (0.08 M NaCl); and 2) a “compact-structure” state in a high salt environment with less hydrophobic surface exposed (1 M NaCl), as reported (Shi et al., 2005). Thus, once the NaCl concentration is high enough, nfGNPs aggregation occurs because a shift in the VLPs hydrophobic surface that allows nfGNPs triggering for aggregation.

When the nfGNPs, VLPs and the RNA aptamer co-exist in the same system it was expected that the aptamer specific interaction with the VLPs will prevail (Leija-Montoya et al., 2014), but clearly nfGNPs interactions with both VLPs and aptamer drove the system towards aggregation inhibition. The reduction of the positive net charge on the surface of the mutants VLPs did not increase nfGNPs aggregation as may be expected for an exclusively electrostatic interaction. On the contrary, the substitution of positively charged residues (lysine and asparagine) for hydrophobic alanine potentiated nfGNPs aggregation revealing that a positive charge on the VLP surface is indeed an impediment for fast nfGNPs-VLPs binding suggesting a hydrophobic interaction. Although no information is available about the hydrophobic differences among HPV capsids, our results show that HPV18 VLPs surface is more hydrophobic than HPV16 on the basis of the color change produced when in contact with nfGNPs, suggesting a possible tool for easy HPV typing.

The nfGNPs surface may not be entirely covered by citrate ions and can be in fact quite hydrophobic (Carnerero et al., 2017; Zhang et al., 2012). A dominance of hydrophobic effects on the surface of non-functionalized citrate-covered GNPs has been proposed to explain the binding preference for single-stranded DNA over double-stranded DNA (Nelson and Rothberg, 2011; Zhang et al., 2012). Similarly, empirical and theoretical evidence suggested that hydrophobic forces attract the chemotherapeutic drug doxorubicin (DOX) towards the surface of citrate-covered nfGNPs which is stabilized by cation-π interactions

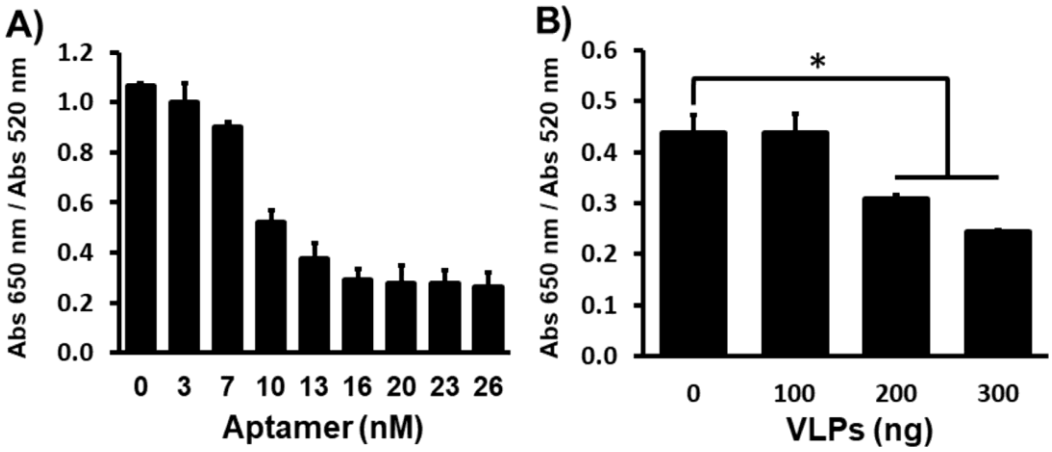

Fig. 5. A non-ionic interacting RNA aptamer against HPV16 L1 VLPs co-inhibits nfGNPs aggregation in the presence of VLPs. A) Increasing concentration of the Sc5-c3Δ18 RNA aptamer were added to non-functionalized nfGNPs suspensions (400 pM) in the presence of 70 mM NaCl. B) Aggregation mixtures were made with increasing amounts of purified VLPs added to partially aggregated Aptamer (10 nM)-nfGNPs (400 pM) complexes. Plots represent the mean and standard deviation of three independent experiments (P = 0.02).

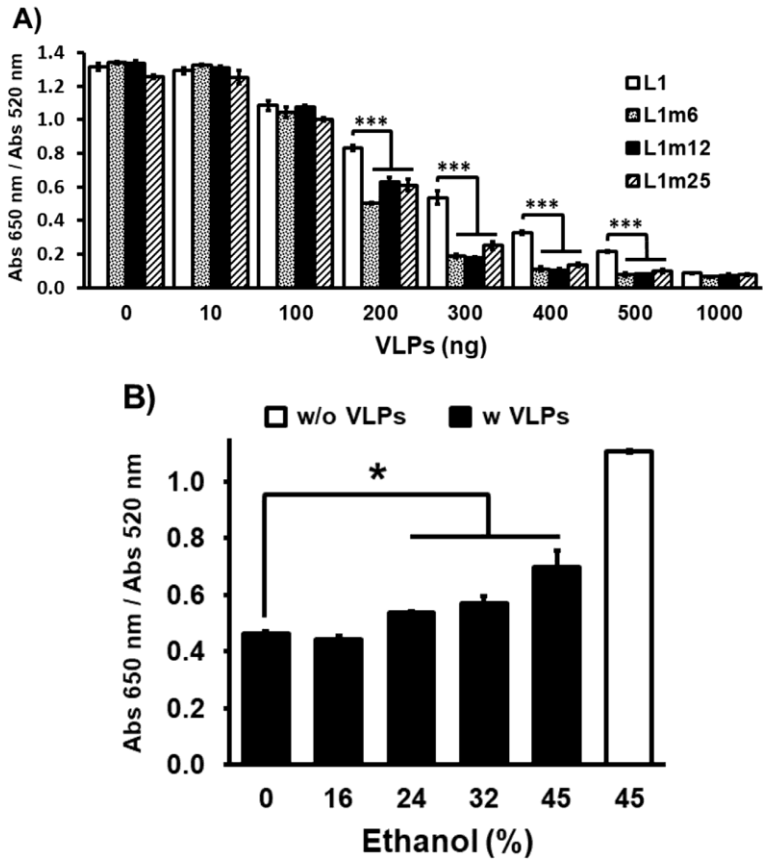

Fig. 6. A) Substitution of positively-charged aminoacids on the VLPs surface enhances inhibition of nfGNPs aggregation. nfGNPs (400 pM) were incubated with increasing amounts of wild-type L1 (White bars) or mutant HPV16 L1 VLPs M6 (K278A-K361A) (Dotted bars), M12 (K54A-K278A-K356A-K361A) (Black bars) and M25 (K54A-N57A-K59A-K278A-K361A-K442A-K443A) (Dashed bars) in the presence of 70 mM NaCl. The graph represents the mean and standard deviation of three independent experiments (P = 0.0005). B) Inhibition of nfGNPs aggregation by VLPs relies on hydrophobic interactions. nfGNPs-VLPs complexes in 70 mM NaCl were incubated with increasing amounts of ethanol. White bar, without VLPs (w/o VLPs); Black bars, with VLPs (w VLPs). The plot represents the mean and standard deviation of three independent experiments (P = 0.02).

and the gold-carbonyl coordination with the cations present on the nfGNPs (Curry et al., 2015). The effect of a mildly polar solvent (ethanol) on the nfGNPs-VLPs interaction suggests an increased VLPs solubility, thus leaving less VLPs available to interact with the nfGNPs surface resulting in better nfGNPs aggregation. At the hydrophobic surface those water molecules in contact with hydrophobic moieties would be displaced towards the surrounding environment reducing the total free energy of the system, thus resulting in a favorable interaction between the hydrophobic moieties of the VLPs and the nfGNPs, as for a recently reported influenza virus-sensing platform (Ahmed et al., 2017). Therefore, the usage of nfGNPs as assay platforms for HPV diagnostics must first overcome the strong hydrophobic effect present in both VLPs and single-stranded oligonucleotides by neutralization of nfGNPs superficial specific functional groups (citrate ion), use of blocking agents and/or other synthesis strategies.

5. Conclusion

GNPs have become an important tool for the development of optical biosensors; however, their interactions with biological materials and other entities are not fully understood. Here we report, for the first time, the spontaneous molecular interaction between nfGNPs and HPV16 L1 VLPs. The nfGNPs-VLPs interaction is non-covalent, reversible and mainly results from the presence of previously uncharacterized hydrophobic forces on the virion surface. Development of simple and economical methods for detection of HPV infection and early cervical cancer diagnosis is an important public health issue for under-developed countries. The nfGNPs-VLPs interaction reported here may contribute to the development of reliable HPV diagnosis-prognosis biosensors to control and prevent cervical cancer.

Acknowledgements

This project was partially supported by CONACyT (Grant PEI 222162). The HAADF-STEM work was performed at the Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica (LANE) core facility. We thank Lourdes Rojas by technical assistance for VLPs electron microscopy. We also thank Kenia Palomino M.Sc., Jose M. Cornejo-Bravo Ph.D., Atenea Villegas B.Sc. and Liliana Quintanar Ph.D. by technical assistance during DLS analysis.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.bios.2017.09.001.

References

Adura, C., Guerrero, S., Salas, E., Medel, L., Riveros, A., Mena, J., Arbiol, J., Albericio, F., Giralt, E., Kogan, M.J., 2013. Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. ACS Appl. Mater. Interfaces 5, 4076–4085.

Ahmed, S.R., Kim, J., Tran, V.T., Suzuki, T., Neethirajan, S., Lee, J., Park, E.Y., 2017. In

situ self-assembly of gold nanoparticles on hydrophilic and hydrophobic substrates for influenza virus-sensing platform. Sci. Rep. 7, 44495–44505.
Alex, S., Tiwari, A., 2015. Functionalized gold nanoparticles: synthesis, properties and applications–a review. J. Nanosci. Nanotechnol. 15, 1869–1894.
Bailes, J., Gazi, S., Ivanova, R., Soloviev, M., 2012. Effect of gold nanoparticle conjugation on the activity and stability of functional proteins. Methods Mol. Biol. 906, 89–99.
Bishop, B., Dasgupta, J., Chen, X.S., 2007. Structure-based engineering of papillomavirus major capsidl1: controlling particle assembly. Virol. J. 4, 3–8.
Buck, C.B., Cheng, N., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Steven, A.C., Schiller, J.T., Trus, B.L., 2008. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. J. Virol. 82, 5190–5197.
Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2004. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. J. Virol. 78, 751–757.
Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2005. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. Methods Mol. Med. 119, 445–462.
Buck, C.B., Trus, B.L., 2012. The papillomavirus virion: a machine built to hide molecular Achilles' heels. Adv. Exp. Med. Biol. 726, 403–422.
Carnerero, J.M., Jimenez-Ruiz, A., Castillo, P.M., Prado-Gotor, R., 2017. Covalent and non-covalent DNA-gold-nanoparticle interactions: new avenues of research. ChemPhysChem 18, 17–33.
Chen, X.S., Garcea, R.L., Goldberg, I., Casini, G., Harrison, S.C., 2000. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. Mol. Cell 5, 557–567.
Curry, D., Cameron, A., MacDonald, B., Nganou, C., Scheller, H., Marsh, J., Beale, S., Lu, M., Shan, Z., Kaliaperumal, R., Xu, H., Servos, M., Bennett, C., MacQuarrie, S., Oakes, K.D., Mkandawire, M., Zhang, X., 2015. Adsorption of doxorubicin on citrate-capped gold nanoparticles: insights into engineering potent chemotherapeutic delivery systems. Nanoscale 7, 19611–19619.
Dasgupta, J., Bienkowska-Haba, M., Ortega, M.E., Patel, H.D., Bodevin, S., Spillmann, D., Bishop, B., Sapp, M., Chen, X.S., 2011. Structural basis of oligosaccharide receptor recognition by human papillomavirus. J. Biol. Chem. 286, 2617–2624.
Deng, X., Fang, Y., Lin, S., Cheng, Q., Liu, Q., Zhang, X., 2017. Porphyrin-based porous organic frameworks as a biomimetic catalyst for highly efficient colorimetric immunoassay. ACS Appl. Mater. Interfaces 9, 3514–3523.
Elghanian, R., Storhoff, J.J., Mucic, R.C., Letsinger, R.L., Mirkin, C.A., 1997. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. Science 277, 1078–1081.
Finnen, R.L., Erickson, K.D., Chen, X.S., Garcea, R.L., 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. J. Virol. 77, 4818–4826.
Grzelczak, M., Vermant, J., Furst, E.M., Liz-Marzan, L.M., 2010. Directed self-assembly of nanoparticles. ACS Nano 4, 3591–3605.
Haiss, W., Thanh, N.T., Aveyard, J., Fernig, D.G., 2007. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV–vis spectra. Anal. Chem. 79, 4215–4221.
Hirsch, L.R., Stafford, R.J., Bankson, J.A., Sershen, S.R., Rivera, B., Price, R.E., Hazle, J.D., Halas, N.J., West, J.L., 2003. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 13549–13554.
Johnson, K.M., Kines, R.C., Roberts, J.N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., Day, P.M., 2009. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. J. Virol. 83, 2067–2074.
Joyce, J.G., Tung, J.S., Przysiecki, C.T., Cook, J.C., Lehman, E.D., Sands, J.A., Jansen, K.U., Keller, P.M., 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. J. Biol. Chem. 274, 5810–5822.
Kang, S.H., Shortreed, M.R., Yeung, E.S., 2001. Real-time dynamics of single-DNA molecules undergoing adsorption and desorption at liquid-solid interfaces. Anal. Chem. 73, 1091–1099.
Khanal, S., Bhattarai, N., McMaster, D., Bahena, D., Velazquez-Salazar, J.J., Jose-Yacaman, M., 2014. Highly monodisperse multiple twinned AuCu-Pt trimetallic nanoparticles with high index surfaces. Phys. Chem. Chem. Phys. 16, 16278–16283.
Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus- like particles that are highly immunogenic. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 12180–12184.
Knappe, M., Bodevin, S., Selinka, H.C., Spillmann, D., Streeck, R.E., Chen, X.S., Lindahl, U., Sapp, M., 2007. Surface-exposed amino acid residues of HPV16 L1 protein mediating interaction with cell surface heparan sulfate. J. Biol. Chem. 282, 27913–27922.
Kogan, M.J., Olmedo, I., Hosta, L., Guerrero, A.R., Cruz, L.J., Albericio, F., 2007. Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications. Nanomedicine (Lond.). 2, 287–306.
Kohler, N., Sun, C., Wang, J., Zhang, M., 2005. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. Langmuir 21, 8858–8864.
Leija-Montoya, A.G., Benitez-Hess, M.L., Toscano-Garibay, J.D., Alvarez-Salas, L.M., 2014. Characterization of an RNA aptamer against HPV-16 L1 virus-like particles. Nucleic Acid. Ther. 24, 344–355.
Liu, Q., Yang, Y., Li, H., Zhu, R., Shao, Q., Yang, S., Xu, J., 2015. NiO nanoparticles modified with 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyl pheyl)-porphyrin: promising peroxidase mimetics for H_2O_2 and glucose detection. Biosens. Bioelectron. 64, 147–153.
Liu, Q., Yang, Y., Lv, X., Ding, Y., Zhang, Y., Jing, J., Xu, C., 2017. One-step synthesis of uniform nanoparticles of porphyrin functionalized ceria with promising peroxidase mimetics for H_2O_2 and glucose colorimetric detection. Sens. Actuators B: Chem. 240, 726–734.
Marjomaki, V., Lahtinen, T., Martikainen, M., Koivisto, J., Malola, S., Salorinne, K., Pettersson, M., Hakkinen, H., 2014. Site-specific targeting of enterovirus capsid by functionalized monodisperse gold nanoclusters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111, 1277–1281.
Nelson, E.M., Rothberg, L.J., 2011. Kinetics and mechanism of single-stranded DNA adsorption onto citrate-stabilized gold nanoparticles in colloidal solution. Langmuir 27, 1770–1777.
Richards, K.F., Bienkowska-Haba, M., Dasgupta, J., Chen, X.S., Sapp, M., 2013. Multiple heparan sulfate binding site engagements are required for the infectious entry of human papillomavirus type 16. J. Virol. 87, 11426–11437.
Schneider, G., Decher, G., 2008. Functional core/shell nanoparticles via layer-by-layer assembly. Investigation of the experimental parameters for controlling particle aggregation and for enhancing dispersion stability. Langmuir 24, 1778–1789.
Selinka, H.C., Florin, L., Patel, H.D., Freitag, K., Schmidtke, M., Makarov, V.A., Sapp, M., 2007. Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus. J. Virol. 81, 10970–10980.
Shafti-Keramat, S., Handisurya, A., Kriehuber, E., Meneguzzi, G., Slupetzky, K., Kirnbauer, R., 2003. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. J. Virol. 77, 13125–13135.
Shi, L., Sanyal, G., Ni, A., Luo, Z., Doshna, S., Wang, B., Graham, T.L., Wang, N., Volkin, D.B., 2005. Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants. J. Pharm. Sci. 94, 1538–1551.
Shwetha, N., Selvakumar, L.S., Thakur, M.S., 2013. Aptamer–nanoparticle-based chemiluminescence for p53 protein. Anal. Biochem. 441, 73–79.
Sun, L., Ding, Y., Jiang, Y., Liu, Q., 2017. Montmorillonite-loaded ceria nanocomposites with superior peroxidase-like activity for rapid colorimetric detection of H_2O_2. Sens. Actuators B: Chem. 239, 848–856.
Szunerits, S., Boukherroub, R., 2012. Sensing using localised surface plasmon resonance sensors. Chem. Commun. (Camb.). 48, 8999–9010.
Vilela, D., Gonzalez, M.C., Escarpa, A., 2012. Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: chemical creativity behind the assay. A review. Anal. Chim. Acta 751, 24–43.
Vonnemann, J., Sieben, C., Wolff, C., Ludwig, K., Bottcher, C., Herrmann, A., Haag, R., 2014. Virus inhibition induced by polyvalent nanoparticles of different sizes. Nanoscale 6, 2353–2360.
Woodworth, C.D., Doniger, J., DiPaolo, J.A., 1989. Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. J. Virol. 63, 159–164.
Zhang, J., Liu, B., Liu, H., Zhang, X., Tan, W., 2013. Aptamer-conjugated gold nanoparticles for bioanalysis. Nanomedicine (Lond.). 8, 983–993.
Zhang, L., Chen, M., Jiang, Y., Chen, M., Ding, Y., Liu, Q., 2017. A facile preparation of montmorillonite-supported copper sulphde nanocomposites and their application in the detection of H_2O_2. Sens. Actuators B: Chem. 239, 28–35.
Zhang, X., Servos, M.R., Liu, J., 2012. Surface science of DNA adsorption onto citrate-capped gold nanoparticles. Langmuir 28, 3896–3902.
Zheng, T., Bott, S., Huo, Q., 2016. Techniques for accurate sizing of gold nanoparticles using dynamic light scattering with particular application to chemical and biological sensing based on aggregate formation. ACS Appl. Mater. Interfaces 8, 21585–21594.
Zur Hausen, H., 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat. Rev. Cancer 2, 342–350.

Índice analítico

A

aptámeros
- definición 4
- estructura tridimensional 5
- interacción aptámero-blanco 5
- modificaciones 9
- SELEX 5
- ventajas 8

B

biosensor
- definición 2

buffers
- bloqueo 55
- DPBS 55
- elusión 61
- lisis para bacterias 54
- lisis para baculovirus 58
- PCR 60
- stop 61
- T-DPBS 55
- transcripción 61

C

Cepas
- CodonPlus(DE3)-RIPL 47
- DH10Bac™ 47

M

medios de cultivo
- Luria-Bertani (LB) 47
- Sf-900 II SFM 48
- SOB 47
- SOC 47

N

nanopartículas de oro
- corona 14
- ensayos de agregación 68
- funcionalización 69
- hidrofobica 15
- ion citrato 13
- sintesis 67
- ventajas 13

S

Sc5-c3
- blanco 37
- ML 37
- Sc5-c3Δ18 37

V

VPH16
- ciclo de vida 17
- genoma 16
- partículas virales vacías (VLPs) 19
- proteína principal (L1) 18
- pseudovirus (PsVs) 19
- viriones 18

Referencias Bibliográficas

Ahmed, S.R., Kim, J., Van Tan Tran, Suzuki, T., Neethirajan, S., Lee, J., and Park, E.Y. (2017). In situ self-assembly of gold nanoparticles on hydrophilic and hydrophobic substrates for influenza virus-sensing platform. Sci. Rep. 1–11.

Alphs, H.H., Gambhira, R., Karanam, B., Roberts, J.N., Jagu, S., Schiller, J.T., Zeng, W., Jackson, D.C., and Roden, R.B.S. (2008). Protection against heterologous human papillomavirus challenge by a synthetic lipopeptide vaccine containing a broadly cross-neutralizing epitope of L2. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 5850–5855.

Androphy, E.J., HUBBERT, N.L., Schiller, J.T., and Lowy, D.R. (1987). Identification of the HPV-16 E6 Protein From Transformed Mouse Cells and Human Cervical-Carcinoma Cell-Lines. Embo J 6, 989–992.

Araki, M., Okuno, Y., Hara, Y., and Sugiura, Y. (1998). Allosteric regulation of a ribozyme activity through ligand-induced conformational change. Nucleic Acids Research 26, 3379–3384.

Bailes, J., Gazi, S., Ivanova, R., and Soloviev, M. (2012). Effect of gold nanoparticle conjugation on the activity and stability of functional proteins. Methods Mol. Biol. *906*, 89–99.

Bain, C.D., and Whitesides, G.M. (1989). Modeling Organic-Surfaces with Self-Assembled Monolayers. Angewandte Chemie-International Edition in English *28*, 506–512.

Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H., Cowsert, L.M., Olson, C., and Brown, J.C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. Biophysical Journal *60*, 1445–1456.

Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2007). The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. Genome Biol. *8*, R239.

Bedell, M.A., HUDSON, J.B., GOLUB, T.R., TURYK, M.E., HOSKEN, M., WILBANKS, G.D., and Laimins, L.A. (1991). Amplification of Human Papillomavirus Genomes Invitro Is Dependent on Epithelial Differentiation. Journal of Virology *65*, 2254–2260.

Behlke, M.A. (2008). Chemical Modification of siRNAs for In VivoUse. Oligonucleotides *18*, 305–320.

Benítez-Hess, M.L., DiPaolo, J.A., and Alvarez-Salas, L.M. (2004). Antisense activity detection by inhibition offluorescence resonance energy transfer. Luminescence *19*, 85–93.

Benítez-Hess, M.L., Reyes-Gutiérrez, P., and Alvarez-Salas, L.M. (2011). Inhibition of Human Papillomavirus Expression Using DNAzymes. In Methods in Molecular Biology, (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 317–335.

Bryan, J.T., and Brown, D.R. (2000). Association of the Human Papillomavirus Type 11 E1∧E4 Protein with Cornified Cell Envelopes Derived from Infected Genital Epithelium. Virology *277*, 262–269.

Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2003). Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors. Journal of Virology *78*, 751–757.

Buck, C.B., and Thompson, C.D. (2001). Production of Papillomavirus-Based Gene Transfer Vectors (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.).

Buck, C.B., Cheng, N., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Steven, A.C., Schiller, J.T., and Trus, B.L. (2008). Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. Journal of Virology *82*, 5190–5197.

Cammann, K. (1977). Bio-Sensors Based on Ion-Selective Electrodes. Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie *287*, 1–9.

Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A., and Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 2050–2055.

Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva (2017). Datos sobre Cáncer de cuello uterino. Http://Cnegsr.Salud.Gob.Mx/Contenidos /Programas_De_Accion/CancerdelaMujer/CaCu/Introduccion.Html.

Chen, X.S., Garcea, R.L., Goldberg, I., Casini, G., and Harrison, S.C. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. Mol. Cell *5*, 557–567.

Clark, L.C., and Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Annals of the New York Academy of Sciences *102*, 29–45.

Conway, M.J., and Meyers, C. (2009). Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. Journal of Dental Research *88*, 307–317.

Conway, M.J., Alam, S., Christensen, N.D., and Meyers, C. (2009). Overlapping and independent structural roles for human papillomavirus type 16 L2 conserved cysteines. Virology *393*, 295–303.

Cripe, T.P., Haugen, T.H., Turk, J.P., Tabatabai, F., Schmid, P.G., Dürst, M., Gissmann, L., Roman, A., and Turek, L.P. (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. Embo J *6*, 3745–3753.

Cruz, J.O., and Stoytcheva, M. (2014). Biosensors: Recent advances and mathematical challenges. OmniaScience Monographs.

Dasgupta, J., Bienkowska-Haba, M., Ortega, M.E., Patel, H.D., Bodevin, S., Spillmann, D., Bishop, B., Sapp, M., and Chen, X.S. (2011). Structural Basis of Oligosaccharide Receptor Recognition by Human Papillomavirus. Journal of Biological Chemistry *286*, 2617–2624.

de Sanjosé, S., Brotons, M., and Pavón, M.A. (2017). Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology 1–12.

de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.-U., and Hausen, zur, H. (2004). Classification of papillomaviruses. Virology *324*, 17–27.

Deng, W., and Goldys, E.M. (2014). Chemical sensing with nanoparticles as optical reporters: from noble metal nanoparticles to quantum dots and upconverting nanoparticles. The Analyst *139*, 5321–5334.

Docter, D., Westmeier, D., Markiewicz, M., Stolte, S., Knauer, S.K., and Stauber, R.H. (2015). The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? Chem. Soc. Rev. *44*, 6094–6121.

Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clinical Science *110*, 525.

Dubois, L.H., and Nuzzo, R.G. (1992). Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic-Surfaces. Annual Review of Physical Chemistry *43*, 437–463.

Ellington, A.D., and Szostak, J.W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature *346*, 818–822.

Famulok, M., Hartig, J.S., and Mayer, G. (2007). Functional Aptamers and Aptazymes in Biotechnology, Diagnostics, and Therapy. Chem. Rev. *107*, 3715–3743.

Favre, M., BREITBURD, F., CROISSANT, O., and ORTH, G. (1975). Structural Polypeptides of Rabbit, Bovine, and Human Papillomaviruses. Journal of Virology *15*, 1239–1247.

Finnen, R.L., Erickson, K.D., Chen, X.S., and Garcea, R.L. (2003). Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. Journal of Virology *77*, 4818–4826.

Florin, L., Sapp, C., Streeck, R.E., and Sapp, M. (2002). Assembly and Translocation of Papillomavirus Capsid Proteins. Journal of Virology *76*, 10009–10014.

Frazer, I. (2007). Correlating immunity with protection for HPV infection. International Journal of Infectious Diseases *11*, S10–S16.

Frómeta, N.R. (2005). Biosensores: Un Acercamiento a La Resonancia del Plasmon Superficial. Revista CENIC. Ciencias Biológicas *36*.

Graham, J.C., and Zarbl, H. (2012). Use of Cell-SELEX to Generate DNA Aptamers as Molecular Probes of HPV-Associated Cervical Cancer Cells. PLoS ONE *7*, e36103.

Haiss, W., Thanh, N.T.K., Aveyard, J., and Fernig, D.G. (2007). Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV−Vis Spectra. Anal. Chem. *79*, 4215–4221.

Hermann, T., and Patel, D.J. (2000). Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. Science *287*, 820–825.

Hill, H.D., Millstone, J.E., Banholzer, M.J., and Mirkin, C.A. (2009). The role radius of curvature plays in thiolated oligonucleotide loading on gold nanoparticles. ACS Nano *3*, 418–424.

Hong, P., Li, W., and Li, J. (2012). Applications of Aptasensors in Clinical Diagnostics. Sensors *12*, 1181–1193.

Jampasa, S., Siangproh, W., Duangmal, K., and Chailapakul, O. (2016). Electrochemically reduced graphene oxide-modified screen-printed carbon electrodes for a simple and highly sensitive electrochemical detection of synthetic colorants in beverages. Talanta *160*, 113–124.

Jampasa, S., Wonsawat, W., Rodthongkum, N., Siangproh, W., Yanatatsaneejit, P., Vilaivan, T., and Chailapakul, O. (2014). Biosensors and Bioelectronics. Biosensors and Bioelectronic *54*, 428–434.

Jhaveri, S., Rajendran, M., and Ellington, A.D. (2000). In vitro selection of signaling aptamers. Nat Biotechnol *18*, 1293–1297.

Kang, S.H., Shortreed, M.R., and Yeung, E.S. (2001). Real-Time Dynamics of Single-DNA Molecules Undergoing Adsorption and Desorption at Liquid−Solid Interfaces. Anal. Chem. *73*, 1091–1099.

Keefe, A.D., and Cload, S.T. (2008). SELEX with modified nucleotides. Current Opinion in Chemical Biology *12*, 448–456.

Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 12180–12184.

Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Dürst, M., Gissmann, L., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. Journal of Virology *67*, 6929–6936.

Lazcka, O., Campo, F.J.D., and Muñoz, F.X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. Biosensors and Bioelectronics *22*, 1205–1217.

Leija-Montoya, A.G., Benítez-Hess, M.L., Toscano-Garibay, J.D., and Alvarez-Salas, L.M. (2014). Characterization of an RNA Aptamer Against HPV-16 L1 Virus-Like Particles. Nucleic Acid Therapeutics (Formerly Oligonucleotides).

Li, Y., and Sen, D. (1996). A catalytic DNA for porphyrin metallation. Nature *3*, 743–747.

Lubomir, S., Horst, W., and Arnim, H. (2013). Photochemistry of Semiconductor Colloids. J. Am. Chem. Soc. *109*, 6632–6635.

Luong, J.H.T., Male, K.B., and Glennon, J.D. (2008). Biosensor technology: Technology push versus market pull. Biotechnology Advances *26*, 492–500.

Marjomaki, V., Lahtinen, T., Martikainen, M., Koivisto, J., Malola, S., Salorinne, K., Pettersson, M., and Hakkinen, H. (2014). Site-specific targeting of enterovirus capsid by functionalized monodisperse gold nanoclusters. Proc Natl Acad Sci U S A *111*, 1277–1281.

Mayer, G. (2009). The Chemical Biology of Aptamers. Angewandte Chemie International Edition *48*, 2672–2689.

McMurray, H.R., Nguyen, D., Westbrook, T.F., and McCance, D.J. (2001). Biology of human papillomaviruses. International Journal of Experimental Pathology *82*, 15–33.

Middleton, K., Peh, W., Southern, S., Griffin, H., Sotlar, K., Nakahara, T., El-Sherif, A., Morris, L., Seth, R., Hibma, M., et al. (2003). Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. Journal of Virology *77*, 10186–10201.

Mohanty, S.P., and Kougianos, E. (2017). Biosensors: a tutorial review. IEEE Potentials *25*, 35–40.

Mohr, I.J., CLARK, R., SUN, S., Androphy, E.J., MACPHERSON, P., and BOTCHAN, M.R. (1990). Targeting the E1 Replication Protein to the Papillomavirus Origin of Replication by Complex-Formation with the E2 Transactivator. Science *250*, 1694–1699.

Moody, C.A., and Laimins, L.A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nat. Rev. Cancer. *10*, 550–560.

Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A.B., and Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine *24*, S1–S10.

Nelson, E.M., and Rothberg, L.J. (2011). Kinetics and Mechanism of Single-Stranded DNA Adsorption onto Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles in Colloidal Solution. Langmuir *27*, 1770–1777.

Nicholls, F.J., Rotz, M.W., Ghuman, H., MacRenaris, K.W., Meade, T.J., and Modo, M. (2016). DNA–gadolinium–gold nanoparticles for in vivo T1 MR imaging of transplanted human neural stem cells. Biomaterials *77*, 291–306.

Nicol, C., Bunka, D.H.J., Blair, G.E., and Stonehouse, N.J. (2011). Effects of single nucleotide changes on the binding and activity of RNA aptamers to human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. Biochemical and Biophysical Research Communications *405*, 417–421.

Nutiu, R., and Li, Y. (2005). In Vitro Selection of Structure-Switching Signaling Aptamers. Angewandte Chemie International Edition *44*, 1061–1065.

Palomino-Vizcaino, G. (2013). Generación de una biblioteca de aptazimas para la proteína L1 del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH16).

Palomino-Vizcaino, G., Reséndiz, D.G.V., Benítez-Hess, M.L., Martínez-Acuña, N., Tapia-Vieyra, J.V., Bahena, D., Díaz-Sánchez, M., García-González, O.P., Alvarez-Sandoval, B.A., and Alvarez-Salas, L.M. (2018). Effect of HPV16 L1 virus-like particles on the aggregation of non-functionalized gold nanoparticles. Biosensors and Bioelectronics *100*, 176–183.

Peng, Y., Zhang, D., Li, Y., Qi, H., Gao, Q., and Zhang, C. (2009). Label-free and sensitive faradic impedance aptasensor for the determination of lysozyme based on target-induced aptamer displacement. Biosensors and Bioelectronics *25*, 94–99.

Phelps, W.C., YEE, C.L., Munger, K., and HOWLEY, P.M. (1988). The Human Papillomavirus Type-16 E7 Gene Encodes Transactivation and Transformation Functions Similar to Those of Adenovirus-E1a. Cell *53*, 539–547.

Plascencia-Villa, G., Carreño-Fuentes, L., Bahena, D., José-Yacamán, M., Palomares, L.A., and Ramírez, O.T. (2014). Characterization of conductive nanobiomaterials derived from viral assemblies by low-voltage STEM imaging and Raman scattering. 1–12.

Proske, D., Blank, M., Buhmann, R., and Resch, A. (2005). Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications. Appl Microbiol Biotechnol *69*, 367–374.

Rentmeister, A., Mayer, G., Kuhn, N., and Famulok, M. (2007). Conformational changes in the expression domain of the Escherichia coli thiM riboswitch. Nucleic Acids Research *35*, 3713–3722.

Reyes-Gasga, J., Tehuacanero-Nuñez, S., Montejano-Carrizales, J.M., Gao, X., and Jose-Yacaman, M. (2007). Analysis of the contrast in icosahedral gold nanoparticles. Top Catal *46*, 23–30.

Reyes-Gutiérrez, P., and Alvarez-Salas, L.M. (2009). Cleavage of HPV-16 E6/E7 mRNA Mediated by Modified 10–23 Deoxyribozymes. Oligonucleotides *19*, 233–242.

Sabouri, A.A., and Moosavimovahedi, A.A. (1994). Evaluation of the hill coefficient from scatchard and klotz plots. Biochemical Education *22*, 48–49.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning.

Shi, L., Sanyal, G., Ni, A., Luo, Z., Doshna, S., Wang, B., Graham, T.L., Wang, N., and Volkin, D.B. (2005). Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants. J. Pharm. Sci. *94*, 1538–1551.

Shwetha, N., Selvakumar, L.S., and Thakur, M.S. (2013). Aptamer–nanoparticle-based chemiluminescence for p53 protein. Analytical Biochemistry *441*, 73–79.

Smith, J.E., Griffin, D.K., Leny, J.K., Hagen, J.A., Chávez, J.L., and Kelley-Loughnane, N. (2014). Colorimetric detection with aptamer-gold nanoparticle conjugates coupled to an android-based color analysis applicationfor use in the field. Talanta *121*, 247–255.

Smith, T. (1980). The hydrophilic nature of a clean gold surface. Journal of Colloid and Interface Science *75*, 51–55.

Stanley, M.A., Pett, M.R., and Coleman, N. (2007). HPV: from infection to cancer. Biochem. Soc. Trans *35*, 1456–1460.

Stoltenburg, R., Reinemann, C., and Strehlitz, B. (2007). SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. Biomolecular Engineering *24*, 381–403.

Sun, C., Liu, X., Feng, K., Jiang, J., Shen, G., and Yu, R. (2010). An aptazyme-based electrochemical biosensor for the detection of adenosine. Analytica Chimica Acta *669*, 87–93.

Szunerits, S., and Boukherroub, R. (2012). Sensing using localised surface plasmon resonance sensors. Chem. Commun. (Camb.) *48*, 8999–12.

Tomado de NanoComposix Size affects color of GNPs (nanocomposix).

Tombelli, S., Minunni, M., and Mascini, M. (2005). Analytical applications of aptamers. Biosensors and Bioelectronics *20*, 2424–2434.

Toscano-Garibay, J.D., Benítez-Hess, M.L., and Alvarez-Salas, L.M. (2011). Isolation and Characterization of an RNA Aptamer for the HPV-16 E7 Oncoprotein. Archives of Medical Research *42*, 88–96.

Travascio, P., Bennet, A.J., Wang, D.Y., and Sen, D. (1999). A ribozyme and a catalytic DNA with peroxidase activity: active sites versus cofactor-binding sites. Chemistry & Biology *6*, 779–787.

Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science *249*, 505–510.

Turkevich, J., Stevenson, P.C., and Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discuss. Faraday Soc. *11*, 55.

Turner, A.P.F. (2013). Biosensors: sense and sensibility. Chem. Soc. Rev. *42*, 3184–14.

Vonnemann, J., Sieben, C., Wolff, C., Ludwig, K., Böttcher, C., Herrmann, A., and Haag, R. (2014). Virus inhibition induced by polyvalent nanoparticles of different sizes. Nanoscale *6*, 2353–2358.

Willner, I., and Zayats, M. (2007). Electronic Aptamer-Based Sensors. Angewandte Chemie International Edition *46*, 6408–6418.

Winkler, W.C., Cohen-Chalamish, S., and Breaker, R.R. (2002). An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. Proceedings of the National Academy of Sciences *99*, 15908–15913.

Woodworth, C.D., Doniger, J., and DiPaolo, J.A. (1989). Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. Journal of Virology *63*, 159–164.

Yoshida, T., Sano, T., Kanuma, T., Owada, N., Sakurai, S., Fukuda, T., and Nakajima, T. (2008). Immunochemical analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in liquid-based cytology samples from uterine cervical lesions. Cancer *114*, 83–88.

Zhang, J., Liu, B., Liu, H., Zhang, X., and Tan, W. (2013a). Aptamer-conjugated gold nanoparticles for bioanalysis. Nanomedicine (Lond) *8*, 983–993.

Zhang, X., Gouriye, T., Göeken, K., Servos, M.R., Gill, R., and Liu, J. (2013b). Toward Fast and Quantitative Modification of Large Gold Nanoparticles by Thiolated DNA: Scaling of Nanoscale Forces, Kinetics, and the Need for Thiol Reduction. J. Phys. Chem. C *117*, 15677–15684.

Zheng, Z.-M., and Baker, C.C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. Front. Biosci. *11*, 2286–2302.

Zhou, J., Sun, X.Y., Stenzel, D.J., and Frazer, I.H. (1991). Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. Virology *185*, 251–257.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research *31*, 3406–3415.