



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Efecto del aptámero E en la pseudoinfección de
Pseudovirus tipo 18 en células 293TT**

TESIS

Que presenta:

BG. Dariel Omar Pacheco Ibarra

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

Director de tesis:

Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Ciudad de México

Agosto, 2022

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Luis Marat Alvarez Salas en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Durante su realización, el autor contó con una beca personal otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) con número de registro 1140757.

Agradecimientos

En este punto de reflexión y logro académico, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a las personas que han desempeñado un papel clave en el transcurso de esta etapa de mi vida.

Primeramente, me siento muy agradecido con el Dr. Luis Marat Álvares Salas ya que ha sido un mentor excepcional para mi desarrollo, agradezco esos momentos donde me vio cometer errores y equivocarme y me recibió con una sonrisa compasiva y dándome a entender que todo ello es parte del aprendizaje y con ello aprendí a no tener miedo a equivocarme, asimismo, agradezco el conocimiento transmitido directa e indirectamente para mi formación como profesional y como persona.

También me gustaría plasmar mi agradecimiento a mis asesores, la Dra. Rosa María Bermudez y al Dr. Luis Kameyama Kawabe que gracias a su apoyo y mentoría desde una perspectiva diferente que durante este trayecto sirvió para enriquecer mi aprendizaje.

Durante esta maravillosa etapa académica conocí maravillosas personas que fueron un apoyo emocional inmenso para sobrellevar todo al poder compartir las penas y que se hicieran más llevaderas, así como momentos de alegría que se convierten en recuerdos que llevaré conmigo siempre los quiero mucho amigos Cristhian Zuriel, Marycarmen Salas, Samantha Cruz por hacer de esta amistad una familia.

Una persona importantísima para mi en este trayecto es mi novia Anayanci Mariscal ya que a pesar de la distancia que nos separó en esta etapa siempre me hizo sentir que estaba conmigo, siempre estuvo ahí para escucharme y darme ánimos cuando más lo necesitaba así que muchas gracias, mi amor por ser siempre esa lucecita que iluminaba mi camino, te amo.

También me gustaría agradecer a mis amigos de Los Mochis que a pesar de no vernos siempre me sacan una carcajada y tal vez ellos no lo saben, pero valoro mucho esos momentos y valoro su amistad de tantos años porque hemos ido viendo como vamos creciendo y cambiando, pero la amistad siempre se mantiene.

Quiero aprovechar para agradecer a mi padre que siempre estuvo al pendiente de mi y que mostró su amor y apoyo desde la distancia, sus consejos me alentaron para seguir a pesar de los tropiezos y poder culminar con esta etapa. Asimismo, me gustaría agradecer a mi madre mi mas grande amor por haberme hecho un hombre responsable y siempre haberme alentado para que me siguiera superando y buscar lo mejor para mi futuro.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	7
I. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Papilomavirus.....	10
1.1.1 Genoma viral	11
1.1.2 Infección viral.....	12
1.1.3 Diagnóstico	16
1.1.4 Terapia contra infecciones por VPH	17
1.1.5 Partículas virales	19
1.2 Aptámeros.....	20
1.2.1 Aislamiento de aptámeros	21
1.2.2 Ventajas de los aptámeros	23
1.2.3 Aptámeros y sus aplicaciones	24
II. Antecedentes	26
III. Justificación	29
IV. Hipótesis.....	31
V. Objetivos	32
5.1 Objetivo general	32

5.2	Objetivos específicos	32
6.1	Producción y caracterización de PsVPH18	33
6.1.1	Cultivo celular	33
6.1.2	Producción de plásmidos p18shell y pSVLYFP	35
6.1.3	Caracterización de los plásmidos p18Shell y pSVLYFP	36
6.1.4	Producción de PsVPH18	37
6.1.5	Caracterización de los PsVPH18 con Inmunodetección de la proteína L1	39
6.1.6	Purificación de aptámeros	40
6.1.7	Cuantificación de unidades infectivas del stock viral	41
6.1.8	Inhibición de la infección viral	42
6.1.9	Citometría de flujo.....	42
VII.	Resultados.....	43
7.1	Producción y caracterización de los plásmidos p18Shell y pSVLYFP	43
7.2	Producción de PsVPH18.....	46
7.3	Caracterización de PsVPH18.....	48
7.3.1	Determinación de unidades infectivas	50
7.4	Purificación de aptámeros	52
7.5	Ensayos de interacción Aptámero-PsVPH18	53
VIII.	Discusión	57

IX. Conclusiones.....	60
X. Perspectivas.....	61
REFERENCIAS.....	62
ANEXOS	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genoma de los Alfa-VPH..	12
Figura 2. Ciclo de infección del virus del papiloma humano.	15
Figura 3. Unión del aptámero a su diana.....	21
Figura 4. Proceso de aislamiento de aptámeros.	23
Figura 5. Estructura secundaria del aptámero E.....	27
Figura 6. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.	33
Figura 7. Producción de los plásmidos p18Shell y pSVLYFP.....	45
Figura 8. Caracterización plasmídica.	46
Figura 9. 72 horas post- transfección.....	47
Figura 10. Gradiente de optiprep..	48
Figura 11. Ensayo de inmunodetección.....	49
Figura 12. Ensayo de Inmunodetección post-purificación.....	49
Figura 13. Ensayos de pseudoinfección.	50
Figura 14. Unidades infectivas.....	51
Figura 15. Gel desnaturizante de poliacrilamida.	52
Figura 16. Gel desnaturizante post-purificación..	53
Figura 17. Ensayo de infección con aptámero sin purificar.....	54
Figura 18. Ensayo de infección con 1uM de aptámeros y heparina..	55
Figura 19. Ensayo de infección con 5uM de aptámero y heparina.	55
Figura 20. Ensayo de infección con recubrimiento en microtubos.	56

Resumen

Las enfermedades causadas por infecciones virales varían en un amplio rango de sintomatologías que pueden ir desde asintomáticas, leves, agudas, crónicas o incluso llegar a la muerte de las personas infectadas. Las infecciones del virus del papiloma humano (VPH) suelen transmitirse por contacto sexual, su sintomatología puede ir desde lo asintomático hasta el desarrollo cáncer lo que convierte a la infección por VPH en la mujer en un factor de riesgo en la aparición de cáncer cérvico-uterino. Para que el virus infecte a una célula las proteínas de su cápside (L1 y L2) hacen contacto con la superficie celular uniéndose inicialmente con un receptor expuesto en la superficie celular, el heparan sulfato. En nuestro grupo de trabajo, se aisló un aptámero de DNA (aptámero E) que mostró una alta afinidad y especificidad por pseudovirus derivados del VPH tipo 18 (PsVPH18), por lo que podría ser capaz de inhibir la infección. Para probar ésta hipótesis, el proceso de infección por VPH fue simulado usando PsVPH18 con un pseudogenoma que contiene el gen de la proteína reportera YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) que al infectar produce una clara fluorescencia que permite monitorear la el proceso de infección. La infección con el PsVPH18 se realizó de manera exitosa registrando altos niveles de fluorescencia desde las 24 horas post-infección. Al tratar de inhibir la infección con el aptámero E no se encontró una diferencia significativa entre el control infectado y el ensayo de infección en presencia del aptámero. El ensayo se repitió varias veces bajo diversas condiciones de infección. Sin embargo, la eficiencia de infección disminuyó concomitantemente al tiempo de almacenamiento de los PsVPH lo que sugiere que se perdían partículas efectivas, ya sea por agregación de los pseudovirus o porque interactúan de manera directa con los plásticos donde se almacena y se manipula. Lamentablemente, al no contar con un reactivo que haga antiadherente, las superficies de los microtubos y puntas de las micropipetas es factible que ésta última sea la razón por la cual no se tuvieron los altos porcentajes de infección observados inicialmente con material plástico siliconizado. En conclusión, se requiere repetir estos ensayos con un reactivo que tenga la capacidad de volver antiadherentes las superficies del material.

Abstract

Diseases caused by viral infections vary in a wide range of symptomatology, ranging from asymptomatic to mild, acute and chronic conditions or even leading to the death of infected individuals. In case of sexually transmitted viral infections, often there is a social burden, due to the discrimination faced by people with these types of diseases, leading to late-stage diagnosis. Human papillomavirus (HPV) infections are usually transmitted through sexual contact, and their symptoms vary from asymptomatic to the development cancer, making HPV infection a risk factor in women for the onset of cervical cancer.

For the HPV to infect a cell, the capsid proteins L1 and L2 make contact with the cell surface by initially binding to an heparan sulfate (glycosaminoglycan) receptor attached to cell surface proteins. In our research group, a DNA aptamer (aptamer E) was isolated, which showed high affinity and specificity for the L1 capsid viral from Pseudoviruses derived from HPV type 18 (PsHPV18). Because L1 interacts with heparan sulfate, the E aptamer could bind to the viral capsids and inhibit infection. The infection process was mimicked using PsHPV18 18, which was produced in 293TT cells, and their pseudogenome contained the Yellow Fluorescent Protein (YFP) gene, which would be produced upon infection thus allowing us to monitor the infection. However, no significant difference was found between the infected control and the infection assay in the presence of the aptamer. This lack of significant difference is estimated to be due to technical limitations regarding a reagent that makes anti-adherent the surfaces of the microtubes and micropipette tips, as there were not high infection percentages even in the controls without an inhibitor.

In conclusion, it is necessary to repeat these assays with a reagent that has the ability to make the surfaces of the materials anti-adherent, as HPV capsids tend to firmly adhere to plastics.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Papilomavirus

Los papilomavirus pertenecen a la familia *Papillomaviridae* y se caracterizan por infectar la piel y las mucosas en diversas especies de vertebrados, desde peces hasta el ser humano. Los papilomavirus que infectan al humano se conocen como virus de papiloma humano (VPH) y debido a su importancia médica han sido ampliamente estudiados.¹

Como el resto de la familia, los VPH se caracterizan por ser virus desnudos, de cápsides icosaédricas y con un tamaño de 50-60 nm de diámetro². Hasta la fecha se conocen más de 200 genotipos de VPH que se clasifican en cinco géneros filogenéticos (Alfa, Beta, Gama, Mu y Nu). Cada género de VPH se adapta evolutivamente a un cierto tejido epitelial humano y las lesiones que provocan tienen características diferentes.³

El género Alfa se caracteriza por contener a los virus que causan enfermedades humanas de gran importancia en salud pública. Éstos VPH se transmiten sexualmente y suelen controlarse inmunológicamente dentro un periodo de 1 a 2 años. La persistencia de estos virus se relaciona con el desarrollo de cáncer cervical.³ Los VPH del grupo Alfa son de especial relevancia ya que contienen a los tipos 16 y 18 (VPH16 y VPH18, respectivamente) que se consideran de alto riesgo porque causan lesiones en las mucosas que en algunos individuos pueden progresar a neoplasias genitales de alto grado y cáncer.¹

Por otro lado, los virus del género Beta se asocian con infecciones cutáneas latentes en la población general, pero en pacientes inmunocomprometidos o que padecen la enfermedad hereditaria EV (*Epidermodysplasia Verruciformis*) los virus pueden propagarse desmesuradamente y asociarse con el desarrollo de cáncer de piel.⁴

Así mismo, los virus del género Gama se asocian con lesiones en la piel como verrugas que pueden confundirse a las causadas por los VPH del género Alfa. Los géneros restantes de VPH Mu y Nu causan papilomas cutáneos benignos en la población general.¹

1.1.1 Genoma viral

El genoma del VPH consta de alrededor de 8000 pb de ADN circular de doble cadena y codifica ocho genes y una región reguladora (LCR, por sus siglas en inglés). Los genes del VPH se designan como E a los que se expresan en la etapa temprana y L a los que se expresan en la etapa tardía.⁵

Los genes E1, E2, E5, E6 Y E7 se expresan en diferentes etapas durante la diferenciación de las células epiteliales, E4 se expresa de manera temprana aunque con funciones tardías y los genes de la cápside viral L1 y L2 se expresan durante las etapas finales de la diferenciación. Las proteínas tempranas se expresan a niveles bajos para el mantenimiento del genoma y proliferación celular en diferentes etapas durante la diferenciación de células epiteliales.^{4,5}

Por otro lado, las proteínas de la región tardía codifican las proteínas estructurales de la cápside viral. L1 es la proteína principal de la cápside viral y es la región más

conservada del genoma viral por lo que se utiliza para la clasificación filogenética. Los viriones infecciosos de VPH contienen alrededor de 360 copias de la proteína L1 organizados en 72 capsómeros. L2 es un componente minoritario de la cápside que sirve como enlace con el ADN y es relevante en el proceso de entrada del virus a la célula durante la infección.^{4,5}

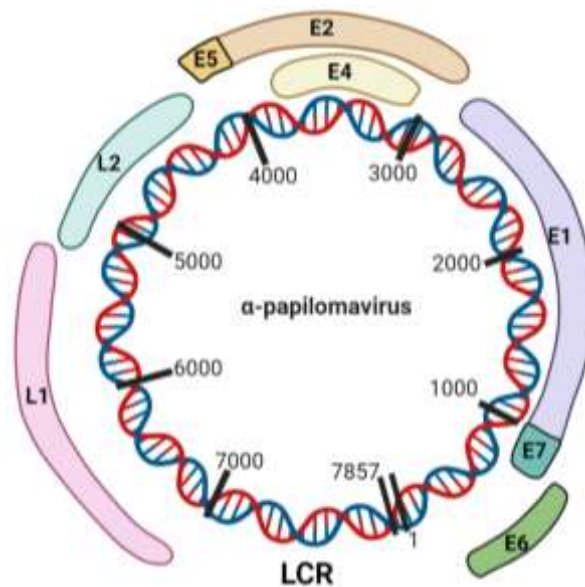


Figura 1. Genoma de los Alfa-VPH. En la figura se muestra los marcos de lectura abiertos de los genes de Alfa-VPH no estructurales o genes E (de la región temprana), los genes estructurales o genes L (de la región tardía) y la región larga de control (LCR), contenidos en el genoma viral circular de ADN bicatenario de alrededor de 8000 pb.

1.1.2 Infección viral

Durante la infección viral productiva de VPH se origina una descendencia viral dentro las células blanco (queratinocitos). La síntesis de nuevos viriones de VPH requiere que las partículas infecciosas del virus accedan a la capa basal de un epitelio o mucosa estratificado queratinizado y entren en las células en mitosis, un evento común en epitelios estratificados. La interacción viral con los queratinocitos es

resultado de pequeñas microheridas que permiten el paso de las partículas virales a través del epitelio.⁶

Los VPH son capaces de penetrar a los queratinocitos haciendo uso de la maquinaria de endocitosis. La internalización del VPH depende de la unión del virión a la matriz extracelular la cual está mediada por la interacción electrostática entre los residuos de lisina de la proteína L1 (Lisina 278 y Lisina 361) con las cadenas de glucosaminoglicano del proteoglicano heparan sulfato (HS) de la célula basal. Posteriormente, ocurre un cambio conformacional en la cápside viral que da como resultado un evento de escisión de furina en el extremo amino de la proteína L2, seguido de la transferencia/reclutamiento de moléculas secundarias de HS y la subsecuente transferencia al receptor de internalización viral. En este caso, las fosas de clatrina internalizan el virus en vesículas recubiertas.⁷

Después de la infección el genoma viral se establece como elemento extracromosómico o episoma en las células de la capa basal con un número bajo de copias (50-100/célula). El genoma del VPH no codifica para polimerasas de ADN ni otras enzimas necesarias para su replicación, por ende, estos virus dependen absolutamente de las proteínas de replicación de la célula huésped. Por esta razón el VPH requiere activar mitosis en la célula huésped para replicar su genoma.^{6,8}

Las proteínas encargadas de mantener la fase S del ciclo celular en los queratinocitos infectados para producir la replicación viral son las proteínas virales E6 y E7. En el caso de la proteína E6 esta tiene la función de promover la degradación de la proteína p53 conocida como “guardián del genoma”, lo que genera una inhibición de la apoptosis. Además de p53, E6 interfiere con otras

proteínas proapoptóticas como Bak, Bax, FADD, Procaspasa 8 y c-MYC para inhibir la apoptosis.⁹

En el mismo sentido, la oncoproteína E7 es importante para la inmortalización celular. E7 se une a los miembros de la familia Rb promoviendo su degradación, lo cual conduce a la liberación y activación de los factores de transcripción E2F que a su vez activan la expresión de genes involucrados en la fase S del ciclo celular. La acción combinada de ambas proteínas da como resultado la anulación de muchos puntos de control del ciclo celular para mantener la fase S en los queratinocitos infectados estimulando mitosis, y se expresan constitutivamente en células de cáncer cervical por lo que se les considera como oncoproteínas.

Para asegurar la segregación de genomas virales entre las células hijas de una célula infectada, se produce la interacción de la proteína viral E2 con la proteína de bromodominio 4 (Brd4) que vincula a los genomas virales con los cromosomas celulares.¹⁰ Posteriormente, la expresión de la proteína E2 produce la represión del promotor temprano de VPH en la LCR y los niveles de E6 y E7 disminuyen deteniendo su efecto hiperproliferativo y permitiendo a la célula infectada continuar con su programa de diferenciación terminal. Durante éste proceso, la proteína E2 interactúa con E1 (una helicasa de la familia AAA + que interactúa y desdobra al ADN para permitir acceso a la maquinaria replicativa)¹¹ en el origen de replicación viral en la LCR captando las ADN polimerasas celulares α (primasa), δ y ϵ y otras proteínas celulares componentes del replisoma celular. Durante la fase replicativa inicial, el complejo E2/E1 capta las ADN polimerasas y en sincronía con el ciclo celular produce copias del genoma viral por un mecanismo de replicación

bidireccional o θ . Sin embargo, una vez iniciada la diferenciación del queratinocito infectado, se produce una fuerte replicación viral pero ahora por un modelo de círculo rodante (>1000 copias por célula) manejada por las ADN polimerasas capturadas por el complejo E2/E1.¹² Los abundantes genomas virales en las capas superiores de epitelio infectado son encapsidados espontáneamente por L1 y L2 dando como resultado la producción de miles de viriones por célula que son liberados mediante la descamación del epitelio.¹³

En la ausencia de E2, las proteínas E6 y E7 se producen de manera constitutiva induciendo la proliferación descontrolada de los queratinocitos del estrato basal del epitelio. Esta condición se presenta cuando el genoma de VPH se integra al genoma celular por el gen E2 y la acción conjunta de la inhibición de apoptosis con proliferación descontrolada por la acción de E6 y E7 pueden ocasionar la acumulación de mutaciones a través del tiempo lo que deriva en una aparición y progresión del cáncer.^{6,9}

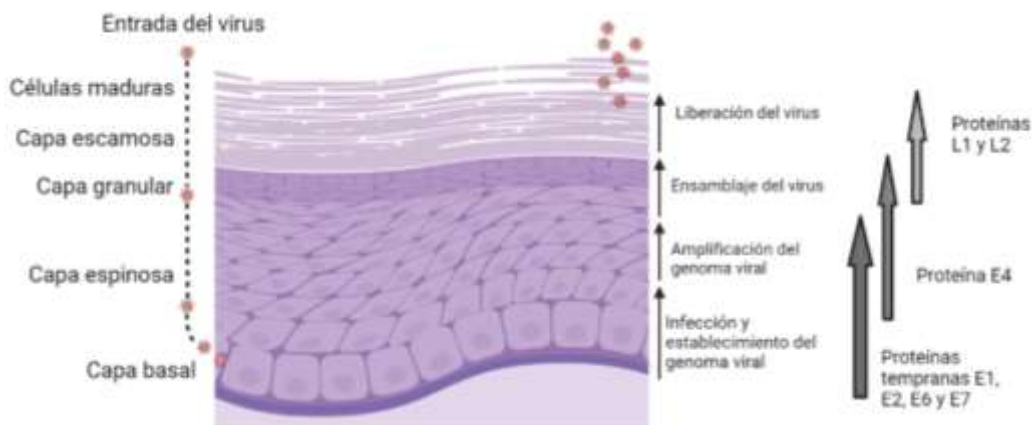


Figura 2. Ciclo de infección del virus del papiloma humano. El virus del papiloma humano ingresa a la capa basal del epitelio expuesto por microlesiones infectando a los queratinocitos. En la parte de la izquierda de la figura se muestra un epitelio sano mientras que en la parte de la derecha se muestra un epitelio infectado por VPH. Cuando sucede la infección, el genoma del virus se establece en el núcleo de manera episomal en un bajo número de copias, posteriormente se comienzan a expresar los genes virales tempranos para empezar a replicar el genoma viral que se replica junto

con el ADN celular. A medida que las células se van dividiendo a su vez se van diferenciando y se alejan de la capa basal, esto conduce a la etapa de producción del ciclo de vida viral para el cual necesita la maquinaria celular encargada de la síntesis de ADN. La expresión de las oncoproteínas E6 y E7 desregula el ciclo celular, conduciendo a las células diferenciadas a la fase S donde se amplifica el genoma viral. Posteriormente, se expresan las proteínas L1 y L2 que encapsulan el genoma viral y los viriones se liberan en la capa superior del epitelio.⁶

1.1.3 Diagnóstico

La prevalencia de infecciones causadas por VPH varía según la población estudiada. Las tasas de infección están influenciadas por la geografía, la edad, la historia sexual, las co-infecciones, el estado inmunitario y los factores genéticos. Aunque la mayoría de las infecciones por VPH desaparecen, las que persisten se asocian con un mayor riesgo de neoplasia cervical.¹⁴

Actualmente existen diversas metodologías para la detección de VPH de alto riesgo, algunas de ellas están basadas en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos como el *Southern blot* o el *Dot blot* pero tienen la desventaja de tener una sensibilidad baja, son tardados y requieren grandes cantidades de ADN purificado. También existen ensayos de amplificación de señal (Cervista HPV y Captura de híbridos) y ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (PCR, qPCR), pero tienen la desventaja de necesitar personal altamente capacitado, costos elevados por prueba y algunos requieren el uso de anticuerpos o sondas de ARN.¹⁵

Por otro lado, la detección inmunológica del VPH tiene tres obstáculos: 1) las proteínas de la fase tardía (proteínas de la cápside) solo se expresan en infecciones productivas, 2) las proteínas de la fase temprana se expresan en cantidades bajas en los tejidos infectados y 3) Se requieren anticuerpos específicos, sensibles y de alta calidad que detecten la presencia de las proteínas virales. Este tipo de métodos

no es recomendable para la discriminación de los tipos de VPH. La secuenciación del genoma viral es la única metodología que es capaz de reconocer y discriminar todas las variantes de VPH presentes en las muestras biológicas. Sin embargo, para la aplicación de este método se requiere equipo costoso y personal altamente capacitado.¹⁶

1.1.4 Terapia contra infecciones por VPH

Las infecciones por VPH y sus lesiones asociadas pueden disminuir el riesgo con el uso de preservativo; sin embargo, esto no impide que las zonas genitales no cubiertas por el mismo sean infectadas por lo que esto es solo una protección parcial.^{17,18}

Así mismo, la vacunación profiláctica contra la infección por VPH es capaz evitar la infección persistente, por lo que se considera que es la mejor estrategia para prevenir tumores anogenitales y verrugas.¹⁹ Las vacunas contra el VPH actualmente disponibles consisten en la administración de partículas similares a virus (VLP, *Virus Like Particles*). Las VLP son estructuras similares a las cápsides virales, pero no contienen genoma viral y estas al ser administradas a los pacientes en vacunas activan el sistema inmune induciendo la producción de anticuerpos neutralizantes protectores contra virus auténticos.¹⁸

Para el tratamiento de las verrugas anogenitales es necesario valorar cada caso de forma individualizada, puesto que el tratamiento para cada caso puede variar. Para esto se consideran diversos factores, como la extensión y tipo de lesiones, el

impacto psicológico, la experiencia del médico y el aspecto económico del paciente.²⁰ Asimismo, es importante destacar que los tratamientos no tienen como objetivo erradicar la infección viral sino eliminar los síntomas y las verrugas.

Uno de los tratamientos más usuales ya que suele ser aplicados por el mismo paciente es el uso de tópicos como el imiquimod el cual es un fármaco modificador de la respuesta inmune ya que este fármaco es capaz de estimular la producción de alfa-interferón, TNF, IL-1, IL-6, IL-8 y otras citoquinas.²¹ Otro tratamiento tópico usado son las sinecatequinas o polifenol E (Veregen®) el cual es también modificador de la respuesta inmune. Aún no está dilucidado el mecanismo de acción, pero este fármaco es capaz de bloquear el ciclo celular y la transcripción del VPH, y a su vez activa apoptosis en las células infectadas.²⁰

Por otro lado, existen otros tratamientos para la eliminación de las verrugas donde se requiere la intervención médica como lo es la crioterapia la cual consiste en el uso de nitrógeno líquido (-196°C) aplicando ciclos completos de congelación-descongelación lo que promueve la destrucción de tejidos mediante necrosis producida. A pesar de ser un tratamiento eficaz en la eliminación de las verrugas, este tratamiento cuenta con una elevada recurrencia 21-42%.²⁰

Del mismo modo, las verrugas genitales pueden retirarse mediante escisión con tijeras a nivel de dermis superficial, ablación láser o mediante electrocauterización, siempre tras infiltración de anestesia. Las tasas de eficiencia en este tratamiento son altas (89-100%); sin embargo, en uno de cada tres pacientes las verrugas vuelven a aparecer al cabo de un tiempo.²²

1.1.5 Partículas virales

El cultivo de VPH se dificulta debido a que su ciclo de vida depende de la diferenciación del queratinocito, por lo tanto, se han desarrollado diversos sistemas para generar partículas virales sin la necesidad de pasar por la compleja diferenciación epitelial. Estos sistemas se utilizan partículas recombinantes como las partículas tipo virus (VLP), los pseudoviriones (PsV) y cuasiviriones (QsV) que superan la necesidad de estratificar y diferenciar el epitelio humano. Para la producción del VPH en su entorno natural se desarrollaron los cultivos organotípicos. Este sistema in vitro simula lo que sucede durante la diferenciación con el beneficio de evitar el uso de animales como sistema de xenoinjerto. Un inconveniente de este sistema es el alto costo de producción de los viriones, además de que el sistema de cultivo tarda de 3 a 4 semanas en producir partículas virales.²³

Los obstáculos para obtener viriones en un sistema in vitro fueron resueltos debido a que solo la expresión de L1 o la expresión de L1 y L2 juntas da como resultado el auto ensamblaje de las proteínas de la cápside lo que resulta en la producción de partículas tipo virus (VLP). Para la producción de PsV, además de las proteínas de la cápside, se co-transfecta un plásmido que codifica a una proteína reportera para que funcione como pseudogenoma. Aunado a esto, se puede transfectar el genoma completo del VPH en vez de solo el plásmido reportero lo que da como resultado la generación de los QsV.²⁴⁻²⁶

Los PsV fueron el modelo empleado para aislar la población de aptámeros en el antecedente directo de este trabajo debido a que contienen ambas proteínas de la cápside (L1 y L2) y al tener capacidad infectiva son más parecidos al virión natural que las VLPs. Asimismo, permiten monitorear fácilmente el proceso de infección debido al gen reportero, por lo que es factible evaluar cuantitativamente la infección.²⁷

1.2 Aptámeros

Los ácidos nucleicos tienen la capacidad de plegarse en estructuras tridimensionales complejas lo que les confiere una funcionalidad y reactividad muy diversa. En 1990, Szostak y Gold informaron de manera independiente el aislamiento de pequeños oligonucleótidos con funciones predefinidas dadas sus configuraciones tridimensionales, a estas pequeñas secuencias de ácidos nucleicos las denominaron como “Aptámeros”, una palabra quimera que deriva de la expresión latina “aptus” que significa “encajar” y la palabra griega “meros” que significa “parte”, por lo que podría interpretarse como “parte que encaja”.^{28,29}

En este sentido, los aptámeros son pequeños oligonucleótidos de ADN o ARN monocatenario que son capaces de reconocer específicamente una diana basándose en su estructura tridimensional única. Esta estructura tridimensional está dada por diversas interacciones que la estabilizan incluidas las hidrofóbicas, electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, la complementariedad WC, Hoogstein, Wobble y apilamiento de bases que confieren

a los aptámeros la capacidad de distinguir entre moléculas estrechamente relacionadas como isómeros conformacionales, dianas que contienen diferentes grupos funcionales o incluso el cambio de un aminoácido.^{30,31}

Los aptámeros pueden modular la función de sus dianas al unirse de manera similar a los anticuerpos. Además de su alta especificidad y afinidad, los aptámeros tienen ventajas únicas como la baja inmunogenicidad, la facilidad de producción e incluso la susceptibilidad de modificaciones químicas que le confieren diversas funcionalidades que pueden ser aprovechadas para el diagnóstico y terapia en distintas áreas.³²

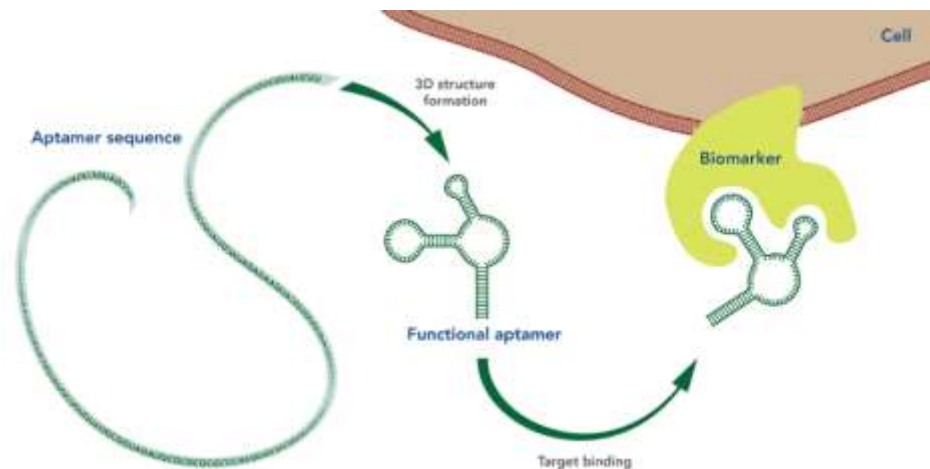


Figura 3. Unión del aptámero a su diana. Los aptámeros tienen una secuencia nucleotídica definida la cual adquiere una conformación tridimensional única que le permite interactuar de manera específica y unirse con su blanco.

1.2.1 Aislamiento de aptámeros

La generación de aptámeros específicos para un objetivo de interés está dada por un método de evolución molecular *in vitro* desarrollado en 1990 a la par por dos

grupos de investigación: Tuerk & Gold y Ellington & Szostak, el cual es denominado SELEX (por sus siglas en inglés, Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial).^{33,34} Este proceso implica 3 etapas generales la selección, la partición y la amplificación (figura 4). La generación de una poza de oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla (hasta 10^{12} - 10^{15} secuencias aleatorias), de una longitud variable de 20 a 80 nucleótidos flanqueados por regiones constantes que sirven como sitios de unión a cebadores para su amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas secuencias son incubadas con la diana inmovilizada y posteriormente las secuencias unidas a la diana se particionan y las no unidas se eliminan. Las secuencias unidas son recuperadas y amplificadas mediante PCR generando secuencias de ADNdc que son purificadas dando como resultado una nueva poza enriquecida con secuencias afines al objetivo. Las secuencias purificadas pueden ser secuenciadas para identificar la secuencia de los aptámeros obtenidos o bien, continuar con más rondas de SELEX. Finalmente, conforme aumentan las rondas de partición los aptámeros específicos se enriquecen e identifican mediante secuenciación de próxima generación (NGS).^{31,35,36}

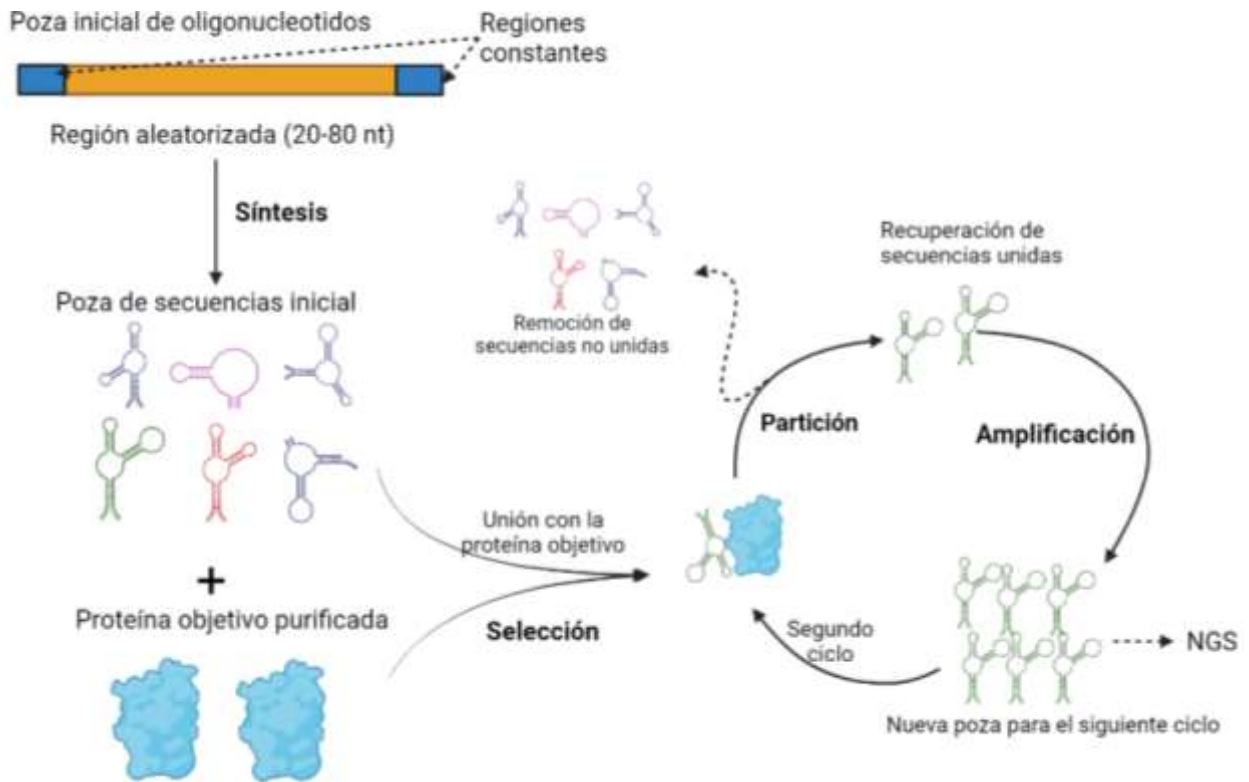


Figura 4. Proceso de aislamiento de aptámeros. Etapas generales del método SELEX que comprende la selección de secuencias por la unión al blanco, posteriormente la partición la cual comprende la remoción de secuencias no unidas al objetivo, a continuación, sigue la etapa de amplificación en la que se recuperan y amplifican las secuencias que se unieron al objetivo.

1.2.2 Ventajas de los aptámeros

Los aptámeros son ampliamente conocidos por superar las desventajas de los anticuerpos. Algunas de las ventajas de los aptámeros a comparación a los anticuerpos son: Alta estabilidad, los aptámeros se caracterizan por ser más estables térmicamente debido a que las altas temperaturas causa que los anticuerpos se desnaturalicen irreversiblemente; Fácil producción de aptámeros (síntesis/modificación) ya que una vez que son seleccionados pueden sintetizarse con gran precisión y reproducibilidad a gran escala mediante reacciones químicas, mientras que los anticuerpos requieren inmunoensayos para confirmar su actividad

en cada nuevo lote, además, de que su costo de producción es más elevado; Baja inmunogenicidad: suelen tener baja respuesta inmunitaria y son poco tóxicos debido a que el sistema inmunitario no suele reconocer ácidos nucleicos; variedad de objetivos, los aptámeros pueden reconocer objetivos que no reconocen los anticuerpos como iones o moléculas pequeñas lo que les confiere la capacidad de actuar como biosensores.³⁶

1.2.3 Aptámeros y sus aplicaciones

Los experimentos SELEX pueden realizarse contra una gran diversidad de moléculas como las proteínas, nanopartículas o incluso células enteras. Es por ello que los aptámeros se pueden usar como reactivos para la purificación por afinidad, así como biosensores reemplazando a los anticuerpos. Asimismo, las bajas afinidades de unión nanomolar junto con la gran especificidad convierten a los aptámeros en poderosas herramientas muy versátiles para el diagnóstico y la terapia dirigida.³⁰

En la actualidad se han aislado exitosamente una gran variedad de aptámeros con funcionalidades diversas que dan origen a diferentes clases de aptámeros como los aptámeros inhibidores y similares a señuelos, aptámeros reguladores, aptámeros multivalentes/agonistas e incluso aptámeros que actúan como vehículos de administración.³²

Un área emergente de los aptámeros es la identificación de objetivos asociados a distintos fenotipos celulares, ya sean patógenos o no. En este aspecto, se

seleccionan y caracterizan aptámeros que se unen a un tipo celular específico o una subpoblación de células malignas como las tumorales. La generación de este tipo de aptámeros puede ayudar a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y diagnósticas (teragnóstica).²⁹

II. Antecedentes

Investigaciones previas mostraron el potencial de los aptámeros para inhibir infecciones virales mediante su unión con las proteínas de VIH, virus de la hepatitis B, virus de la influenza, virus de la rabia e incluso se han reportado aptámeros contra la proteína E7 del VPH16.³⁷ Nicol *et al.* identificaron un aptámero de ARN (A2) que interrumpió la interacción entre E7 y pRb *in vitro*. Este aptámero se unía al residuo N-terminal de E7 que se sabe que participa en la interacción con pRb. La transfección de células transformadas por VPH16 con el aptámero A2 resultó en la pérdida de la presencia de E7 y el aumento en los niveles de pRB lo que conducía a apoptosis celular.³⁸ Belyaeva *et al.* Aislaron un aptámero (F2) que inhibe la interacción entre E6 y el dominio PDZ1 de Magi-1. Este aptámero demostró ser efectivo para inducir apoptosis en células derivadas de un carcinoma cervical transformado por VPH16. La capacidad de unión del aptámero para afectar las interacciones E6-PDZ destacan los beneficios de los aptámeros como posibles agentes terapéuticos o de diagnóstico.³⁹ Nuestro grupo de investigación reportó en 2011 el aislamiento de un aptámero de RNA denominado G5 α 3N.4, que mostró alta especificidad de unión por la oncoproteína E7 de VPH tipo 16 y una afinidad comparable a otros aptámeros aislados contra blancos pequeños ($K_D = 1.9 \mu\text{M}$).⁴⁰ También, nuestro grupo de trabajo reportó el aislamiento del aptámero de ARN llamado Sc5c3 que se une a la proteína L1 en un modelo de pseudovirus de VPH16 (PsV16), inhibiendo la pseudoinfección *in vitro* bloqueando la interacción con el receptor celular. La incubación de este aptámero con el PsV16 previo a la infección

dio como resultado una disminución dependiente de la dosis de la pseudoinfección.⁴¹

Previamente, nuestro equipo de investigación aisló y caracterizó el aptámero E de DNA que se une con alta afinidad y especificidad a PsV formados por la proteína L1 y L2 de VPH18 (PsVPH18) (datos no publicados). La estructura del aptámero E consta de 40 nucleótidos que forman una horquilla principal seguido de tallos y burbujas menores.

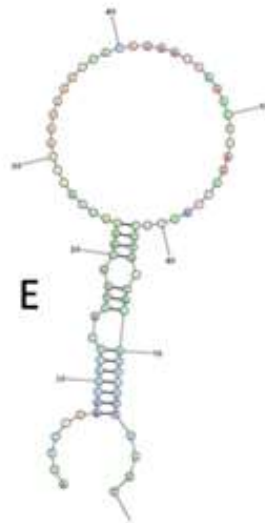


Figura 5. Estructura secundaria del aptámero E. La estructura principal del aptámero E está dada por los 40 nucleótidos que lo componen, tiene una estructura tallo-bucle principal, seguida de 2 tallos y 2 burbujas, finalmente consta de una burbuja abierta.

Los ensayos de unión mostraron una fuerte interacción entre el aptámero E y los PsVPH18, con una constante de disociación (K_d) en el rango nM sugiriendo que ésta fuerte unión podría impedir la interacción del virus con la superficie celular y de esta manera evitar la infección (datos en vías de publicación).

Las características fisicoquímicas que presentan los aptámeros los hacen una poderosa herramienta que presenta varias ventajas a comparación de los anticuerpos u otras drogas comunes, las cuales van desde su bajo nivel de inmunogenicidad, facilidad de síntesis e incluso menor presencia de efectos secundarios a comparación de algunos de los tratamientos convencionales.⁴² Los reportes anteriores muestran evidencia del potencial de los aptámeros para el diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades como las relacionadas con virus. Son de gran interés los reportes anteriores sobre el aislamiento de aptámeros con alta afinidad y especificidad de unión contra distintas proteínas de VPH, debido a que muestran un buen panorama acerca del potencial de los aptámeros como herramientas terapéuticas y de diagnóstico contra este virus. Por lo tanto, seguir con estas investigaciones es de gran interés para el descubrimiento de nuevas herramientas que ayuden a contrarrestar el elevado número de infecciones virales y las consecuencias que conllevan.

III. Justificación

El cáncer cervical es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en las mujeres de todo el mundo con una incidencia de alrededor de 600,000 casos nuevos y 340,000 muertes en 2020.⁴³ Aproximadamente el 90% de los nuevos casos y muertes fueron en países subdesarrollados. Asimismo, el tratamiento para este tipo de cáncer consiste en cirugía, radiación y quimioterapia los cuales pueden ser solos o combinados. Estos tratamientos siguen siendo deficientes ya que se suelen observar tumores residuales en aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer avanzado. Cabe destacar que el VPH18 es el segundo VPH más frecuente en tumores después del VPH16, lo que lo convierte en un virus de gran interés médico ya que se estima que es responsable de alrededor del 12% de los casos de carcinoma de células escamosas y 37% de los casos de adenocarcinoma cervical en el mundo. Por consiguiente, existe la necesidad de implementar nuevos enfoques terapéuticos y de diagnóstico que puedan mejorar la calidad de vida y supervivencia de los pacientes con cáncer cervical.^{9,44}

La identificación de nuevas biomoléculas terapéuticas y de diagnóstico como los aptámeros abren nuevas posibilidades para el tratamiento de infecciones virales debido a que poseen características que los catapultan como poderosas herramientas capaces de reemplazar el costoso uso de anticuerpos y otras moléculas terapéuticas, es por ello, que se propone analizar la capacidad de

inhibición de un aptámero aislado previamente por nuestro grupo de trabajo contra el VPH18 con el fin de evaluar su potencial uso como herramienta teragnóstica.

IV. Hipótesis

Si el aptámero E tiene especificidad por el dominio de unión a heparán sulfato de la proteína L1 del pseudovirus de VPH18 entonces será capaz de inhibir su interacción con el heparán sulfato que se encuentra en la superficie de las células hospederas (293TT), inhibiendo de esta forma la entrada del virus a las células.

V. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del aptámero E en el proceso de pseudoinfección de PsVPH18 en células 293TT.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Producir PsVPH18 en células 293TT

5.2.2 Caracterizar y detectar los PsVPH18 producidos en células 293TT

5.2.3 Cuantificar la capacidad de inhibición de la pseudoinfección de PsVPH18 después de la incubación con el aptámero E en células 293TT

VI. Materiales y métodos

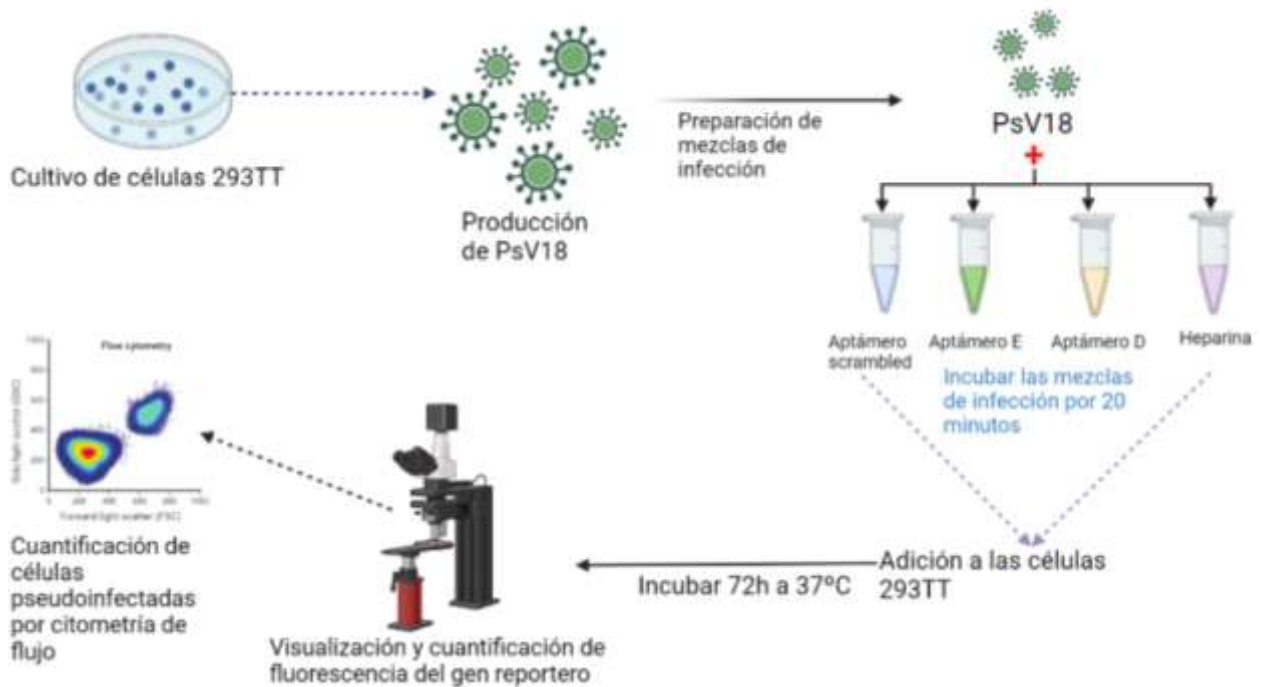


Figura 6. Diagrama de flujo de la estrategia experimental. La estrategia experimental consiste en el cultivo de células 293TT para la producción de PsVPH18, posteriormente, se prepararán las tres mezclas de infección que llevarán los PsVPH18 incubados con el aptámero E, aptámero D y Heparina, estas mezclas se añadirán cultivos de células 293TT individualmente y se incubarán a 72h a 37°C. Finalmente, se hará una evaluación por microscopía de fluorescencia y se cuantificará los porcentajes de fluorescencia por citometría de flujo.

6.1 Producción y caracterización de PsVPH18

6.1.1 Cultivo celular

Para el cultivo de células 293TT se utilizó medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) penicilina (50 I.U./mL), estreptomina (50 µg/mL), gentamicina (50 µg/ml) (PAA Laboratories, Inc., ON, Canadá) y 200 µg/mL de higromicina (Thermo Fisher Scientific. Estos cultivos celulares para la producción

de PsHPV18 fueron realizados en placas de 100mm a 37°C y 5% de CO₂. Los cultivos para las pseudoinfecciones fueron realizados en placas de 24 pozos colocando 1x10⁵ por pozo en las mismas condiciones.

6.1.1.1 Congelación y descongelación de células 293TT

Para la congelación y descongelación se utilizó medio DMEM suplementado con 10% de FBS) y medio de “congelación” (DMEM 5%FBS con 10% de DMSO, este medio debe ser preparado inmediatamente antes de utilizarse). Primeramente, para la congelación se pusieron los crioviales en refrigeración a 4°C para que se enfríen junto con el medio de congelación. Durante el enfriamiento de los crioviales se removió el medio de la caja, enseguida se lavó con 3 mL de DPBS para remover el exceso de medio y suero. Posteriormente, se agregaron 2.5mL de tripsina y se incubó 5 min a 37°C y 5% de CO₂. Después, se neutralizó la tripsina con 2.5mL de medio DMEM 5% FBS, enseguida se levantaron las células y se colocaron en un tubo cónico de 15mL para posteriormente determinar la cantidad y viabilidad celular. El siguiente paso fue centrifugar a 233 x g por 3 min, se retiró el medio y se resuspendió el pellet en un volumen determinado de medio de congelación para tener al menos 1x10⁵ de células por mL. Finalmente, se llevan los crioviales 15 minutos a 4°C, luego 30 minutos a -20°C, pasado los 30 minutos se dejan los crioviales 1 hora a -80°C y por último se almacenaron al nitrógeno líquido para su conservación.

Para la descongelación se requiere que el medio DMEM 5% FBS esté pre-calentado a 37°C. Al mismo tiempo se pusieron los crioviales a baño maría a 37°C, en cuanto se descongelaron se transfirió el contenido del criovial a un tubo cónico de 15mL

con 3mL de DPBS (KCl 2.67 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, NaCl 136.9 mM y Na₂HPO₄, pH 7.4), lo siguiente fue centrifugar 3 minutos a 233 x g. Una vez terminada la centrifugación se retiró el medio y se resuspendió el pellet en 2mL de medio “complemento”, inmediatamente después de la resuspensión se transfirió el pellet a una caja Petri de 100mm con 6mL de medio DMEM 5% FBS Se dejó la caja O.N y al siguiente día se cambió el medio con 6mL de DMEM suplementado con 5% de FBS y antibióticos (incluyendo higromicina), se incubó a 37°C y 5% de CO₂ y a partir de aquí se observaron las células diariamente hasta su completo despertar.

6.1.2 Producción de plásmidos p18shell y pSVLYFP

Las bacterias DH5α (-endA1, -*hsdR17*, Δ(*lacZ*), -*recA*) transformadas con su respectivo plásmido mediante choque térmico se inocularon en 100mL de medio LB suplementado con ampicilina (200 μg/mL). Este pie de cultivo se incubó a 37°C en agitación a 230 r.p.m. durante 18 horas. Posteriormente, se centrifugó a 6000 x g por 15 min a temperatura ambiente. Se decantó el medio y el pellet se resuspendió en 4 mL de tampón P1 (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) y se utilizó el vórtex para homogenizar. Enseguida se añadieron 4mL de tampón P2 (NaOH 0.1 M y SDS al 1%), esto se mezcló 6 por inversión y se incubó a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos. Posterior a esto se agregó 4mL de tampón P3 frío (Acetato de potasio 1.5 M, pH 5.5), se mezcló por inversión 6 veces y luego se incubó 20 minutos en refrigeración a 4°C. Para obtener los plásmidos se siguieron las instrucciones del fabricante, primeramente, se clarificó el sobrenadante haciéndolo pasar por un filtro (QIAfilter Midi Cartridges), el sobrenadante eluido de la columna fue recolectado en

un tubo cónico de 15mL, enseguida se precipitó el DNA añadiendo 0.7 volúmenes de isopropanol absoluto frío se mezcló y fue dividido en microtubos de 1.5mL para una posterior centrifugación a 17,460 x g durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, se decantó el sobrenadante y se lavó dos veces con 1mL de etanol al 70% centrifugando a 17,460 x g por 10 minutos por lavado, después se decantó el etanol para dejar secar el pellet a temperatura ambiente el cual fue resuspendido en 200 µL de agua libre de nucleasas (H₂O_{LN}).

6.1.3 Caracterización de los plásmidos p18Shell y pSVLYFP

Una vez obtenida la cantidad necesaria de plásmido para la transfección (27 µg de p18Shell y 15µg de pSVLYFP por caja de 100mm) se requirió hacer una caracterización de los plásmidos. Para ello se realizó una restricción enzimática, para la caracterización de p18Shell se utilizó 1µg de plásmido, incubándolo con las enzimas EcoRV y XhoI en tampón R. En el caso de pSVLYFP se utilizó únicamente la enzima BamHI de igual manera en tampón R. Ambas restricciones se dejaron en baño María a 37°C O.N.

Los fragmentos resultantes de las restricciones enzimáticas fueron separadas mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa 1% a 100V por 40min, posteriormente se llevó el gel a bromuro de etidio para visualizar los fragmentos en el transiluminador (Enduro™ GDS Touch, Labnet).

6.1.4 Producción de PsVPH18

Para la producción de PsVPH18 se incubaron 5×10^6 células en una placa de 100mm en 5mL de DMEM 5% FBS y antibióticos y se incubaron de 14 a 16 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se reemplazó el medio con 4mL de medio OptiMEM® (Thermo Fischer Scientific), se incubó durante una hora, mientras transcurría este tiempo se prepararon las mezclas de transfección la primera contenía 27 µg de p18sheLL y 15 µg de pSVLYFP en 0.5 mL de OptiMEM® y la otra mezcla contenía 16 µL de Lipofectin® (Thermo Fischer Scientific) con 0.5 mL de OptiMEM®. Ambas mezclas fueron mezcladas por vórtex e incubadas 20 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se mezclaron los plásmidos con el agente transfectante 6 veces mediante inversión y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se adicionó 1mL de esta mezcla a los 4mL de OptiMEM® que tenían las cajas con células y se incubó 7 horas. Transcurrido este tiempo se cambió por 10mL de DMEM 5% FBS y se incubó 72h. Se retiró el medio reservándolo en un tubo cónico de 50mL y posteriormente se lavaron las células con 5mL de DPBS y se recuperó el DPBS colocándolo en el mismo tubo donde se reservó el medio. Enseguida se adicionó 5mL de tripsina a las células y se incubó durante 5 minutos a 37°C, posterior a los 5 minutos se neutralizó la tripsina con 5mL del medio previamente reservado y se desprendieron todas las células para ser colocadas en el tubo cónico de 50mL. Después, se centrifugó a 233 x g durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en 500µL de DPBS-MgCl₂ (KCl 2.67 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, NaCl 136.9 mM y Na₂HPO₄, MgCl₂ 5 mM, pH 7.4), las células resuspendidas se pasaron a un microtubo de 1.5mL de baja adherencia

donde se adicionó Brij58 a una concentración de 0.25% y se incubó a 37°C durante 24 horas, mezclando por inversión 10 veces cada hora, al menos por 3 horas. 1 hora antes de culminar las 24 horas al lisado se le adicionó Benzonasa® (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0.1% y se incubó durante 1 h a 37°C. Luego, el lisado celular maduro se colocó en hielo durante 10 minutos pasado este tiempo se añadieron 0.17 volúmenes de NaCl 5M frío y se incubó de nuevo durante 10 minutos en hielo. Este lisado se clarificó mediante centrifugación a 2000 x g por 15 minutos, después se añadió el sobrenadante a la parte superior del gradiente de OptiPrep™ (Sigma). Este gradiente se realizó en tubos para ultracentrifugación (rotor SW41Ti) para ello se utilizó una jeringa de 3mL colocando primeramente 2.7mL de OptiPrep™ al 27%, posteriormente se agregaron 2.7mL de de OptiPrep™ al 33% para que desplace al de OptiPrep™ de menor densidad hacia arriba y por último se colocó al fondo del tubo OptiPrep™ al 39% y se incubó el gradiente durante una hora a temperatura ambiente. Una vez colocado el lisado en la parte superior del gradiente se colocó el tubo en las camisas del rotor para ser ultracentrifugado a 170,000 x g por 20 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo de ultracentrifugación se realizó un orificio en la parte inferior del tubo con una jeringa ultrafina (27 x 38mm) y se recolectaron 10 fracciones de 500µL cada una.

Para evaluar en que fracción se encontraban los PsVPH18 se llevó a cabo una Inmunodetección de la proteína L1, se seleccionaron las fracciones con presencia de L1 para ser purificadas mediante filtración usando una columna de Sephadex G25. Por último, se realizó una Inmunodetección nuevamente para las fracciones purificadas para verificar la presencia de L1 y detectar aquellas fracciones con

mayor señal de L1 para una posterior pseudoinfección y así verificar la infectividad de los PsVPHV18.

6.1.5 Caracterización de los PsVPH18 con Inmunodetección de la proteína L1

Para la Inmunodetección se colocaron 12 μ L de cada fracción en un microtubo (ya sea la obtenida después del gradiente o después de la purificación) y se le añadió 3 μ L de solución tampón Laemmli 5X (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 25%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 2% (v/v), azul de bromofenol 0.01% (p/v)) y se llevaron a ebullición durante 10 minutos, posteriormente, se cargaron las proteínas desnaturalizadas después de la ebullición en un gel de poliacrilamida para su separación. Para electroforesis se utilizó un gel concentrador al 4% (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 0.1% (p/v)) y un gel separador al 8% (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.1% (p/v)) en tampón TGS (Tris-HCl 25mM pH 8.3, glicina 192mM, SDS 0.1% (p/v)) durante 1 hora a 80 volts y otra hora a 100V. El contenido proteico del gel se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore Corporation, Bedford MA) usando tampón de transferencia (Tris-base 25mM pH de 8.3), glicina 192mM, Metanol 20% (v/v)) empleando el sistema de transferencia semihúmeda en el Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, California, Estados Unidos). Posterior a la transferencia se bloqueó la membrana con caseína utilizando leche descremada en polvo (Svelty®) al 15% en DPBS-Tween durante una hora en agitador de ola. Transcurrida la hora se añadió el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal HPV16 L1 [289-16981] (Santa Cruz Biotechnology, Cat. SC57834)) en una concentración 1:1000 en DPBS-Tween y se incubó durante 18 horas a 4°C en agitación suave.

Posteriormente, se realizaron 2 lavados a la membrana con PBS-Tween 0.1%, enseguida, el anticuerpo secundario se diluyó 1:2000 en leche al 15% y se incubó con la membrana en agitación suave durante una hora. Después se realizaron de nuevo dos lavados con PBS-Tween 0.1% durante 10 minutos. Posterior a los lavados se reveló la membrana con Luminata™ Classico (EMD Millipore, Billerica MA) utilizando un C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences Inc., Lincoln NE).

6.1.6 Purificación de aptámeros

Todos los aptámeros se adquirieron de T4 oligo® (ADN Artificial S.A.P.I., Gto., Mexico).

Los aptámeros se resuspendieron en un volumen de 200µL, se tomaron 100µL de esta resuspensión, enseguida se le añadió y homogenizó con tampón stop 2X (EDTA 0.5mM, Azul bromofenol 0.05%, Xylencianol 0.05%) en una concentración 1:1, después esto se llevó a ebullición a 85°C durante 10 minutos. Una vez transcurrido los 10 minutos se colocó la muestra en hielo durante 10 minutos, pasado este tiempo se cargó la muestra en un gel desnaturalizante de acrilamida:bisacrilamida 19:1 al 8% con urea 7M y se corrió a 300V durante 2 horas. Posteriormente, se llevó el gel al transiluminador para observar los fragmentos correspondientes a los 80nt del aptámero, una vez identificados se cortó el pedazo del gel que contenía la región de interés y se transfirió a un microtubo de 1.5mL pasandolo por una jeringa, ya en el microtubo se le agregó suficiente tampón de elución (Tris-HCl 20mM pH 7.5, Acetato de sodio 0.25M, EDTA 1mM, SDS 0.25% (v/v)) para cubrir el gel y se dejó a 37°C O.N. Al día siguiente, se pasó el contenido

del tubo a una jeringa y se hizo pasar el contenido por un filtro de $0.45\mu\text{m}$ a otro microtubo para deshacerse de la acrilamida. A este tubo se le agregó 1 volumen de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamilico y se centrifugó a $17,460 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posterior a la centrifugación se pasó la fase acuosa a otro tubo al cual se le agregó 0.1 volumen de acetato de sodio. Enseguida, se le agregó 2.5 volúmenes de etanol frio, se mezcló y se dejó a -20°C durante una hora. Después de que transcurrió la hora se centrifugó una hora a $17,460 \times g$ a 4°C , se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 1mL etanol al 75% centrifugando 15 minutos a 4°C . Por último, se dejó secar el pellet y se resuspendió en $42\mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas para posteriormente cuantificar en Nanodrop 2000 (Thermo scientific).

Se toma $1\mu\text{g}$ de la muestra purificada y se realiza otra electroforesis en gel desnaturalizante para observar que la banda correspondiente a la muestra este completamente libre de impurezas.

6.1.7 Cuantificación de unidades infectivas del stock viral

La pseudoinfectividad de los PsVPH18 se determinó por la cantidad de células fluorescentes infectadas con $1\mu\text{L}$ del stock viral. Para ello se inocularon 1×10^5 células 293TT en un pozo de una placa de 24 pozos y en 16 horas posteriores se le añadió $1\mu\text{L}$ del stock viral y se incubó durante 72 horas, realizando al menos 3 ensayos por stock viral. Transcurrido este tiempo las células fueron cosechadas y resuspendidas en $300\mu\text{L}$ de DPBS para llevarlas al citómetro de flujo y cuantificar la cantidad de células infectadas. Se realizó un promedio de las células

pseudoinfectadas en los 3 ensayos para determinar la cantidad de unidades infectivas.

6.1.8 Inhibición de la infección viral

Para evaluar la inhibición de la infección viral se incubarán los PsVPH18 con el aptámero E para permitir su unión a la cápside como se ha reportado anteriormente.⁴¹ Se inocularon 1×10^5 de células 293TT por pozo en una placa de 24 pozos usando 0.5mL de medio DMEM suplementado con 5% de FBS y antibióticos. 16 horas después se retiró el medio y se añadió 0.5mL de DMEM basal precalentado a 37°C y se incubó durante una hora para permitir que las células se vuelvan a adherir. Durante esta incubación se preparó la mezcla de infección con 4000UI de PsVPH18 con cantidades crecientes de aptámeros o heparina en un volumen final de 80µL de DPBS, estas mezclas de infección se incubaron durante 20 minutos en agitación suave. Enseguida se añadieron las mezclas de infección a las células y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 60 minutos. Posteriormente, se sustituyó el medio por 1mL de DMEM suplementado con FBS y antibióticos para dejar incubando 72 horas, finalmente transcurrido este tiempo se observó la fluorescencia y se cosecharon las células para llevarlas al citómetro.

6.1.9 Citometría de flujo

Para la cosecha de células se retiró el medio del pozo y se colocó en un microtubo de 1.5mL ya que suele haber células fluorescentes flotando en el medio, se lavaron

suavemente las células con 200µL de DPBS y se recuperó el DPBS para depositarlo en el mismo microtubo donde está el medio. Posteriormente, se añadieron 200µL de tripsina y se incubaron las células por 2 minutos a 37°C, se neutralizó la tripsina con 200µL de medio DMEM y se recuperaron las células en el microtubo. Se llevó a cabo una centrifugación a 600 x g por 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se lavó con 1mL de DPBS para centrifugar nuevamente con las mismas condiciones y por último se resuspendió el pellet celular en 300uL de DPBS y esto se pasó a un tubo de poliestireno de 5mL y se llevó al citómetro de flujo FORTESSA donde se leyeron 10,000 eventos con el láser Alexa Fluor 488nm.

VII. Resultados

7.1 Producción y caracterización de los plásmidos p18Shell y pSVLYFP

Los plásmidos p18Shell y pSVLYFP fueron tomados del stock de plásmidos del laboratorio de Terapia Génica. Como se observa en la figura 7A cada producción plásmido se trabajó independientemente y lo primero que se realizó fue la obtención de los plásmidos empleando bacterias DH5α para ello se transformaron las bacterias mediante choque térmico, lo siguiente fue seleccionarlas como se muestra

en la figura 7B en cajas Petri con medio de selección LB sólido suplementado con ampicilina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Una vez teniendo bacterias transformadas se procedió a aumentar la cantidad de plásmido mediante pases de cultivo de 100mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como se muestra en el esquema de la figura 7C, para la extracción de los plásmidos se realizó una lisis alcalina.

Para la caracterización de los plásmidos se realizaron restricciones enzimáticas (Ver mapa de restricción de los plásmidos en el anexo 1 y 2). Como se observa en la figura 8 las bandas correspondientes a los fragmentos resultantes de la restricción enzimática corresponden con los pesos esperados siendo en el caso de p18Shell un fragmento de aproximadamente 3000pb y otro de 7500pb, los fragmentos de pSVLYFP corresponden a un fragmento de 700pb y otro fragmento de 5000pb

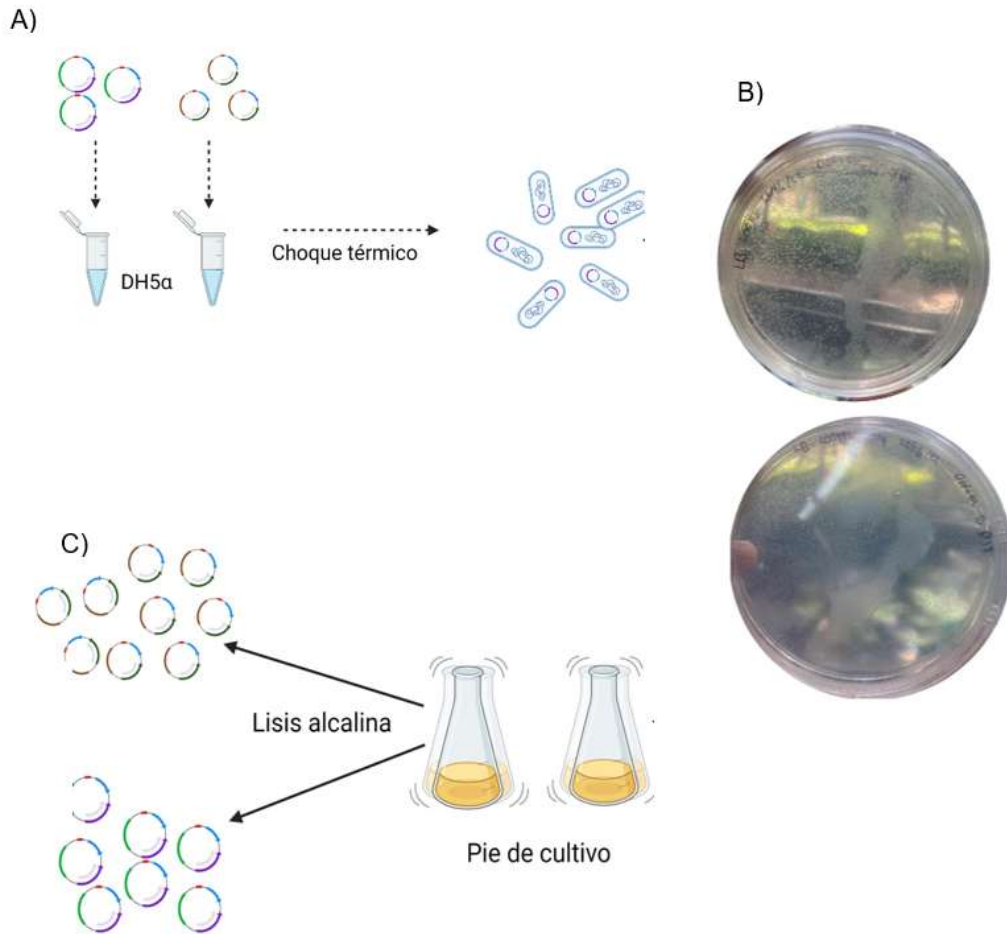


Figura 7. Producción de los plásmidos p18Shell y pSVLYFP. Esquema general de la producción de plásmidos para transfección. A) Transformación bacteriana mediante choque térmico. B) Selección de bacterias transformadas en medio sólido de selección. C) Producción de bacterias transformadas en medio de selección y posterior lisis alcalina para la extracción plasmídica (Midiprep).

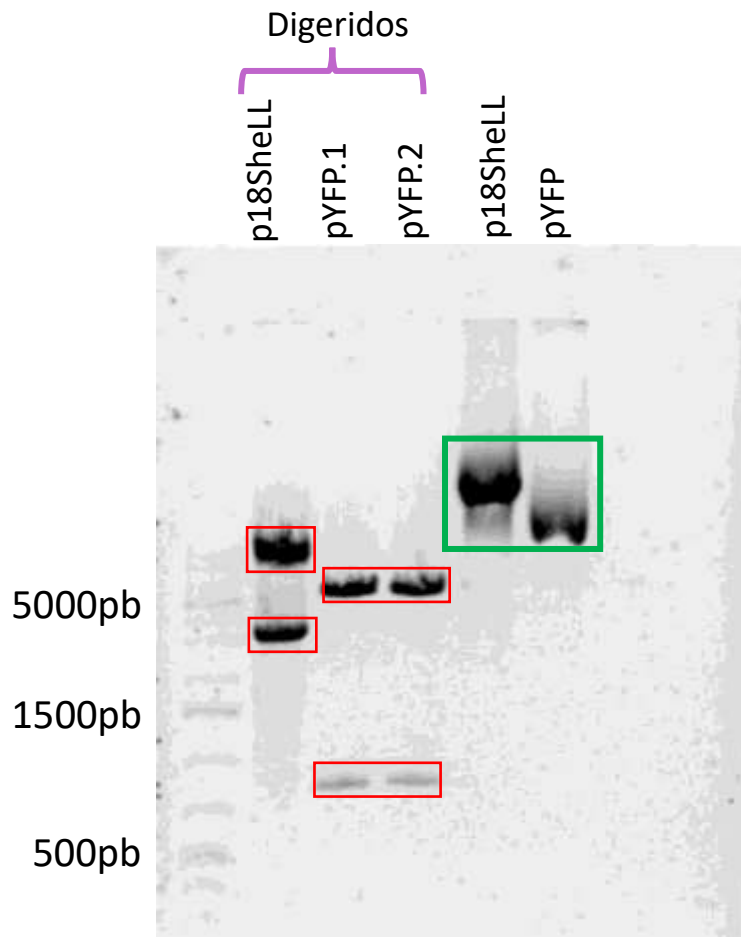


Figura 8. Caracterización plasmídica. Gel de agarosa al 1% donde se observan los fragmentos esperados (recuadros rojos) correspondientes a las restricciones enzimáticas de los plásmidos p18Shell y pSVLYFP (enzimas utilizadas en el Anexo 1). Además, se muestran dos controles del plásmido sin digerir (recuadro verde).

Estos resultados muestran una correcta producción y caracterización de los plásmidos que se requieren para la transfección de células 293TT y producción de pseudovirus tipo 18.

7.2 Producción de PsVPH18

La producción de pseudovirus está caracterizada por la transfección en células 293TT de los plásmidos p18Shell y pSVLYFP cuyas secuencias contienen la

secuencia de L1 y L2 de VPH18 y de la YFP (Yellow fluorescent protein), respectivamente. La expresión de estas proteínas se fundamenta en que los plásmidos contienen las secuencias de ambas proteínas, así como el origen de replicación y expresión del virus SV40. Una vez expresadas L1 y L2 estas se ensamblan espontáneamente en cápsides (ya que esta conformación las hace termodinámicamente estables) encapsulando el pseudogenoma que en este caso es el pSVYFP que contiene el gen reportero.

Para comenzar la producción de PsVPH18 se co-transfectan las células 293TT con 27µg de plásmido p18Shell que contiene la secuencia de las proteínas L1 y L2 de las cápsides virales de VPH18 y 15µg del plásmido pSVLYFP que funge como pseudogenoma. 72 horas después se observó la fluorescencia para comprobar la expresión del gen reportero lo que corrobora la transfección como se observa en la figura 9.

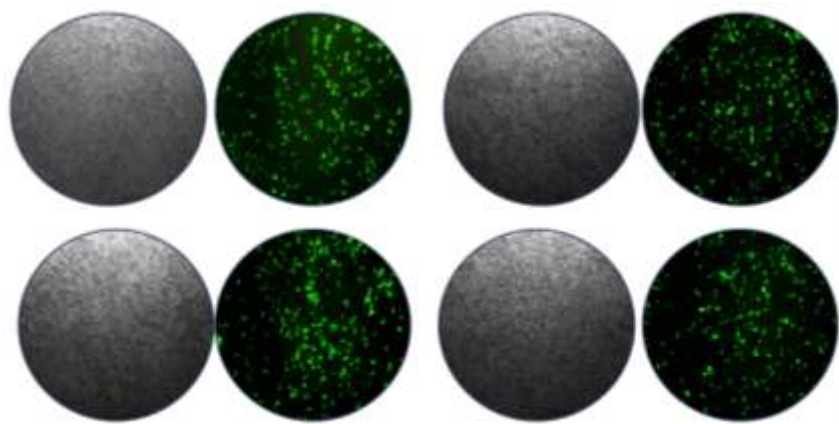


Figura 9. 72 horas post- transfección. Se transfectaron 4 cajas y primero se muestra las células en campo claro y a la derecha de la misma se muestra la fluorescencia correspondiente a la expresión de la proteína YFP.

Una vez comprobada la transfección se procedió a la cosecha de las células para liberar los PsVPH18 que y enseguida hacer una ultracentrifugación en gradiente de optiprep (figura 10) para separar los PsVPH18.



Figura 10. Gradiente de optiprep. Se observa en el primer tercio del gradiente una banda blanquesina que corresponde a los pseudovirus, además, se observa una banda más arriba que contiene a las cápsides virales sin pseudogenoma (VLP).

7.3 Caracterización de PsVPH18

Para la caracterización de PsVPH18 se realizó una Inmunodetección de la proteína L1, como se observa en la figura 11 se observan bandas ligeramente arriba de los 55kDa que corresponden a la banda esperada de L1.

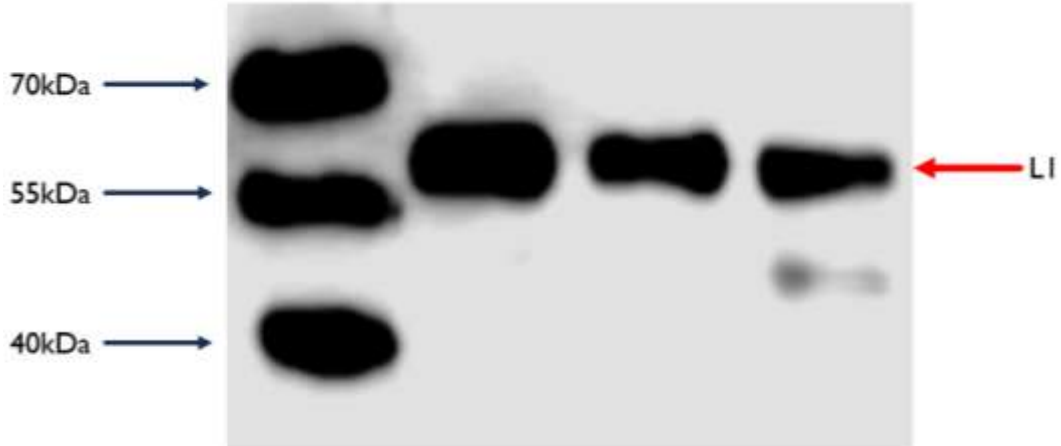


Figura 11. Ensayo de inmunodetección. Con esta Inmunodetección se observan las bandas correspondientes a la proteína L1 (flecha roja) de las cápsides virales de los PsVPH18 que se encuentran ligeramente arriba de los 55kDa.

Una vez detectada la proteína L1 de las cápsides virales se procedió a realizar una purificación de las fracciones que contenían la señal de L1, posterior a esta purificación se hizo otro ensayo de Inmunodetección de L1 para comprobar que los PsV seguían presentes (Figura 12).

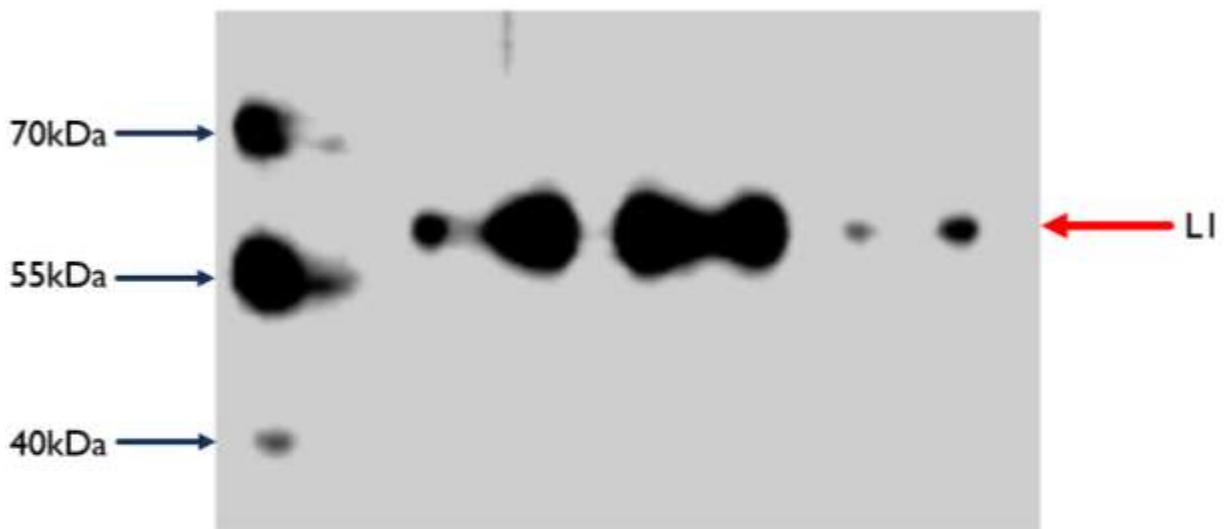


Figura 12. Ensayo de Inmunodetección post-purificación. Se detectó la presencia de la proteína L1 (flecha roja) después de la purificación en columnas Sephadex G-25.

Después de comprobar la presencia de los PsVPH18 post-purificación se realizaron ensayos de pseudoinfección (Figura 13) a concentraciones crecientes de PsVPH18 para corroborar la infectividad de los pseudovirus producidos.

Estos resultados prueban la correcta producción de PsVPH18 puesto que la la expresión de la proteína YFP (gen reportero) demuestra que los pseudovirus se encuentran íntegros y tienen capacidad infectiva.

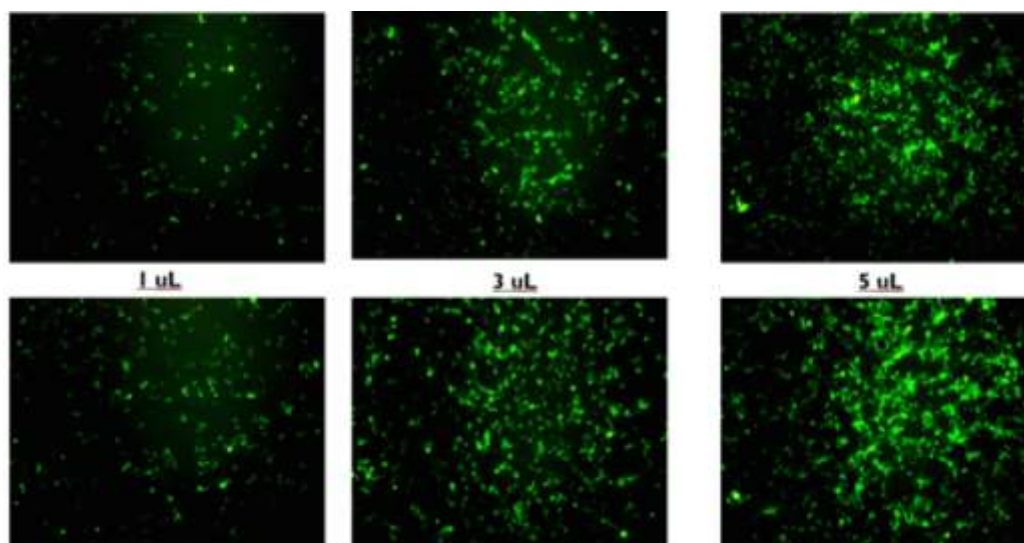


Figura 13. Ensayos de pseudoinfección. Estos ensayos fueron realizados a cantidades de 1 μ L, 3 μ L y 5 μ L. Como se puede apreciar conforme la cantidad aumenta, lo hace a la para la fluorescencia

7.3.1 Determinación de unidades infectivas

Para la cuantificación de unidades infectivas del stock viral se infectaron las células con 1 μ L de los stocks virales realizando mínimo tres ensayos como se muestra en la Tabla 1 que muestra los resultados obtenidos de los ensayos de infección con un

promedio que indica cuantas unidades infectivas se tienen aproximadamente en los

Unidades infectivas				Promedio
Fxn6	786	499	460	581
Fxn7	933	713	794	794

stocks virales.

Tabla 1.

72 horas post infección se llevaron las células al citómetro donde se cuantificaron cuantas células fluorescentes había por 10,000 eventos (Figura 14).

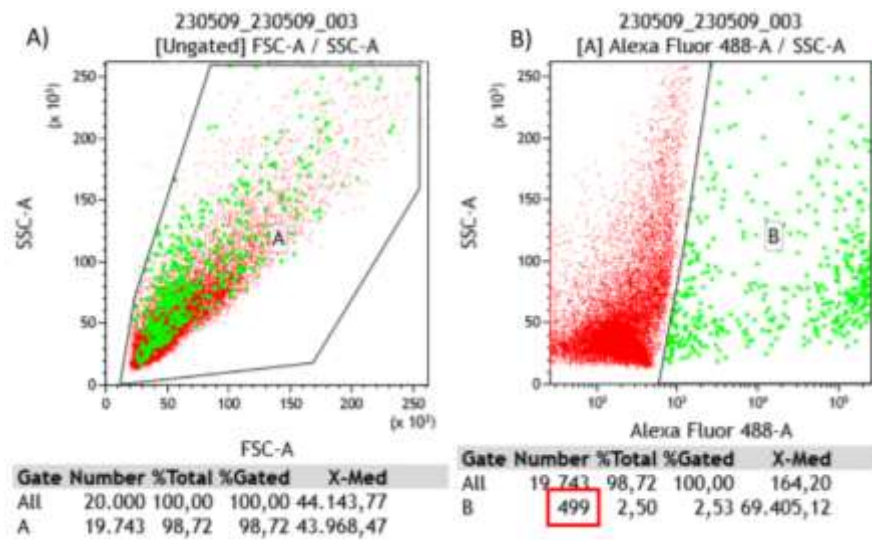


Figura 14. Unidades infectivas. A) En esta figura se muestra el área de análisis del citómetro de la población de células 293TT. B) Área de análisis que corresponde a las células fluorescentes, en el recuadro rojo se muestran la cantidad de células infectadas.

7.4 Purificación de aptámeros

Se realizó un gel desnaturante poliacrilamida (Figura 15) para separar los fragmentos inespecíficos que suelen venir en las síntesis de aptámeros con el fin de obtener solo la fracción que contiene los fragmentos deseados de los aptámeros scrambled, E y D.

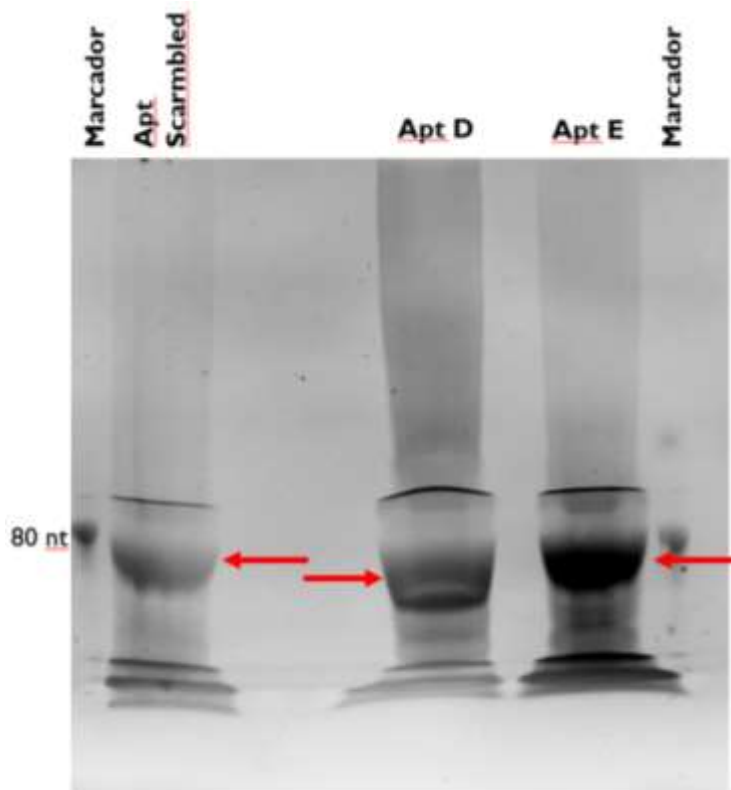


Figura 15. Gel desnaturante de poliacrilamida. En el primer y último carril se cargó un marcador de 80nt para poder determinar la banda correspondiente a los 80nt de longitud que coincide a la de los aptámeros. Con flechas rojas se observan las bandas mayoritarias a los 80nt que corresponden a los aptámeros.

Una vez realizada la purificación se procedió a correr otra electroforesis en gel desnaturante para apreciar si quedaron bien purificados o seguía habiendo fragmentos inespecíficos, como se observa en la figura 16 los aptámeros fueron

bien purificados puesto que no se observa ninguna otra banda además de la esperada, lo que confirma que no hay fragmentos inespecíficos.

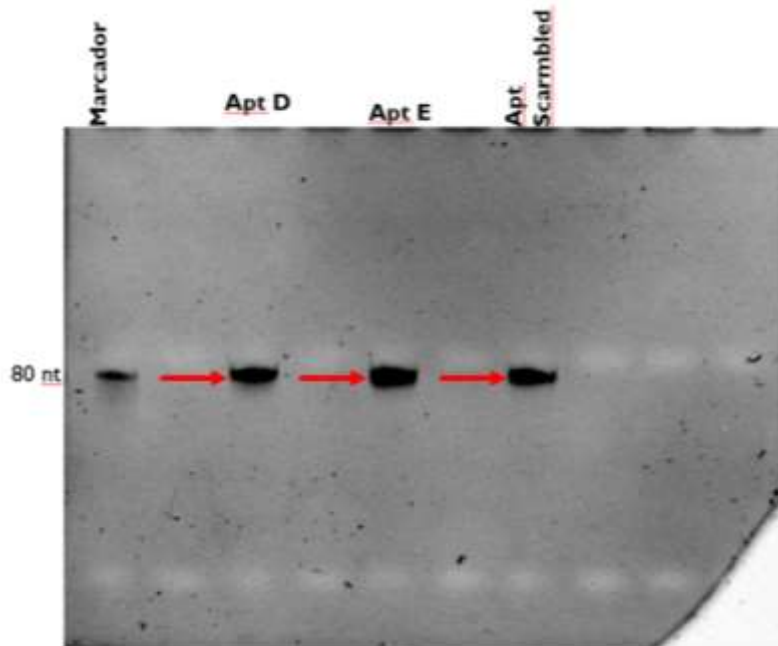


Figura 16. Gel desnaturalizante post-purificación. En el primer carril esta la banda del marcador de 80nt. En los siguientes carriles se observa la banda a 80nt que corresponde a la de los aptámeros (flechas rojas) y no se aprecia ningún otro fragmento.

7.5 Ensayos de interacción Aptámero-PsVPH18

En la figura 17 se muestran los resultados de los primeros ensayos de inhibición de la infección con los aptámeros sin purificar. Se puede observar que las infecciones con los aptámeros tienen un mayor porcentaje de infección y que la heparina está actuando correctamente.

10uM antes de aptámero sin purificar

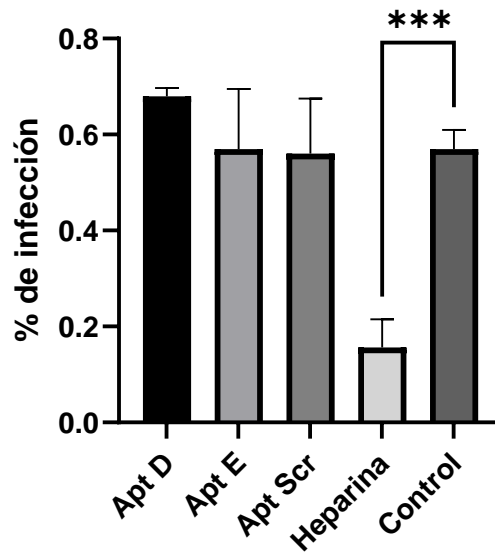


Figura 17. Ensayo de infección con aptámero sin purificar. Se muestran los porcentajes de infección de los ensayos de inhibición de la infección en donde los inhibidores muestran mayor infección que el control sin inhibidor, mientras que el control positivo si muestra una disminución en la infección.

Una vez se purificaron los aptámeros se procedió a realizar más ensayos de inhibición de la infección (figura 18), pero con una menor concentración de aptámero para ver cómo se comportaban los porcentajes de infección.

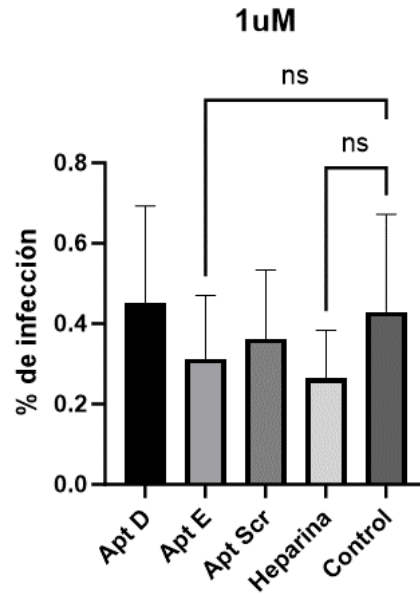


Figura 18. Ensayo de infección con 1uM de aptámeros y heparina. Los porcentajes de infección disminuyen ligeramente a comparación del control, siendo un poco más bajos el aptámero E y la heparina como se esperaba, sin embargo, no se encontró diferencia significativa (prueba t student, $\alpha=0.05$) que muestre que esta disminución en la infección sea por la presencia de los inhibidores.

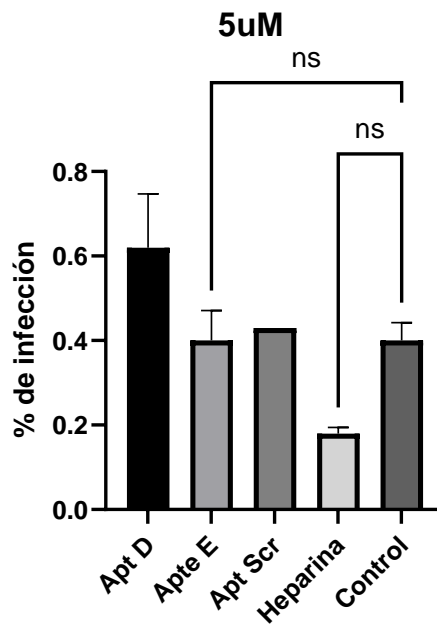


Figura 19. Ensayo de infección con 5uM de aptámero y heparina. Los porcentajes de infección no muestran una diferencia significativa (prueba t student, $\alpha=0.05$) respecto al control para ningún tratamiento.

Considerando estos resultados donde los porcentajes de infección son muy bajos (menos del 1%), se procedió a realizar ensayos de infección con microtubos recubiertos con BSA 1% y Caseína 1%, además, se realizaron ensayos de infección poniendo directamente los pseudovirus sin pasarlos por el microtubo (figura 19).

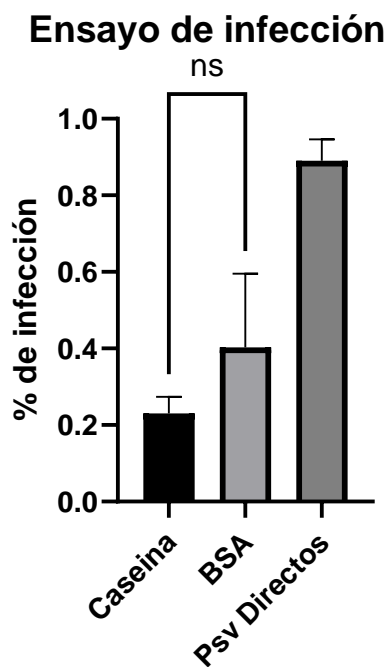


Figura 20. Ensayo de infección con recubrimiento en microtubos. Como se observa en estos resultados los porcentajes de infección no aumentaron con el recubrimiento de los tubos con las proteínas BSA y Caseína al 1%, asimismo, no hay un aumento considerable en los porcentajes de infección al poner los pseudovirus directamente.

VIII. Discusión

En la actualidad se dispone de muchas herramientas de detección de microorganismos y/o virus infecciosos; no obstante, siguen existiendo obstáculos en la detección de VPH. Uno de ellos es que las proteínas de etapa tardía solo pueden detectarse en infecciones avanzadas, por otro lado, las proteínas de etapa temprana se expresan en cantidades bajas en el tejido infectado. Asimismo, los anticuerpos que se requieren para el diagnóstico son altamente costosos y no suelen discriminar en los tipos de VPH, algo esencial para determinar un buen diagnóstico, quedando la secuenciación del genoma viral como la mejor metodología de detección de VPH, sin embargo, para este tipo de metodologías se requiere personal altamente capacitado que pueda utilizar los costosos equipos.⁴⁵ Además, hay que tener en cuenta que la mayoría de las infecciones por VPH son en países subdesarrollados por lo que sigue existiendo una necesidad de encontrar nuevas y mejores estrategias para la detección temprana, el control de transmisión y herramientas que complementen el uso de vacunas como método preventivo.⁴⁶

En el presente trabajo se reporta el uso de un aptámero de DNA previamente aislado y caracterizado (datos en vía de publicación), que mostró en los ensayos de unión una fuerte interacción teniendo una constante de disociación (Kd) en el rango de nM, lo que sugeriría que esta fuerte unión sería capaz de impedir la interacción del virus con las células y así evitar una infección (datos en vía de publicación). Para probar esto se realizaron ensayos de infección incubando el aptámero con los

pseudovirus previo a la infección teniendo como controles otros dos aptámeros, el aptámero D que a comparación del E tenía menos afinidad por las cápsides virales y un aptámero aleatorizado, como control positivo se tuvo a la heparina el cual es una molécula que tiene una estructura similar al Heparán Sulfato lo que lo convierte en un potente inhibidor de la infección de VPH.⁴⁷ Sin embargo, su función como agente antiviral tiene la limitante de ser un agente altamente anticoagulante, además, posee efectos como interacciones con diversas proteínas involucradas en procesos celulares como proliferación, angiogénesis, adhesión, etc., lo que podría desencadenar una respuesta tóxica.⁴⁸

Por otro lado, el proceso de producción de PsVPH18 quedó completamente estandarizado lo cual permitió obtener una buena cantidad de partículas virales con capacidad infectiva. Sin embargo, esta capacidad infectiva se perdió en el proceso de los ensayos infectivos. Se estimaban porcentajes de infección entre el 3% y 5% (datos no publicados), no obstante, se tuvieron resultados cuyas infecciones no superaban el 1%. Se discute que esta reducción en la infección podría estar ocasionada por el cambio en los materiales en el proceso de infección, puesto que anteriormente se usaban puntas y microtubos siliconizados con Sigmacote® y en estos ensayos de infección se optó por utilizar puntas y microtubos de baja adherencia debido a que dejó de exportarse a México este reactivo que tiene la función de hacer antiadherentes las superficies a cualquier proteína. Este cambio técnico fue de vital importancia ya que podría ser el causante de la disminución en los porcentajes de infección, aunado a esto los bajos porcentajes de infección no permiten tener una clara conclusión sobre el poder inhibitorio del aptámero, una

prueba de esto es el resultado de la figura 18 donde el uso de heparina no tuvo una disminución en el porcentaje de infección estadísticamente significativa (prueba *t student*, $\alpha=0.05$). Asimismo, en los resultados de la figura 17 se aprecia que los porcentajes de infección con el uso de los aptámeros son mayores que en el control siendo que su función es inhibir, lo que podría estar sucediendo es que al ser altas concentraciones de aptámero este se adhiera a la superficie de los microtubos haciendo una especie de recubrimiento. Lo que nos llevó a preguntarnos si haciendo este recubrimiento con alguna proteína (BSA y Caseína) se podría lograr un efecto similar, no obstante, los resultados no mostraron aumento en el porcentaje de infección (Figura 19). El resultado más inconsistente es que a pesar de realizar los ensayos de infección directamente (sin pasarlos por el microtubo) a los pozos el porcentaje de infección sigue sin ser mayor al 1%, lo que pudiera sugerir que los PsVPH18 están adhiriéndose a las paredes de las puntas de las micropipetas.

En conclusión, se produjeron PsVPH18 correctamente infectivos; sin embargo, la hipótesis planteada del presente trabajo no pudo ser comprobada o negada eficientemente debido a las limitaciones técnicas presentadas, por lo que se sugiere buscar un reactivo que tenga las propiedades de Sigmacote[®] para realizar los ensayos de infección como se realizaron previamente en el laboratorio y tener resultados más robustos.

IX. Conclusiones

- La detección de L1 mediante Inmunodetección y las pruebas de infectividad comprobaron que los PsVPH18 fueron correctamente producidos.
- La anti-adherencia en el material de laboratorio es indispensable para los ensayos de infección con PsVPH18.
- En los resultados preliminares, el aptámero E no tuvo diferencia significativa que mostrara su capacidad como agente inhibitorio de la pseudoinfección.

X. Perspectivas

- Realizar ensayos de infección con material siliconizado con algún otro reactivo con función similar a Sigmacote[®] y comparar los resultados con material de baja adherencia.
- Agregar un control en los ensayos de infección que contenga DNAsa a las mezclas de infección.
- Producir PsV de otros tipos de VPH para corroborar la especificidad del aptámero E por los PsVPH18.

REFERENCIAS

1. Doorbar, J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* **32**, 7 (2005).
2. Liu, Y., Pan, Y., Gao, W., Ke, Y. & Lu, Z. Whole-genome analysis of human papillomavirus types 16, 18, and 58 isolated from cervical precancer and cancer samples in Chinese women. *Sci Rep* **7**, 1–9 (2017).
3. Schiffman, M. *et al.* Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers* **2**, (2016).
4. Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* **110**, 525–541 (2006).
5. Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C. & Wacholder, S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The lancet* **370**, 890–907 (2007).
6. Moody, C. A. & Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* **10**, 550–560 (2010).
7. Laniosz, V., Dabydeen, S. A., Havens, M. A. & Meneses, P. I. Human papillomavirus type 16 infection of human keratinocytes requires clathrin and caveolin-1 and is brefeldin a sensitive. *J Virol* **83**, 8221–8232 (2009).

8. Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A. & Sakai, H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front Microbiol* **3**, 152 (2012).
9. Gariglio, P., Gutiérrez, J., Cortés, E. & Vázquez, J. The Role of Retinoid Deficiency and Estrogens as Cofactors in Cervical Cancer. *Arch Med Res* **40**, 449–465 (2009).
10. McPhillips, M. G., Ozato, K. & McBride, A. A. Interaction of bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 stabilizes its association with chromatin. *J Virol* **79**, 8920–8932 (2005).
11. Enemark, E. J. & Joshua-Tor, L. Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature* **442**, 270–275 (2006).
12. Flores, E. R. & Lambert, P. F. Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol* **71**, 7167–7179 (1997).
13. Della Fera, A. N., Warbuton, A., Coursey, T. L., Khurana, S. & Alison, M. Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses* **13**, 321 (2021).
14. Laudadio, J. Human papillomavirus detection: testing methodologies and their clinical utility in cervical cancer screening. *Adv Anat Pathol* **20**, 158–167 (2013).
15. Abreu, A. L. P., Souza, R. P., Gimenes, F. & Consolaro, M. E. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Viol J* **9**, 1–9 (2012).

16. Villa, L. L. Laboratory Methods for Detection of Human Papillomavirus Infection. *Human Papillomavirus* 23–30 (2009) doi:10.1007/978-3-540-70974-9_2.
17. Wen L., et al. Risk factors for the acquisition of genital warts: are condoms protective? *Sex Transm Infect* 312–316 (1999).
18. Sendagorta-Cudós, E., Burgos-Cibrián, J. & Rodríguez-Iglesias, M. Infecciones genitales por el virus del papiloma humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **37**, 324–334 (2019).
19. Arbyn, M. et al. EUROGIN 2011 roadmap on prevention and treatment of HPV-related disease. *Int J Cancer* **131**, 1969–1982 (2012).
20. Lacey, C. J. N., Woodhall, S. C., Wikstrom, A. & Ross, J. 2012 European guideline for the management of anogenital warts. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **27**, e263–e270 (2013).
21. Beutner, K. R. et al. Imiquimod, a Patient-Applied Immune-Response Modifier for Treatment of External Genital Warts. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 789–794 (1998).
22. Scheinfeld, N. An evidence-based review of medical and surgical treatments of genital warts. *Dermatol Online J* **12**, (2006).
23. Caroline AJ Horvath, Boulet, G. A., Renoux, V. M., Delvenne, P. O. & Bogers, J.-P. J. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology* **7**, 1–7 (2010).

24. Pastrana, D. V, Buck, C., S Pang, Y.-Y., Thompson, C. D. & Castle, P. E. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology* **321**, 205–216 (2004).
25. Buck, C. B., Thompson, C. D., Pang, Y.-Y. S., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. Maturation of Papillomavirus Capsids. *J Virol* **79**, 2839–2846 (2005).
26. Christopher B. Buck, Pastrana, D. V., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors. *J Virol* **78**, 751–757 (2004).
27. Biryukov, J. & Meyers, C. Papillomavirus Infectious Pathways: A Comparison of Systems. *Viruses* **7**, 4303–4325 (2015).
28. Micura, R. & Höbartner, C. Fundamental studies of functional nucleic acids: Aptamers, riboswitches, ribozymes and DNAzymes. *Chem Soc Rev* **49**, 7331–7353 (2020).
29. Mayer, G. The chemical biology of aptamers. *Angewandte Chemie - International Edition* **48**, 2672–2689 (2009).
30. Zhou, J. & Rossi, J. J. Cell-Specific aptamer-mediated targeted drug delivery. *Oligonucleotides* **21**, 1–10 (2011).
31. Zhou, J. & Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 181–202 (2017).
32. Thiel, K. W. & Giangrande, P. H. Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers. *Oligonucleotides* **19**, 209–222 (2009).

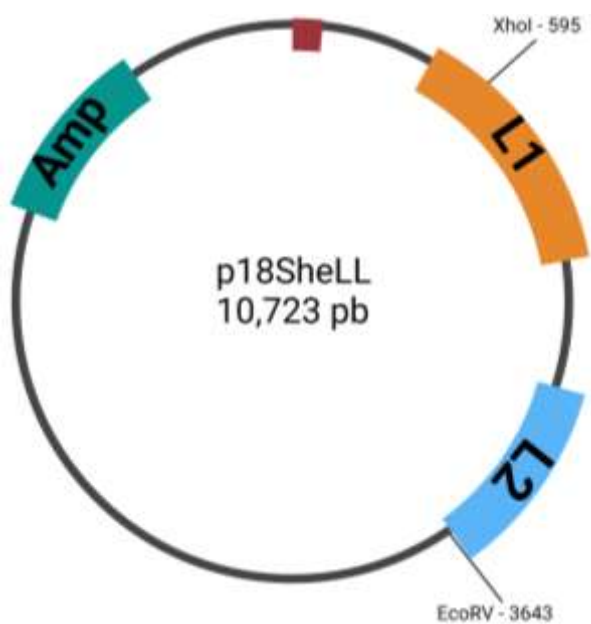
33. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* (1979) **249**, 505–510 (1990).
34. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822 (1990).
35. Adachi, T. & Nakamura, Y. Aptamers : A Review of Their Chemical Properties. *MDPI Molecules* **24**, (2019).
36. Song, K. M., Lee, S. & Ban, C. Aptamers and their biological applications. *Sensors* **12**, 612–631 (2012).
37. Shum, K.-T., Zhou, J. & Rossi, J. J. Aptamer-Based Therapeutics: New Approaches to Combat Human Viral Diseases. *Pharmaceuticals* **6**, 1507–1542 (2013).
38. Nicol, C. *et al.* An RNA Aptamer Provides a Novel Approach for the Induction of Apoptosis by Targeting the HPV16 E7 Oncoprotein. *PLoS One* **8**, 64781 (2013).
39. Tamara A. Belyaeva *et al.* An RNA Aptamer Targets the PDZ-Binding Motif of the HPV16 E6 Oncoprotein. *Cancers (Basel)* **6**, 1553–1569 (2014).
40. Toscano-Garibay, J. D., Benítez-Hess, M. L. & Alvarez-Salas, L. M. Isolation and Characterization of an RNA Aptamer for the HPV-16 E7 Oncoprotein. *Arch Med Res* **42**, 88–96 (2011).

41. Valencia-Reséndiz, D. G. *et al.* Inhibition of Human Papillomavirus Type 16 Infection Using an RNA Aptamer. *Nucleic Acid Ther* **28**, 97–105 (2018).
42. González, V. M., Martín, M. E., Fernández, G. & García-Sacristán, A. Use of Aptamers as Diagnostics Tools and Antiviral Agents for Human Viruses. *Pharmaceuticals* **9**, 78 (2016).
43. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209–249 (2021).
44. Ochoa Carrillo, F. J., Guarneros de Regil, D. B. & Jiménez Velasco, M. T. Infección por virus del papiloma humano en mujeres y su prevención. *Mexicana de Oncología* **14**, 157–163 (2015).
45. Villa, L. L. Laboratory Methods for Detection of Human Papillomavirus Infection. in *Human Papillomavirus* 23–30 (Springer Berlin Heidelberg, 2009). doi:10.1007/978-3-540-70974-9_2.
46. Ochoa Carrillo, F. J., Guarneros de Regil, D. B. & Velasco Jiménez, M. T. Infección por virus del papiloma humano en mujeres y su prevención. *Gaceta Mexicana de Oncología* **14**, 157–163 (2015).
47. Joyce, J. G. *et al.* The L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 11 Recombinant Virus-like Particles Interacts with Heparin and Cell-surface Glycosaminoglycans on Human Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 5810–5822 (1999).

48. Lever, R. & Page, C. P. Novel drug development opportunities for heparin. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 140–148 (2002).

ANEXOS

Anexo 1. Mapa de restricción del plásmido p18SheLL



Anexo 2. Mapa de restricción del plásmido pSVLYFP

