



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Detección ultrasensible de virus del papiloma
humano tipo 16 por autoensamble catalítico de
horquillas de ADN y espectroscopía Raman**

Tesis que presenta
Kevin Alexander Palacios Luna

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis:
Dr. Rubén López Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., 09 de julio de 2024



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Detección ultrasensible de virus del papiloma humano tipo 16 por autoensamble catalítico y espectroscopía Raman**” presentada para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Kevin Alexander Palacios Luna y aprobada el 09 de julio de 2024 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén López Revilla
Director de la tesis

Dra. Fabiola Jaimes Miranda
Asesora

Dr. J. Sergio Casas Flores
Asesor



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo el autor recibió becas académicas del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (No. 1241622) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

El Laboratorio de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN), el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA), el Laboratorio de Bio-nanomateriales de la División de Materiales Avanzados y el Laboratorio de Biología Estructural de la División de Biología Molecular contribuyeron con servicios especializados, apoyo técnico y acceso a sus instalaciones.

Acta del examen

Dedicatorias

A mis queridos padres,

Agradezco profundamente su amor incondicional, su constante respaldo y los sacrificios inquebrantables que han hecho por mí. Son mi sostén, mi orientación y mi fuente de inspiración en este viaje de la vida. Cada paso que he dado ha sido impulsado por su dedicación y aliento. Reconozco que este logro también es mérito suyo.

A mis queridos hermanos,

Su constante presencia a mi lado, compartiendo risas, lágrimas y momentos inolvidables, ha sido un pilar fundamental en mi camino. La complicidad y el apoyo que siempre me brindan han sido el impulso que necesitaba para alcanzar mis metas. Agradezco profundamente su existencia en mi vida y por ser mi familia, mi equipo y mis más cercanos compañeros.

A mis queridos amigos,

Ustedes son mi sostén emocional, mi fuente de alegría y mi refugio en los momentos difíciles. Su amistad ha sido una luz en mi camino y ha enriquecido mi experiencia de vida de innumerables maneras. Aprecio infinitamente su fe en mí, su aliento constante y su celebración de cada éxito que he tenido. Su amistad es un tesoro que valoro profundamente.

Quiero expresar mi gratitud al CONAHCYT y al IPICYT,

Por la invaluable oportunidad que me brindaron a través de las becas que recibí y por la confianza que depositaron en mí. Su respaldo financiero y académico fueron pilares fundamentales en el desarrollo de mi trabajo de investigación. Estoy sinceramente agradecido por la oportunidad de crecimiento y aprendizaje que me han proporcionado.

Agradecimientos

Al Dr. Rubén López Revilla por brindarme la invaluable oportunidad de trabajar con él como mi director de tesis. Agradezco profundamente todo el tiempo, esfuerzo y conocimiento que ha invertido en este trabajo. Sus consejos, apoyo incondicional y amistad han sido fundamentales en cada etapa de este proceso.

A la Biól. Mireya Sánchez Garza, al Dr. José Luis Rodríguez López y al Dr. Samuel Lara González por su apoyo técnico en el laboratorio y su disposición para responder a mis preguntas.

A mis padres, por su amor incondicional, apoyo constante y sacrificios incansables a lo largo de mi vida y durante este proyecto de tesis. Su guía, ánimo y ejemplo han sido fundamentales en mi camino personal y académico. Este logro es también suyo.

A mis hermanos, por su constante presencia, apoyo incondicional y por estar a mi lado en cada momento. Su aliento y respaldo han sido un pilar fundamental durante esta travesía académica. Agradezco su amor y compañía incondicionales.

A mis compañeros hechos en el IPICYT, en especial a Víctor, Mariana, Clara, Guillermo, Eduardo, Nataly, Iván, Alexandra y Andrea por su colaboración, camaradería y apoyo a lo largo de este camino. Agradezco sinceramente su compañerismo y la inspiración que encontré durante mi trabajo aquí.

Agradezco al CONAHCYT y al IPICYT por las becas de maestría que me otorgaron. Su apoyo financiero fue fundamental para la realización de este trabajo.

Índice

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta del examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	viii
Abreviaturas	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Introducción	12
Cáncer	12
Cánceres por virus del papiloma humano	12
Cáncer cervicouterino, anal y orofaríngeo	12
Genotipos de VPH de alto y bajo riesgo	13
Tamizaje del CC	15
Justificación	16
Resultados principales	16
Material y métodos	18
Diseño de las horquillas para detectar los genes <i>E6</i> de VPH 16 y 18 mediante autoensamble catalítico	18
Horquillas diseñadas	18
<i>Etiqueta (hE)</i>	18
<i>Sensor (hS)</i>	18
Parejas de horquillas	18
<i>Para VPH 16</i>	18
<i>Para VPH 18</i>	18
Función de las horquillas	19
Secuencias de las horquillas para miR-21	21
Secuencias de las horquillas complementarias a las secuencias blanco de VPH 16 y 18	22
Detección del amplicón <i>E6</i> -VPH 16 por PCR directa y anidada	25
Síntesis de AuNP	25
Determinación de la concentración de AuNP por ICP	26
Análisis de la concentración de AuNP por espectrofotometría	26
Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido	27
Formación de complejos y predicción de estructuras en horquilla	27
Electroforesis en geles de poliacrilamida	27
Conjugación de hE con AuNP y de hS con MBN	27
Ensayo ECH-SERS para VPH 16	28
Resultados	29
Diseño de las horquillas para detectar los genes <i>E6</i> de VPH 16 y 18	29

Detección del amplicón <i>E6</i> -VPH 16 por PCR directa y anidada	32
Características de las AuNP	34
Formación de complejos y estructuras en horquilla	36
Conjugación de AuNP con hE y de MBN con hS	38
Ensayo ECH-SERS para VPH 16	40
Discusión	41
Referencias	42

Lista de tablas

Tabla 1. Secuencias de los iniciadores forward (F) y reverse (R) de Sotlar et al. (2004) para los genes <i>E6</i> de VPH 16 y 18 y para las parejas de horquillas etiqueta (hE) y sensor (hS) correspondientes	30
--	----

Lista de figuras

Fig. 1. Principio del ECH de ADN	20
Fig. 2. Análisis predictivo de formación de las horquillas para ECH-SERS del gen <i>E6</i> de VPH 16	31
Fig. 7. Espectro UV-VIS de las AuNP	35
Fig. 8. AuNP observadas por SEM	35
Fig. 9. Distribución del diámetro hidrodinámico de las AuNP intactas	36
Fig. 10. Electroferograma de mezclas de oligonucleótidos para hE16F/hS16F y hE16R/hS16R intactos	37
Fig. 11. Electroferograma de mezclas de oligonucleótidos para hE16F/hS16F y hE16R/hS16R calentados a 42 °C	37
Fig. 12. Electroferograma de mezclas de oligonucleótidos para hE16F/hS16F y hE16R/hS16R calentadas a 95 °C	38
Fig. 13. Análisis DLS de hE16F-AuNP	39
Fig. 14. Análisis DLS de hE16R-AuNP	39
Fig. 15. Espectros Raman de las mezclas del ensayo ECH-SERS para VPH 16 con la pareja hE16F/hS16F	40

Abreviaturas

CC	Cáncer del cérvix
<i>DLS</i>	<i>Dynamic light scattering</i> (Dispersión dinámica de luz)
ECH	Ensamble catalítico de horquillas
ECH-SERS	Ensayo de detección basado en ECH-SERS
hE	Horquilla etiqueta
hE16F	Horquilla etiqueta forward para VPH 16
hE16R	Horquilla etiqueta reverse para VPH 16
hE18F	Horquilla etiqueta forward para VPH 18
hE18R	Horquilla etiqueta reverse para VPH 18
hE-AuNP	hE unida covalentemente con AuNP
hS	Horquilla sensor
hS16F	Horquilla sensor forward para VPH 16
hS16R	Horquilla sensor reverse para VPH 16
hS18F	Horquilla sensor forward para VPH 18
hS18R	Horquilla sensor reverse para VPH 18
hS-MBN	hS conjugada con MBN
MBN	4-mercatobenzonitrilo
NIC	Neoplasia intraepitelial del cérvix'
pb	Pares de bases
SERS	<i>Surface-enhanced Raman spectroscopy</i> (espectroscopía Raman aumentada por superficie)
UV-VIS	Espectro ultravioleta-visible
VPH	Virus del papiloma humano

Resumen

Detección ultrasensible de virus del papiloma humano tipo 16 por autoensamble catalítico de horquillas de ADN y espectroscopía Raman

El cáncer cervicouterino (CC), la segunda causa de muerte por cáncer de las mujeres es provocado por la infección persistente de uno o más de los 40 tipos anogenitales de virus del papiloma humano (VPH) donde predominan los tipos 16 y 18, asociados al 70% de los casos de CC. Los programas de tamizaje del CC se basan en dos pruebas primarias: Papanicolaou y detección del ADN de VPH; la segunda, usualmente basada en PCR, es más sensible y específica para detectar lesiones neoplásicas tempranas. El ensamble catalítico de horquillas (ECH) seguido por espectroscopía Raman aumentada por superficie (SERS, *Surface enhanced Raman spectroscopy*), podría reemplazar las pruebas de PCR para el tamizaje de CC, especialmente en poblaciones de escasos recursos. El objetivo de este proyecto fue iniciar el desarrollo de un ensayo ECH-SERS para los oncogenes *E6* de VPH 16 y 18. Diseñamos ocho oligonucleótidos lineales de 50-55 bases, con secuencias “forward” y “reverse” complementarias a las de los oncogenes *E6* de VPH 16 y 18, los cuales formarían cuatro parejas de horquillas etiqueta (hE) y sensor (hS): dos “forward” (hE16F/hS16F, hE18F/hS18F) y dos “reverse” (hE16R/hS16R, hE18R/hS18R). Todos los oligonucleótidos tienen un grupo tiol en el extremo 5' para conjugar las hE a nanopartículas de oro (AuNP) y las hS a 4-mercaptobenzonitrilo (MBN) cuya señal Raman puede ser amplificada hasta 10 órdenes de magnitud en la cercanía con AuNP. Sintetizamos AuNP esféricas monodispersas con diámetro promedio de 20 nanómetros (nm), determinado por microscopía electrónica de barrido, y absorción de luz con un pico a 520 nm. La electroforesis en geles de poliacrilamida mostró que la incubación de los ocho oligonucleótidos a 37 °C aumentó la intensidad de las bandas, esperada por la formación de horquillas. Los diámetros hidrodinámicos promedio determinados por dispersión dinámica de luz en AuNP intactas y conjugadas con oligonucleótidos para hE16F y hS16F fueron respectivamente 23.28 nm, 34.11 nm y 36.72 nm. El ensayo ECH-SERS preliminar con la pareja de horquillas hE16F/hS16F conjugadas fue exitoso, pues detectó señales SERS solamente en muestras con ADN de VPH 16.

Palabras clave: Cáncer de cérvix, Virus del papiloma humano, Ensamble catalítico de horquillas, Espectroscopía Raman amplificada por superficie.

Abstract

Ultrasensitive detection of human papillomavirus type 16 by catalytic self-assembly of DNA hairpins and Raman spectroscopy

Cervical cancer (CC), the second cause of cancer death in women, is caused by persistent infection with one or more of the 40 anogenital types of human papillomavirus (HPV), where types 16 and 18 predominate, associated with 70% of CC cases. CC screening programs are based on two primary tests: Pap smear and HPV DNA detection; the second, usually based on PCR, is more sensitive and specific for detecting early neoplastic lesions. Catalytic hairpin assembly (ECHA) followed by surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) could replace PCR tests for CC screening, especially in low-income populations. The objective of this project was to initiate the development of an ECHA-SERS assay for the E6 oncogenes of HPV 16 and 18. We designed eight linear oligonucleotides of 50-55 bases, with “forward” and “reverse” sequences complementary to those of the oncogenes. E6 of HPV 16 and 18, which would form four pairs of tag (hE) and sensor (hS) forks: two “forward” (hE16F/hS16F, hE18F/hS18F) and two “reverse” (hE16R/hS16R, hE18R/hS18R). All oligonucleotides have a thiol group at the 5' end to conjugate the hE to gold nanoparticles (AuNP) and the hS to 4-mercaptobenzonitrile (MBN) whose Raman signal can be amplified up to 10 orders of magnitude in the vicinity of the AuNP. We synthesized monodisperse spherical AuNPs with average diameter of 20 nanometers (nm), determined by scanning electron microscopy, and light absorption with a peak at 520 nm. Electrophoresis in polyacrylamide gels showed that incubation of the eight oligonucleotides at 37 °C increased the intensity of the bands, expected by the formation of hairpins. The average hydrodynamic diameters determined by dynamic light scattering on intact and oligonucleotide-conjugated AuNPs for hE16F and hS16F were respectively 23.28 nm, 34.11 nm, and 36.72 nm. The preliminary ECHA-SERS assay with the conjugated hE16F/hS16F hairpin pair was successful, detecting SERS signals only in samples with HPV 16 DNA.

Keywords: Cervical cancer, Human papillomavirus, Hairpin catalytic assembly, Surface enhanced Raman spectroscopy.

Introducción

1

2 **Cáncer**

3 El término “cáncer” se refiere a un grupo diverso de enfermedades en las que las
4 células de algún órgano o tejido se multiplican sin control y pueden formar tumores
5 e invadir tejidos circundantes. Se pueden propagar por los vasos sanguíneos a
6 regiones distantes del tumor primario y llegar a causar la muerte (Cavalli 2012).

7 El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad global.
8 Su prevalencia varía según la región geográfica y el tipo de cáncer. Se estima que
9 en 2020 hubo 19.3 millones de casos nuevos y 10 millones de muertes por cáncer
10 en el mundo (Sung et al. 2021). La investigación del cáncer está enfocada en
11 mejorar la calidad de vida de los pacientes y reducir la carga de la enfermedad en
12 la población (Kannappan et al. 2021).

13 Las principales causas de muerte por cánceres en de las mujeres son el
14 cáncer de mama y el cáncer cervicouterino (CC) en 110 y 36 países,
15 respectivamente, lo cual subraya la importancia de su detección temprana para
16 poder prevenirlos y tratarlos oportunamente (Sung et al. 2021).

17 **Cánceres por virus del papiloma humano**

18 Entre los casos de cáncer diagnosticados globalmente en 2018, el 13% se
19 atribuyeron a agentes infecciosos ‘oncogénicos’, entre los que predominan la
20 bacteria *Helicobacter pylori*, los virus del papiloma humano (VPH), los virus de la
21 hepatitis B y C y el virus de Epstein Barr (de Martel et al. 2020).

22 El cáncer cervicouterino, causado principalmente por VPH 16 y 18,
23 representa un problema de salud global (de Martel et al. 2020).

24 **Cáncer cervicouterino, anal y orofaríngeo**

25 A la infección persistente por VPH se atribuyen alrededor del 90% de los casos de
26 CC y de cáncer anal, el 70% de los casos de cáncer vaginal y vulvar y el 60% de
27 los casos de cáncer de pene (Bruni et al. 2010).

28 En México la tasa de mortalidad por CC es de 11 casos por cada 100,000
29 mujeres mayores de 25 años y es la segunda causa de muerte por cáncer de las
30 mujeres, después del cáncer de mama (Arbyn et al. 2020).

31 El CC invasor surge de un crecimiento celular anormal asintomático del
32 epitelio del cuello uterino, que al cabo de años o décadas puede invadir los tejidos
33 vecinos o diseminarse a regiones distantes y causar la muerte. Los tipos
34 histológicos predominantes del CC son el carcinoma de células escamosas y el
35 adenocarcinoma (Hu et al. 2018).

36 **Genotipos de VPH de alto y bajo riesgo**

37 Los VPH son virus con genoma no segmentado constituido por ADN circular de
38 cadena doble con una longitud de ~8 kilobases. Sus viriones son icosaédricos, sin
39 envoltura y con diámetro de ~55 nm e infectan células de la capa basal de los
40 epitelios. Después de ser internalizados, los viriones se desnudan en el citoplasma,
41 el genoma episomal llega al núcleo de las células infectadas y las células hijas
42 inician el proceso de diferenciación que desencadena un patrón característico de
43 expresión de los genes virales que culmina con la producción de nuevos viriones
44 (Hibbitts et al. 2014).

45 Las regiones funcionales del genoma de VPH son la región temprana (E,
46 'early') que codifica siete proteínas no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6, E7, E8)
47 que afectan la regulación de la expresión genética de las células infectadas, la
48 región tardía (L, 'late') que codifica las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside
49 viral y la región larga de control (LCR, 'long control region') donde se inicia la
50 transcripción y la replicación viral (Hibbitts et al. 2014).

51 Hay más de 200 genotipos ('tipos') de VPH que se distinguen entre sí porque
52 difieren en al menos 10% en las secuencias nucleotídicas de un segmento de 450
53 pares de bases (pb) del marco de lectura abierto del gen L1 (Bernard et al. 2010).

54 Los 40 tipos de VPH 'anogenitales' son transmitidos por contacto sexual y
55 constituyen los agentes de transmisión sexual más prevalentes. Se clasifican como
56 de bajo riesgo o de alto riesgo, según su prevalencia en los tumores del cérvix (zur
57 Hausen 2002).

58 Catorce tipos de VPH de alto riesgo (VPH-AR) anogenitales son
59 particularmente relevantes porque causan el 99.7% de los casos de CC invasor y
60 están asociados a los cánceres de vulva, vagina, pene, piel, orofaringe, esófago y
61 ano (Walboomers et al.1999).

62 Los VPH-AR provocan cambios morfológicos y funcionales progresivos a lo
63 largo de varios años en las células infectadas, con lo cual dan lugar a las 'neoplasias
64 intraepiteliales del cérvix' (NIC). Las lesiones NIC1 se consideran mínimas y
65 reversibles. NIC2 y NIC3 se consideran 'precancerosas' porque pueden ser
66 irreversibles y progresar al CC invasor si no son eliminadas a tiempo (Woodman et
67 al. 2007).

68 VPH 16 y 18 son los dos tipos más prevalentes (~70%) en todos los casos
69 de CC invasor. VPH 16 está asociado a ~50% de los casos de CC invasor y a su
70 precursor inmediato, NIC3; este tipo viral también es responsable de la mayoría de
71 los casos de cáncer atribuibles a VPH en otros tejidos anogenitales y en la
72 orofaringe. VPH 18 ocupa el segundo lugar de prevalencia (~20%) entre los casos
73 de CC invasor y es significativamente más prevalente en los adenocarcinomas que
74 en los carcinomas de células escamosas (Schiffman et al. 2011).

75 Los VPH-BR anogenitales están asociados a tumores benignos como
76 condilomas y verrugas genitales, así como a la papilomatosis respiratoria zur
77 Hausen (2002). Usualmente provocan lesiones NIC1 del epitelio escamoso que
78 desaparecen espontáneamente y rara vez progresan a NIC2 o NIC3 (Richart and
79 Barron 1969). Los responsables del 95% de las infecciones del cuello uterino son,
80 en orden descendente de prevalencia, VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 y 81
81 (Muñoz et al. 2003).

82 La mayoría de los países cuentan con programas de tamizaje para la
83 detección oportuna del CC entre las mujeres en riesgo (i.e., sexualmente activas).
84 Los programas debidamente organizados han disminuido sustancialmente la
85 prevalencia y mortalidad del CC en los países respectivos (Fernández-Deaza et
86 al.2022).

87 **Tamizaje del CC**

88 El tamizaje del CC se basa en la detección temprana de las lesiones precancerosas
89 y la presencia de VPH en muestras de células obtenidas mediante raspado del
90 cuello del cérvix con un cepillo especial ('cytobrush'). Dos pruebas son aplicadas
91 periódicamente para el tamizaje de las mujeres en riesgo: 1) la citología exfoliativa
92 ('Papanicolaou') para el análisis microscópico de células extendidas en laminillas y
93 teñidas para determinar si tienen displasia y 2) la 'prueba de VPH', que permite
94 diagnosticar la infección viral mediante ensayos moleculares que detectan
95 secuencias de ADN de diversos tipos de VPH (Qu et al. 1997).

96 El método de Papanicolaou fue el primero que se usó y se sigue usando
97 como prueba primaria para el tamizaje del CC (Papanicolaou and Traut 1941). Al
98 conocerse y aceptarse que prácticamente todos los casos de CC se deben a la
99 infección persistente por VPH-AR, empezaron a emplearse pruebas moleculares
100 para la detección de VPH por lo que algunos programas nacionales de tamizaje
101 utilizan ambas pruebas conjuntamente (Muñoz et al. 2003). Sin embargo, la prueba
102 de VPH se emplea cada vez más como única prueba primaria debido a su mayor
103 sensibilidad para la detección de lesiones precancerosas (Kannappan et al. 2021).

104 Actualmente hay más de 250 ensayos dirigidos a los genes *L1*, *E6*, *E7* y *E1*
105 de VPH y las técnicas de PCR más confiables utilizan diversos oligonucleótidos (Qu
106 et al. 1997). A diferencia del ORF *L1*, que puede no detectarse cuando ha sido
107 deletado de células en las que el genoma viral se integra al genoma celular, los ORF
108 *E6/E7* pueden ser detectados en todos los casos porque ambos son esenciales para
109 mantener la transformación neoplásica (Qu et al. 1997).

110 La citología exfoliativa con el método de Papanicolaou fue la prueba con la
111 que se iniciaron y se mantienen la mayoría de los programas nacionales de tamizaje
112 del CC. Sin embargo, la prueba de PCR la está desplazando cada vez más como
113 prueba primaria de tamizaje porque es más confiable para detectar lesiones
114 precancerosas o cancerosas (Williams et al. 2022). Se han desarrollado y siguen
115 desarrollándose técnicas nuevas para detectar ADN que pretenden llevar el
116 diagnóstico al sitio de atención de los pacientes.

117 A pesar de los avances en las técnicas de detección de VPH, aún persisten
118 desafíos en la detección temprana y precisa de este virus, especialmente en
119 entornos donde los recursos son limitados y el acceso a la atención médica es
120 escaso. Además, la capacidad de detectar múltiples genotipos de VPH de manera
121 simultánea y sensible sigue siendo un objetivo importante en la investigación de la
122 salud pública.

123 La combinación de tecnologías innovadoras, como la espectroscopía Raman
124 aumentada por superficie (SERS) y el ensamble catalítico de horquillas (ECH),
125 constituye un enfoque prometedor para mejorar la detección de VPH. Al integrar
126 estas técnicas se podría lograr una detección sencilla y sensible de genotipos de
127 VPH, lo que sería fundamental para mejorar los programas de tamizaje y la atención
128 médica en comunidades con escasos recursos.

129 El desarrollo de un método de detección basado en SERS y ECH (ECH-
130 SERS) para la detección de VPH, similar a los utilizados para la detección de micro
131 ARN marcadores de ciertos cánceres (Si et al. 2020), podría representar un avance
132 significativo en la lucha contra el CC si permite una detección más temprana, precisa
133 y accesible del virus y facilita la implementación de medidas preventivas y
134 terapéuticas en poblaciones en riesgo.

135 **Justificación**

136 La implementación de un ensayo basado en ECH seguido por SERS para la
137 detección de los oncogenes *E6* de los tipos de VPH 16 y 18 se fundamenta en la
138 búsqueda de métodos de tamizaje más eficaces y accesibles. Esta propuesta
139 responde a la necesidad de mejorar la detección temprana de lesiones neoplásicas,
140 superando las limitaciones de infraestructura y de personal altamente especializado
141 para ampliar el acceso al tamizaje del CC y fortalecer la prevención y control de esta
142 enfermedad.

143 **Resultados principales**

144 Diseñamos ocho oligonucleótidos con secuencias lineales “forward” y “reverse”
145 complementarias a los genes *E6* de VPH 16 y 18, con el propósito de formar las
146 cuatro parejas de horquillas etiqueta (hE) y sensor (hS) “forward” (hE16F/hS16F,

147 hE18F/hS18F) y “reverse” (hE16R/hS16R, hE18R/hS18R) anticipadas. Estos
148 oligonucleótidos fueron sintetizados con un grupo tiol en el extremo 5' para conjugar
149 las hE a AuNP y las hS a 4-mercatobenzonitrilo (MBN) cuya señal Raman sería
150 amplificada unos 10 órdenes de magnitud en la cercanía con hS-AuNP.

151 Sintetizamos AuNP esféricas monodispersas, caracterizadas mediante
152 microscopía electrónica de barrido (SEM, *Scanning electron microscopy*) con un
153 diámetro promedio de 20 nm y un diámetro hidrodinámico promedio de 23.28 nm
154 mediante análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS). Además, se observó un
155 espectro de absorción de luz ultravioleta-visible con un pico distintivo a 520 nm.

156 La incubación a 95 °C de los ocho oligonucleótidos lineales resultó en el
157 aumento de tamaño esperado, indicando la formación de las horquillas hE16F,
158 hS16F, hE18F, hS18F, hE16R, hS16R, hE18R y hS18R, corroborado mediante
159 electroforesis en geles de poliacrilamida.

160 Posteriormente, conjugamos el oligonucleótido correspondiente a hE16F a
161 AuNP y el de hS16F a MBN. Los análisis DLS revelaron diámetros hidrodinámicos
162 promedio de 34.11 nm para hE16F-AuNP y 36.72 nm para hS16F, mientras que el
163 tamaño de las AuNP se mantuvo en 23.28 nm.

164 Finalmente, el ensayo ECH-SERS con la pareja de horquillas (hE16F/hS16F)
165 demostró ser específico y altamente sensible para la detección de VPH 16. Se
166 observó una amplificación sustancial de la señal Raman de MBN covalentemente
167 unido a la horquilla hS16F en mezclas con ADN del oncogén *E6* VPH 16 clonado
168 en un plásmido o presente en muestras de un raspado cervical VPH 16-positivo.
169 Además, no se detectó amplificación de la señal Raman en presencia de ADN de
170 un raspado VPH 52-positivo. Estos resultados destacan la selectividad y
171 sensibilidad del método para la detección específica de VPH 16 y su potencial
172 aplicación para el diagnóstico clínico de infecciones por este virus.

173

174

Material y métodos

175 **Diseño de las horquillas para detectar los genes *E6* de VPH 16 y 18** 176 **mediante autoensamble catalítico**

177 Generamos secuencias capaces de formar horquillas para detectar las secuencias
178 blanco de los genes *E6* de VPH 16 y 18 que reconocen los iniciadores de Sotlar et
179 al. (2004).

180 Secuencias nucleotídicas forward (F) y reverse (R) para el oncogén *E6* de
181 VPH 16 y 18 de Sotlar et al. (2004):

VPH 16F CACAGTTATGCACAGAGCTGC

VPH 16R CATATATTCATGCAATGTAGGTGTA

VPH 18F CACTTCACTGCAAGACATAGA

VPH 18R GTTGTGAAATCGTCGTTTTTCA

182 **Horquillas diseñadas**

183 ***Etiqueta (hE)***

184 Para VPH 16: hE16F, hE16R.

185 Para VPH 18: hE18F, hE18R.

186 ***Sensor (hS)***

187 Para VPH 16: hS16F, hS16R.

188 Para VPH 18: hS18F, hS18R.

189 **Parejas de horquillas**

190 ***Para VPH 16***

191 hE16F/hS16F.

192 hE16R/hS16R.

193 ***Para VPH 18***

194 hE18F/hS18F.

195 hE18R/hS18R.

196 **Función de las horquillas**

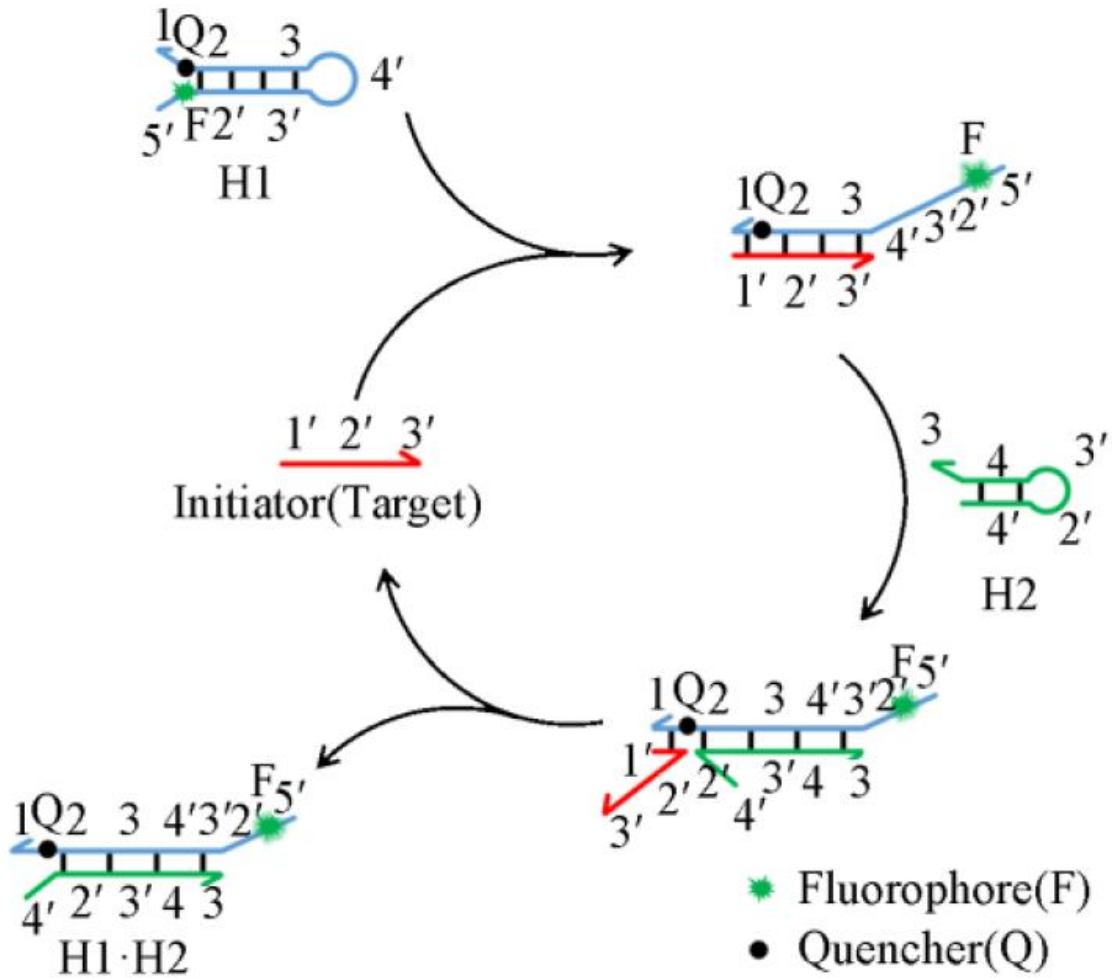
197 La detección mediante ECH-SERS se basa en parejas de horquillas, hE/hS, ambas
198 con un grupo tiol en el extremo 5'.

199 hE se une covalentemente con AuNP (hE-AuNP).

200 hS se conjuga con MBN (hS-MBN).

201 Cada hE contiene una secuencia de ~7 nucleótidos (*toehold*) en el extremo
202 5', complementaria a la secuencia blanco. Al aparearse con la secuencia blanco, el
203 *toehold* deshace y despliega la horquilla (Fig. 1) y expone una secuencia
204 complementaria al *toehold* de la horquilla hS que deshace y despliega la horquilla
205 hS, desplaza la secuencia blanco unida a hE y genera un híbrido hE:hS.

206



207

208 **Fig. 1. Principio del ECH de ADN**

209 Implica el uso de una pareja de horquillas diseñadas para interactuar con la región
 210 iniciadora del objetivo ('target') y desencadenar la reacción en cadena que amplifica
 211 la señal y permite detectar el objetivo con alta sensibilidad y especificidad (Yin et al.
 212 2008).

213

214 **Secuencias de las horquillas para miR-21**

215 Si et al. (2020) diseñaron un sistema de horquillas con secuencias que detectan
216 miRNA21. Las hE tienen una secuencia complementaria a la secuencia blanco y
217 otra complementaria a la hS. Las hE contienen un grupo SH en el extremo 5' para
218 unirlos covalentemente a AuNP y las hS contienen un grupo SH en el extremo 5'
219 para unirlos covalentemente a 4-MBNP.

220 Las horquillas se forman con sus dos secuencias complementarias de ~15
221 nucleótidos (resaltadas en azul):

222

223 **miR-21-hE-SH**

224 5'-hS-TTTTTTTTCAACAT**CAGTCTGATAAGCT**ACATTGGATGCTC**TAGCTTATCAGACTG**-3'

225

226 **mir-21-hS-SH**

227 5'-hS-TTTTTATATTTAAGCTA**GAGCATCCAATG**TAGCTTATCAGACTG**CATTGGATGCTC**-3'

228

229 Cada horquilla posee una secuencia complementaria a la de la otra horquilla,
230 resaltada en amarillo, que permanece oculta dentro de la estructura en horquilla
231 enmarcada con el corchete azul:

232

233 **miR-21-hE-SH**

234 5'-hS-TTTTTTTT**CAACAT****CAGTCTGATAAGCT**ACATTGGATGCTC**TAGCTTA**TCAGACTG-3'

235

236 **mir-21-hS-SH**

237 5'-hS-TTTTTATATT**TAAGCTAGAGCATCCAATG**TAGCTTATCAGACTG**CATTGGATGCTC**-3'

238

239 La región complementaria entre horquillas tiene siete nucleótidos
240 enmarcados con un corchete rojo, que sobresalen de la estructura en horquilla y
241 actúan como puntos de anclaje (*toehold*) para el reconocimiento de la secuencia
242 objetivo por hE y para la unión de hS con hE una vez que ésta se ha desplegado.

243 La secuencia de hE posee una región complementaria a la secuencia blanco,
244 resaltada en color verde:

245

246 **miR-21-hE-SH**
247 **5'-hS-**
248 **TTTTTTTCAACATCAGTCTGATAAGCTACATTGGATGCTCTAGCTTATCAGA**
249 **CTG-3'**
250 **miR-21 5'UAGCUUAUCAGAAUGAUGUUGA-3'**

251

252 Estas dos regiones se traslapan casi por completo, excepto por los siete
253 nucleótidos *toehold* enmarcados con el corchete rojo que son el punto de anclaje
254 donde la secuencia blanco se une y empieza a desplazar las bases que forman la
255 estructura en horquilla formando una estructura híbrida horquilla-secuencia blanco:

256

257 **miR-21-hE-SH**
258 **5'-hS-TTTTTTTTCAACATCAGTCTGATAAGCTACATTGGATGCTCTAGCTTATCAGACTG-3'**
259 **miR-21 5'UAGCUUAUCAGAAUGAUGUUGA-3'**

260

261 Al generar el híbrido horquilla-secuencia blanco, la horquilla cambia a una
262 estructura lineal y libera la parte de hE complementaria a hS y es posible que se
263 ancle al *toehold* de hS para que empiece a desplazar las bases que forman la
264 estructura horquilla-secuencia blanco, libera la secuencia blanco previamente unida
265 a hE y genera una nueva estructura híbrida hE:hS.

266 **Secuencias de las horquillas complementarias a las secuencias** 267 **blanco de VPH 16 y 18**

268 Diseñamos secuencias de horquillas capaces de generar los amplicones *E6* de VPH
269 16 y 18 a partir de los iniciadores tipo-específicos de Sotlar et al. (2004).

270

271 **VPH 16**

Forward 5'-CACAGTTATGCACAGAGCTGC-3'

Reverse 5'-CATATATTCATGCAATGTAGGTGTA-3'

272

273

274 **VPH 18**

Forward 5'-CACTTCACTGCAAGACATAGA-3'

Reverse 5'-GTTGTGAAATCGTCGTTTTTCA-3'

275

276 En lugar de la secuencia complementaria de la hE para miR-21 incluimos la
277 secuencia de los iniciadores VPH 16 F, VPH 18 F, VPH 16 R y VPH 18 R,
278 respectivamente.

279

280 **miR-21-hE-SH**

281 5'-hS-TTTTTTTT**TCAACATCAGTCTGATAAGCTA**CATTGGATGCTCTAGCTTATCAGACTG-3'

282 miR-21 5'**UAGCUUAUCAGAAUGAUGUUGA**-3'

283

284 Denominamos la nueva secuencia hE16F para la secuencia blanco del
285 iniciador VPH 16 "Forward" y hE16R para la secuencia de VPH 16 "Reverse". De
286 igual forma lo hicimos para VPH 18: hE18F y hE18R.

287

288 **hE16F**

289 5'-hS-TTTTTTTT**CACAGTTATGCACAGAGCTGC**ACATTGGATGCTCTCACTGTTATGCACA-3'

290 16F Sotlar 5'**CACAGTTATGCACAGAGCTGC**-3'

291

292 **hE16R**

293 5'hS-TTATA**CATATATTCATGCAATGTA**GGTGTAAATGTGTAGATATATTCATGCAATG-3'

294 16R Sotlar 5'-**CATATATTCATGCAATGTAGGTGTA**-3'

295

296 **hE18F**

297 5'-hS-TTTTTTTT**CACTTCACTGCAAGACATAGA**ACATTGGATGCTCTCACTTCACTGCAAG-3'

298 18F Sotlar 5'-**CACTTCACTGCAAGACATAGA**-3'

299

300 **hE18R**

301 5'-hS-TTATA**GTTGTGAAATCGTCGTTTTTCA**TCCATGTGTAGAAGTTGTGAAATCGTC-3'

302 18R Sotlar 5'-**GTTGTGAAATCGTCGTTTTTCA**-3'

303

304 Al cambiar la secuencia por la de los iniciadores de Sotlar et al. (2004) se
305 deben modificar también las secuencias para que sean complementarias dentro de
306 la misma horquilla.

307

308 **hE16F**

309 5'-hS-TTTTTT **CACAGTTATGCACAGAGCTGC**ACATTGGATGCT**CGCAGCTCTGTGCAT**-3'

310 16F Sotlar 5' CACAGTTATGCACAGAGCTGC -3'

311

312 **hE16R**

313 5'-hS-TTATA **CATATATTCATGCAATGTAGGTGTA**ATGTGTAGAT**TACACCTACATTGCATG**-3'

314 16R Sotlar 5'-**CATATATTCATGCAATGTAGGTGTA**-3'

315

316 La secuencia próxima al extremo 3' debe modificarse para que sea
317 complementaria a los 7 nucleótidos que siguen a la secuencia blanco para poder
318 generar la estructura en horquilla y además dejar libre el "toehold" para que la
319 secuencia blanco pueda anclarse, deshacer la estructura en horquilla y formar un
320 híbrido hE-secuencia blanco.

321 Al hacer el cambio en la secuencia de reconocimiento, también cambia la
322 secuencia complementaria de hS, pues parte de su secuencia debe ser
323 complementaria a la hE original, por lo que hay que cambiar también esta
324 secuencia.

325

326 **hE16F**

327 5'-hS-TTTTTTTCACAGTTAT**TGCACAGAGCTGCACATTGGATGCTCGCAGCTC**TGTGCAT-3'

328 **hS16F**

329 5'-hS-TTTTTATATT**GAGCTGCGAGCATCCAATGTGCAGCTCTGTGCA**CATTGGATGCTC-3'

330

331 Estos cambios se hicieron y verificaron para las secuencias de las horquillas
332 hE16F-SH, hS16F-SH, hE16R-SH, hS16R-SH, hE18F-SH, hS18F-SH, hE18R-SH,
333 hS18R-SH.

334

335 **Detección del amplicón *E6*-VPH 16 por PCR directa y anidada**

336 Hicimos PCR de punto final en mezclas con los plásmidos pHV102 y pHV103 que
337 portan un inserto del gen *E6* de VPH 16, así como con ADN de raspados cervicales
338 VPH 16 positivos y negativos y de células SiHa (transformadas por VPH 16) en
339 presencia de los iniciadores generales de Sotlar et al. (2004). Éstos generan
340 productos de 603-660 pb de 19 tipos de VPH, dentro de los cuales el de 630 pb
341 corresponde a VPH 16 y de éste se genera un producto de PCR anidada de 457 pb
342 con los iniciadores tipo-específicos.

343 Determinamos el tamaño de los amplicones mediante electroforesis en geles
344 de agarosa al 2% calibrados con una escalera de 100 pb y teñidos con bromuro de
345 etidio. Registramos la fluorescencia de las bandas teñidas con bromuro de etidio
346 excitada por luz ultravioleta en un fotodocumentador Gel Doc EQ y el software
347 Quantity One versión 4.5 (Bio Rad) y estimamos su tamaño por comparación con
348 una escalera de marcadores de ADN de 100 pb (Goldbio).

349 **Síntesis de AuNP**

350 Sintetizamos AuNP con el método de Turkevich (1951). A un vaso de precipitados
351 de 30 mL con una barra magnética añadimos 19.8 mL de citrato de sodio 0.75 mM
352 pH 7.4 que mantuvimos a 70 °C con agitación en una parrilla magnética;
353 posteriormente añadimos 0.2 mL de HAuCl₄ 25 mM a la mezcla y mantuvimos las
354 mismas condiciones durante 10 minutos hasta que la mezcla pasó de un tono gris
355 claro a rojo vino tinto. Tras finalizar la reacción registramos el espectro ultravioleta-
356 visible (UV-VIS) con un espectrofotómetro Agilent, modelo Cary 60. También
357 llevamos a cabo análisis de las muestras mediante SEM con un Dual Beam FEI-
358 Helios Nanolab 600 con una amplificación de 300,000x, operando a 5 KV, 88 pA y
359 una distancia de trabajo de 4 mm.

360

361 **Determinación de la concentración de AuNP por ICP**

362 Para determinar la concentración de las AuNP mediante ICP (Allabashi et al. 2009),
363 sintetizamos las AuNP con el método descrito, centrifugamos la mezcla durante 20
364 minutos a 8,500 g en una microcentrífuga Force 1624 (Labnet International) y
365 retiramos el sobrenadante con cuidado mediante aspiración. Para suspender las
366 AuNP añadimos 4 mL de HCl N al precipitado y al sobrenadante y sometimos la
367 mezcla a análisis mediante ICP-OES.

368

369 Cálculo de la concentración (N)

370 Primero calculamos N_{at}

371
$$N_{at} = \frac{N_A \pi \rho D^3}{6M}$$

372 En donde,

373 N_{at} = promedio de átomos por nanopartícula

374 N_A (número de Avogadro) = 6.022×10^{23} átomos/mol

375 ρ (densidad de las AuNP) = 1.93×10^{-20} g/nm³

376 D (diámetro de las nanopartículas) = 18 nm

377 M (peso atómico del oro) = 197 g/mol

378 A_t (número de átomos totales en la muestra) = 1.3889×10^{20} átomos/L

379 Luego calculamos N

380
$$N = A_t N_{at}$$

381 Número de átomos calculado con el resultado del análisis de ICP-OES = 50.32 mg/L.

382 **Análisis de la concentración de AuNP por espectrofotometría**

383 Para el análisis de la concentración de AuNP mediante espectroscopía UV-VIS
384 empleamos la siguiente fórmula (Haiss et al. 2007):

385
$$N = \frac{A_{520} \times 10^{14}}{D^2 \left[-0.295 + 1.36 \exp \left(- \left(\frac{D - 96.8}{78.2} \right) \right) \right]}$$

386 En donde,

387 N = Número de nanopartículas por mL

388 A_{520} = 1.01

389 D = 20 nm

390 **Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido**

391 A un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL añadimos 500 μ L de etanol y 1 mL de la
392 mezcla de síntesis de AuNP. Introdujimos el tubo a un baño ultrasónico Branson
393 modelo 2800 por 5 min; luego lo agitamos en vórtex durante 20 s y lo centrifugamos
394 a 13,000 rpm (15,304 \times g) por 10 min. Eliminamos el sobrenadante por aspiración,
395 añadimos 1 mL de etanol y lavamos el sedimento seis veces sucesivas por
396 centrifugación. Depositamos 75 μ L de la suspensión resultante del último lavado en
397 un pin de aluminio que dejamos secar toda la noche. Visualizamos las muestras en
398 un microscopio electrónico de barrido (Dual Beam FEI-Helios Nanolab 600) con
399 150,000 aumentos.

400 **Formación de complejos y predicción de estructuras en horquilla**

401 Incubamos mezclas de 100 μ L de los oligonucleótidos hE16F, hS16R, hE16F y
402 hS16R 25 mM a 42 °C para formar los complejo hE:hS; por otra parte, a 95 °C por
403 5 min seguidos de 37 °C por 2 h para formar las estructuras de horquilla. Utilizamos
404 la sección "HAIRPIN" de la herramienta OligoAnalyzer™ de Integrated DNA
405 Technologies, configurada a 37 °C con oligonucleótidos 25 mM y Mg²⁺ 10 mM, para
406 obtener las predicciones de estructura de las secuencias hE16F, hS16F, hE16R y
407 hS16R.

408 **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

409 En una cámara de electroforesis Protean II (BioRad) corrimos, en geles de
410 poliacrilamida al 12%, muestras de mezclas de oligonucleótidos hE16F, hS16R,
411 hE16F, hS16R, hE16F/hS16R, hE16F/hS16R, hE16F/ hS16R y hE16F/hS16R 25
412 mM intactas o preincubadas 2 h a 42 °C o a 37 °C, que finalmente teñimos con
413 bromuro de etidio 0.5 mg/mL por 15 min.

414 **Conjugación de hE con AuNP y de hS con MBN**

415 Incubamos 600 μ L de AuNP con hE16F 25 mM o hE16R 25 mM por 8 h para
416 conjugarlas a través del grupo tiol del extremo 5'.

417 Incubamos 300 μL de MBN 500 μM con 300 μL de horquillas hS16F 25 o
418 hS16R 25 mM para conjugarlas con un puente disulfuro en el extremo 5'.

419 **Ensayo ECH-SERS para VPH 16**

420 Preparamos mezclas de 200 μL con hE16F-AuNP, 50 ng de ADN de un raspado
421 cervical VPH negativo y 1) hE16F-AuNP, o 2) hE16F-AuNP con 1 ng de pHV102
422 (2.5×10^7 copias), o 3) hE16F-AuNP con 50 ng de ADN de un raspado cervical VPH
423 16 positivo, o 4) hE16F-AuNP con 100 μL de TE, o 5) hE16F-AuNP con 50 ng de
424 ADN de un raspado cervical VPH 52 positivo. Las dejamos reposar 15 min y las
425 centrifugamos a $8500 \times g$ por 20 min para eliminar los sobrenadantes. A cada pastilla
426 añadimos 100 μL de hS16F 25 μM y esperamos 15 min; centrifugamos las mezclas
427 a $8500 \times g$, descartamos los sobrenadantes y resuspendimos las pastillas con 100
428 μL de TE tres veces sucesivas; aspiramos y descartamos el sobrenadante de las
429 dos primeras centrifugaciones y en la tercera aspiramos 90 μL y dejamos 10 μL .
430 Finalmente aplicamos 5 μL de cada mezcla a un portaobjetos para el análisis de
431 espectrometría Raman en el equipo Renishaw con el láser de 633 nm con potencia
432 del 5% en el rango de 100 a 2000 cm^{-1} .

433

434

Resultados

435 **Diseño de las horquillas para detectar los genes *E6* de VPH 16 y 18**

436 La Tabla 1 muestra las ocho secuencias de los oligonucleótidos diseñados para
437 generar las horquillas para la detección de los genes *E6* de VPH 16 y 18 mediante
438 ECH.

439 La Fig. 2 muestra las estructuras de horquilla predichas para los
440 oligonucleótidos hE16F, hS16F, hE16R y hS16R incubados a 95 °C y luego a 37
441 °C. Dichas horquillas, basadas en las secuencias de Si et al. (2020) podrían detectar
442 las secuencias blanco de los genes *E6* de VPH 16 y 18 reconocidas por los
443 iniciadores descritos por Sotlar et al. (2004).

444 **Tabla 1. Secuencias de los iniciadores forward (F) y reverse (R) de Sotlar et al. (2004) para los genes E6 de VPH**
 445 **16 y 18 y para las parejas de horquillas etiqueta (hE) y sensor (hS) correspondientes**

VPH	Molécula	Nombre	Secuencia
16	Iniciador 16F	16F Sotlar	5' CACAGTTATGCACAGAGCTGC 3'
	Horquilla 16EF	hE16F	5'SH-TTTTTTT CACAGTTATGCACAGAGCTGC ACATTGGATGCTCGCAGCTCTGTGCAT-3'
	Horquilla 16SF	hS16F	5'SH-TTTTTATATT GAGCTGC GAGCATCCAATGTGCAGCTCTGTGCAA CATTGGATGCTC 3'
	Iniciador 16R	16R Sotlar	5' CATATATTCATGCAATGTAGGTGTA 3'
	Horquilla 16ER	hE16R	5'SH-TTATA CATATATTCATGCAATGTAGGTGTA ATGTGTAGACACCTACATTGCATG 3'
	Horquilla 16SR	hS16R	5'SH-TTTTTTTTT TAGGTGT CTACACATTACACCTACATTGCATGAGGTGTAATGTGTAG 3'
18	Iniciador 18R	18F Sotlar	5' CACTTCACTGCAAGACATAGA 3'
	Horquilla 18FE	hE18F	5'SH-TTTTTTT CACTTCACTGCAAGACATAGA ACATTGGATGCTCGTTCTATGTCTTGCA 3'
	Horquilla 18FS	hS18F	5'SH-TTTTTATA ACATAGA ACGAGCATCCAATGTTCTATGTCTTAACATTGGATGCTCG 3'
	Iniciador 18R	18R Sotlar	5' GTTGTGAAATCGTCGTTTTTCA 3'
	Horquilla 18RE	hE18R	5'SH-TTATA GTTGTGAAATCGTCGTTTTTCA TCCATGTGTAGGGATGAAAACGACGAT 3'
	Horquilla 18RS	hS18R	5'SH-TTTTTTTTT TCAACT CTACACATTGGATGAAAACGACGATCCATGTGTAGA 3'

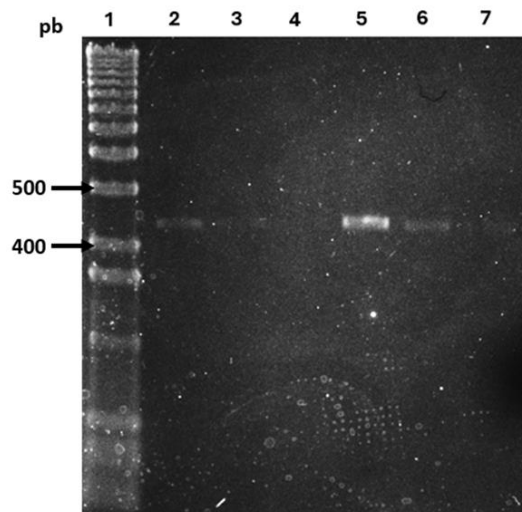
446 Los desoxinucleótidos con la secuencia del iniciador en las horquillas hE se muestran en letras negras resaltadas en verde. En la
 447 secuencia lineal de cada oligonucleótido se delimitan con corchetes azules las dos secuencias complementarias esenciales para
 448 formar la horquilla. La secuencia crucial para el ensamble catalítico de cada horquilla hE, delimitada con un corchete amarillo, es
 449 complementaria a la secuencia delimitada por el corchete amarillo de la horquilla hS correspondiente.

450

459 **Detección del amplicón E6-VPH 16 por PCR directa y anidada**

460 En las mezclas de PCR con los plásmidos pHV102 y pHV103 y la pareja de
461 iniciadores de Sotlar et al. (2004) para el producto de PCR anidada de VPH 16
462 observamos las bandas esperadas de 457 pb (Fig. 3). En las mezclas de PCR con
463 las muestras MSA y CNEC y la misma pareja de iniciadores observamos la banda
464 esperada de 457 pb solo para CNEC (Figs. 4 y 6). En las mezclas de PCR con las
465 muestras MSA y CNEC y la misma pareja de iniciadores de Sotlar et al. (2004) para
466 el producto de PCR anidada de VPH 52 de observamos la banda esperada de 229
467 pb solo para CNEC (Fig. 5).

468

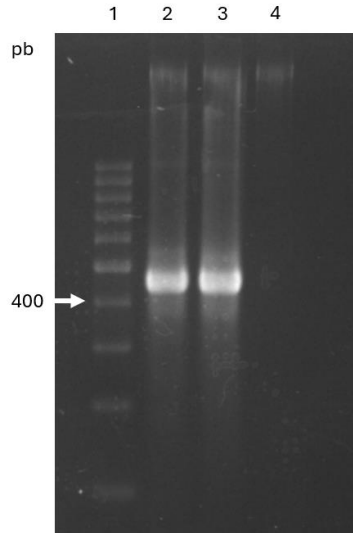


469

470 **Fig. 3. Productos generados a partir de mezclas de pHV102 y pHV103 y la**
471 **pareja de iniciadores de Sotlar et al. (2004) para la PCR anidada de VPH 16**

472 Carril 1, escalera de 100 pb. Carril 2, 100 ng de pHV102 (2.5×10^9 copias); carril 3,
473 10 ng (2.5×10^8 copias); carril 4, 1 ng (2.5×10^7 copias); carril 5, 100 ng de pHV103
474 (2.5×10^9 copias); carril 6, 10 ng (2.5×10^8 copias); carril 7, 1 ng (2.5×10^7 copias).

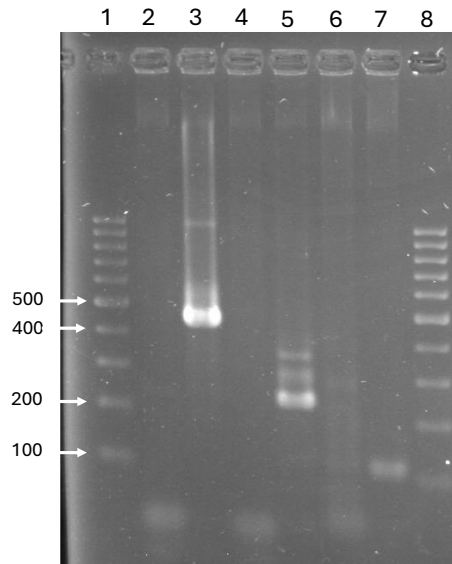
475



476
477
478
479
480
481
482

Fig. 4. Productos de PCR generados a partir del ADN de un raspado cervical VPH 16 positivo y de células SiHa con la pareja de iniciadores de Sotlar et al. (2004) para VPH 16

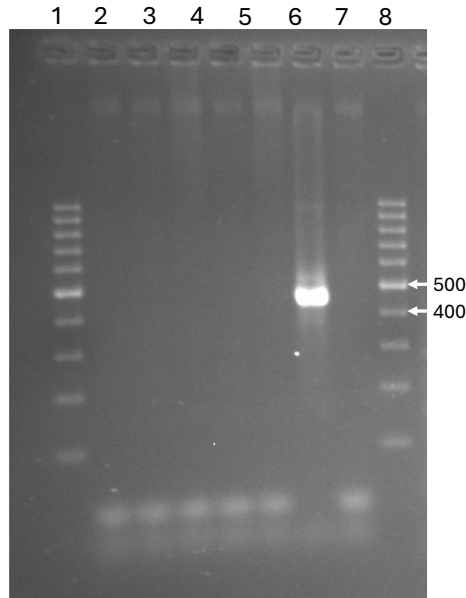
Carril 1, escalera de 100 pb. Carril 2, 100 ng ADN de raspado cervical VPH 16 positivo. Carril 3, 100 ng ADN de células SiHa. Carril 4, agua MilliQ.



483
484
485
486
487
488
489
490
491

Fig. 5. Productos de PCR generados a partir del ADN de un raspado cervical VPH 52 positivo y de células SiHa con la pareja de iniciadores de Sotlar et al. (2004) para VPH16

Carril 1, escalera de 100 pb. Carril 2, control negativo; carril 3, control positivo β -globina; carril 4, 100 ng/ μ L de muestra y coctel 1; carril 5, 100 ng/ μ L de muestra y coctel 2; carril 6; 100 ng/ μ L de muestra y coctel 3; carril 7, 100 ng/ μ L de muestra y coctel 4; carril 8, escalera de 100 pb.



492

493 **Fig. 6. Productos de PCR generados a partir del ADN de un raspado cervical**
 494 **VPH negativo y de células SiHa con la pareja de iniciadores de Sotlar et al.**
 495 **(2004) para VPH 16**

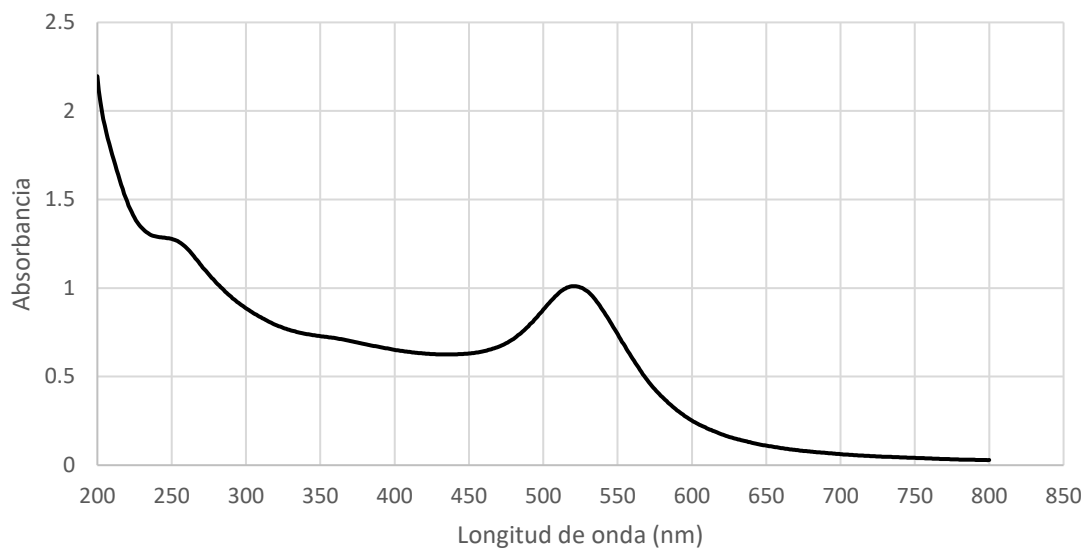
496 Carril 1, escalera de 100 pb. Carril 2, control negativo; carril 3, control positivo β -
 497 globina; carril 4, 100 ng/ μ L de muestra y coctel 1; carril 5, 100 ng/ μ L de muestra y
 498 coctel 2; carril 6; 100 ng/ μ L de muestra y coctel 3; carril 7, 100 ng/ μ L de muestra y
 499 coctel 4; carril 8, escalera de 100 pb.

500 **Características de las AuNP**

501 El espectro UV-VIS de las AuNP tuvo un pico de absorbancia a 520 nm (Fig. 7). La
 502 SEM mostró AuNP esféricas con diámetros de 18-20 nm (Fig. 8) y diámetro
 503 hidrodinámico promedio de 23.28 nm por DLS (Fig. 9).

504 La concentración de las AuNP por espectroscopía UV-VIS fue de 7.52×10^{13}
 505 AuNP/mL y por espectroscopía ICP-OES fue 8.61×10^{13} AuNP/mL.

506

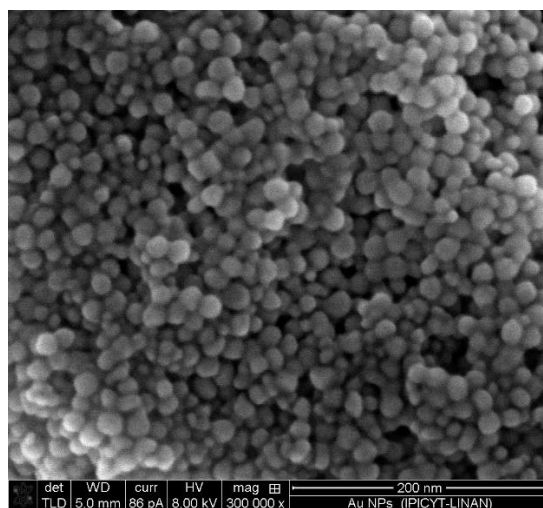


507

508 **Fig. 3. Espectro UV-VIS de las AuNP**

509 El pico de 520 nm es el esperado para AuNP esféricas con diámetro ~20 nm.

510



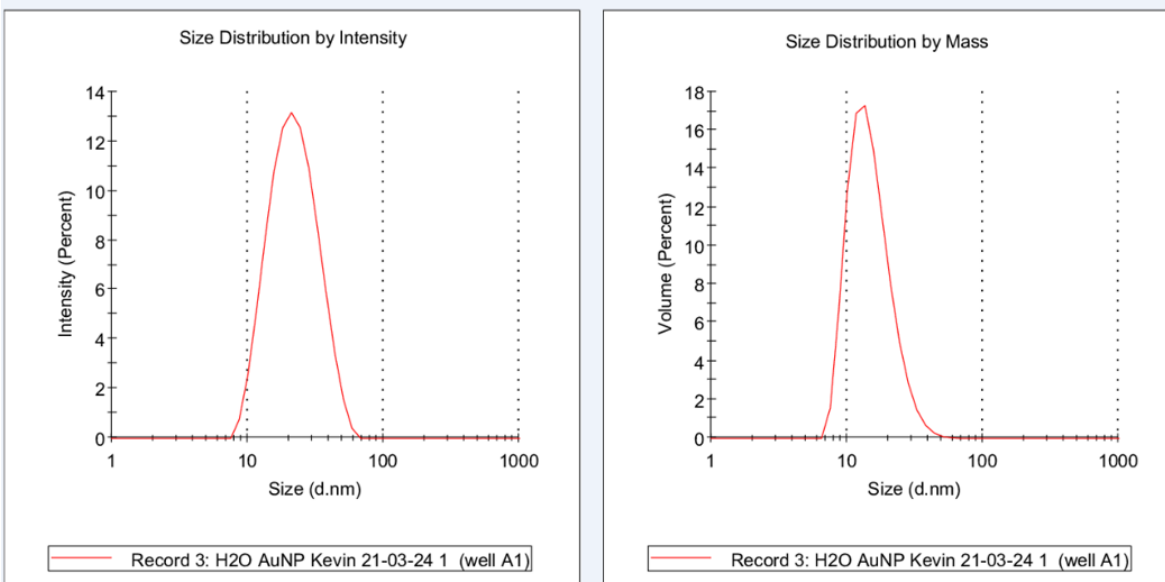
511

512 **Fig. 4. AuNP observadas por SEM**

513 AuNP esféricas, monodispersas, de 18-20 nm de diámetro.

Distribution Results

	Mean \pm SD (nm)	%Pd	Est. MW (KDa) (Mean \pm SD)*	% Intensity	% Mass
Peak 1:	23.28 \pm 9.396	40.4	1.05e+3 \pm 423.8	96.4	100.0
Peak 2:	4213 \pm 998.6	23.7	2.01e+8 \pm 4.77e+7	3.6	0.0
Peak 3:	0.000 \pm 0.000	0	0.0 \pm 0.0	0.0	0.0



The molecular weight reported here is only an estimate, calculated using an empirical mass vs. size calibration curve.

514

515 **Fig. 5. Distribución del diámetro hidrodinámico de las AuNP intactas**

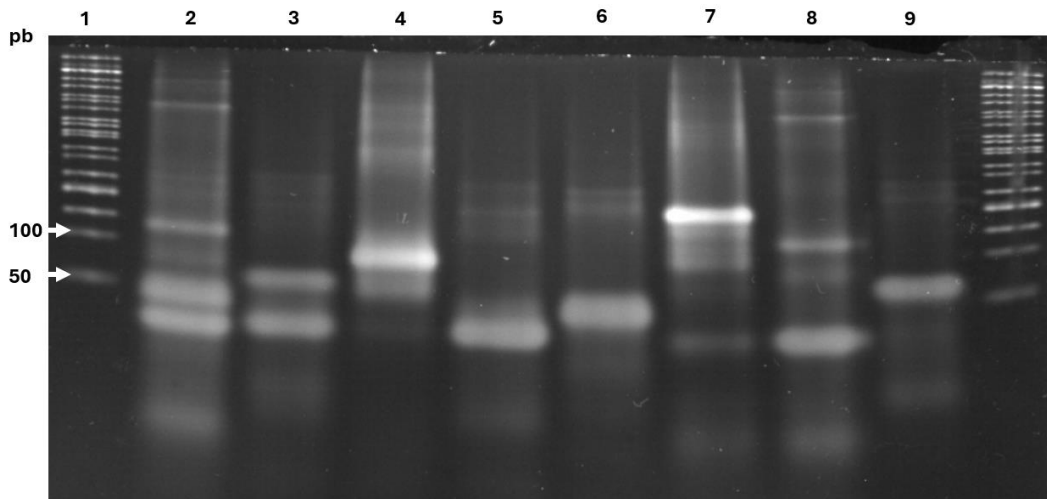
516 AuNP monodispersas; diámetro promedio de 23.28 nm.

517 **Formación de complejos y estructuras en horquilla**

518 Los oligonucleótidos intactos mostraron bandas tenues probablemente por la
519 presencia de cadenas sencillas (Fig. 10). Al calentarlas a 42 °C las bandas se
520 intensificaron, sugiriendo la formación de horquillas con cadenas dobles de ADN.
521 En mezclas con las parejas hE/hS se retardó la migración electroforética de las
522 bandas por la interacción de las horquillas y la formación de complejos de mayor
523 tamaño (Fig. 11).

524 Al aumentar la temperatura a 95 °C y luego e incubar las mezclas a 37 °C se
525 intensificaron las bandas, sugiriendo la formación de horquillas con bandas
526 individuales intensas. En mezclas con las parejas hE/hS las bandas tuvieron
527 migración similar, lo cual sugiere que la formación de horquillas previene la
528 interacción y formación de concatémeros (Fig. 12).

529

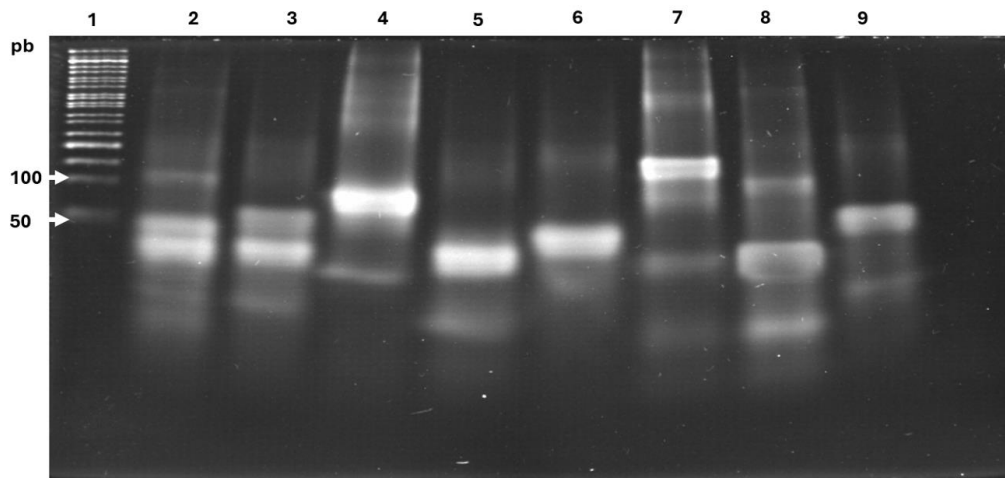


530

531 **Fig. 6. Electroferograma de mezclas de oligonucleótidos para hE16F/hS16F y**
 532 **hE16R/hS16R intactos**

533 Carril 1, escalera de 50 pb. Carril 2, 50 nmolas de hE16F (3×10^{16} copias). Carril 3,
 534 50 nmolas de hS16F (3×10^{16} copias). Carril 4, 50 nmolas de hE16F-hS16F (3×10^{16}
 535 copias). Carril 5, 50 nmolas de hE16R (3×10^{16} copias). Carril 6, 50 nmolas de hS16R
 536 (3×10^{16} copias). Carril 7, 50 nmolas de hE16R/hS16R (3×10^{16} copias de c/u). Carril
 537 8, 50 nmolas de hE16F/hS16R (3×10^{16} copias de c/u). Carril 9, 50 nmol
 538 hE16F/hS16R (3×10^{16} copias de c/u).

539

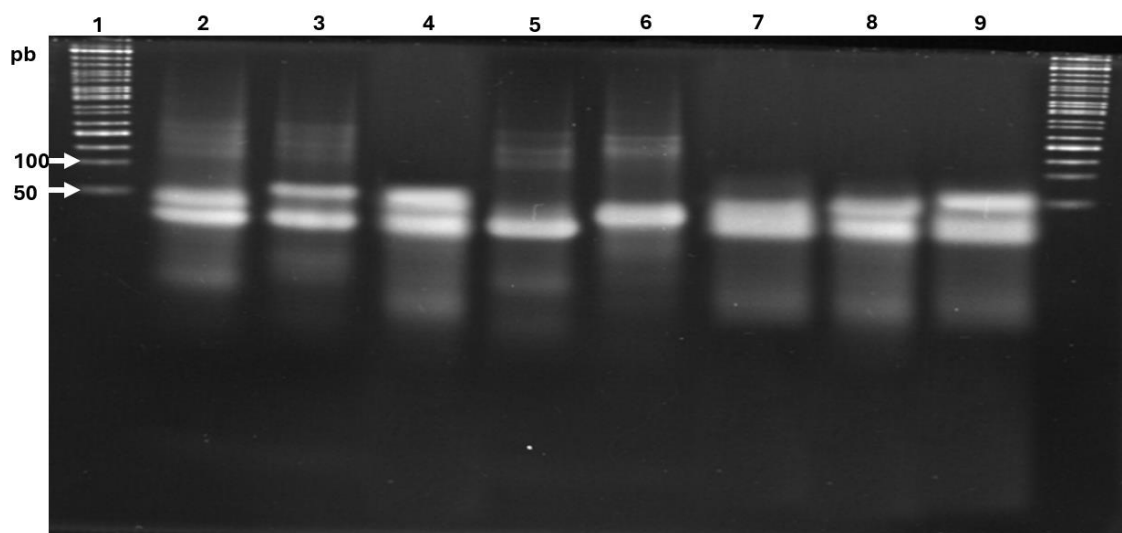


540

541 **Fig. 7. Electroferograma de mezclas de oligonucleótidos para hE16F/hS16F y**
 542 **hE16R/hS16R calentados a 42 °C**

543 Carril 1, escalera de 50 pb. Carril 2, 50 nmolas de hE16F (3×10^{16} copias). Carril 3,
 544 50 nmolas de hS16F (3×10^{16} copias). Carril 4, 50 nmolas de hE16F-hS16F (3×10^{16}
 545 copias). Carril 5, 50 nmolas de hE16R (3×10^{16} copias). Carril 6, 50 nmolas de hS16R
 546 (3×10^{16} copias). Carril 7, 50 nmolas de hE16R/hS16R (3×10^{16} copias). Carril 8, 50
 547 nmol hE16F-hS16R (3×10^{16} copias); carril 9 50 nmol hE16F-hS16R (3×10^{16} copias).

548



549

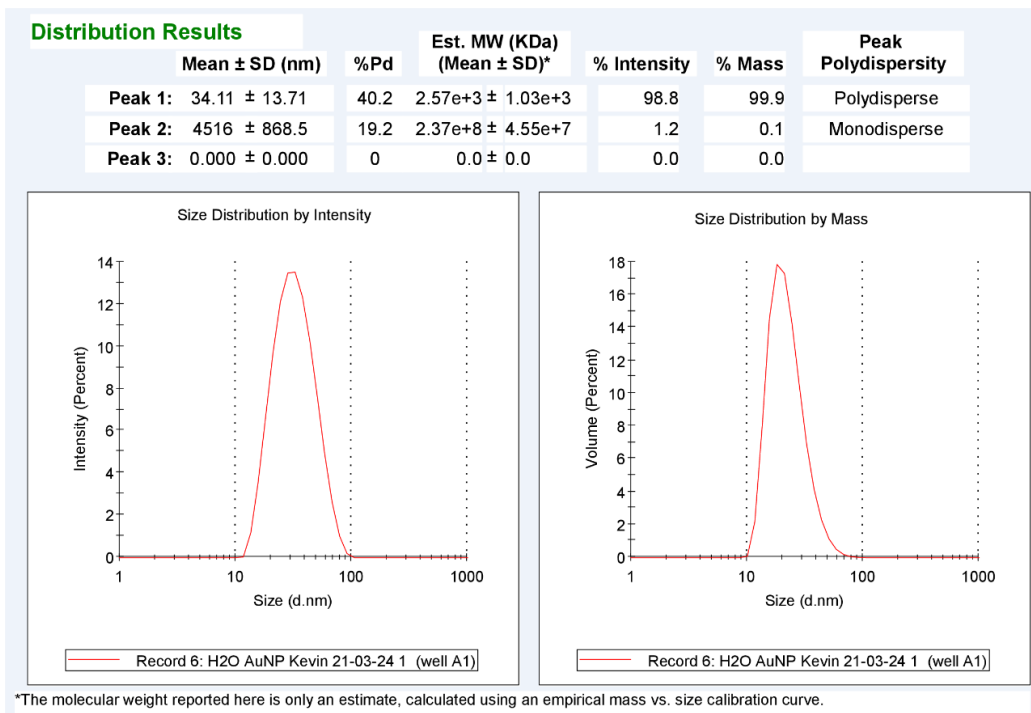
550 **Fig. 8. Electroferograma de mezclas de oligonucleótidos para hE16F/hS16F y**
551 **hE16R/hS16R calentadas a 95 °C**

552 Carril 1, escalera de 50 pb. Carril 2, 50 nmolas de hE16F (3×10^{16} copias). Carril 3,
553 50 nmolas de hS16F (3×10^{16} copias). Carril 4, 50 nmolas de hE16F-hS16F (3×10^{16}
554 copias). Carril 5, 50 nmolas de hE16R (3×10^{16} copias). Carril 6, 50 nmol de hS16R
555 (3×10^{16} copias). Carril 7, 50 nmol de hE16R/hS16R (3×10^{16} copias de c/u). Carril 8,
556 50 nmol hE16F/hS16R (3×10^{16} copias de c/u). Carril 9, 50 nmolas de hE16F/hS16R
557 (3×10^{16} copias de c/u).

558 **Conjugación de AuNP con hE y de MBN con hS**

559 Las AuNP intactas son monodispersas y tienen un diámetro hidrodinámico promedio
560 de 23.28 nm (Fig. 9). Después de su funcionalización con hE16F y hE16R el
561 diámetro promedio aumentó a 34.11 nm (Fig. 13) y 36.72 nm (Fig.14),
562 respectivamente.

563

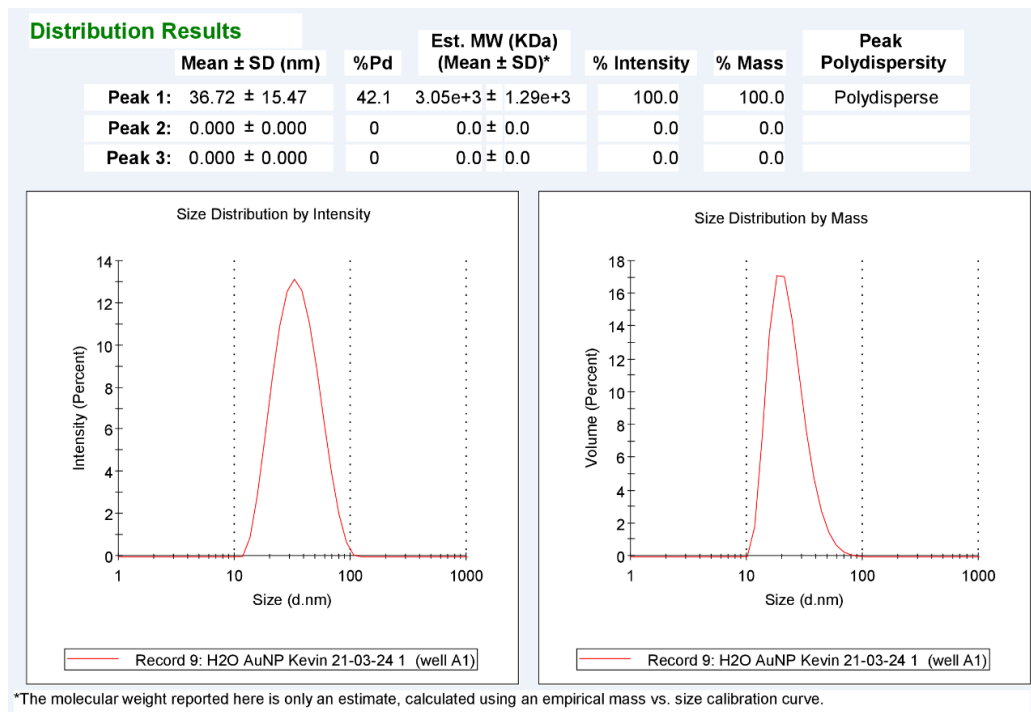


564

565 **Fig. 9. Análisis DLS de hE16F-AuNP**

566 AuNP monodispersas, con diámetro hidrodinámico promedio de 34.11 nm.

567



568

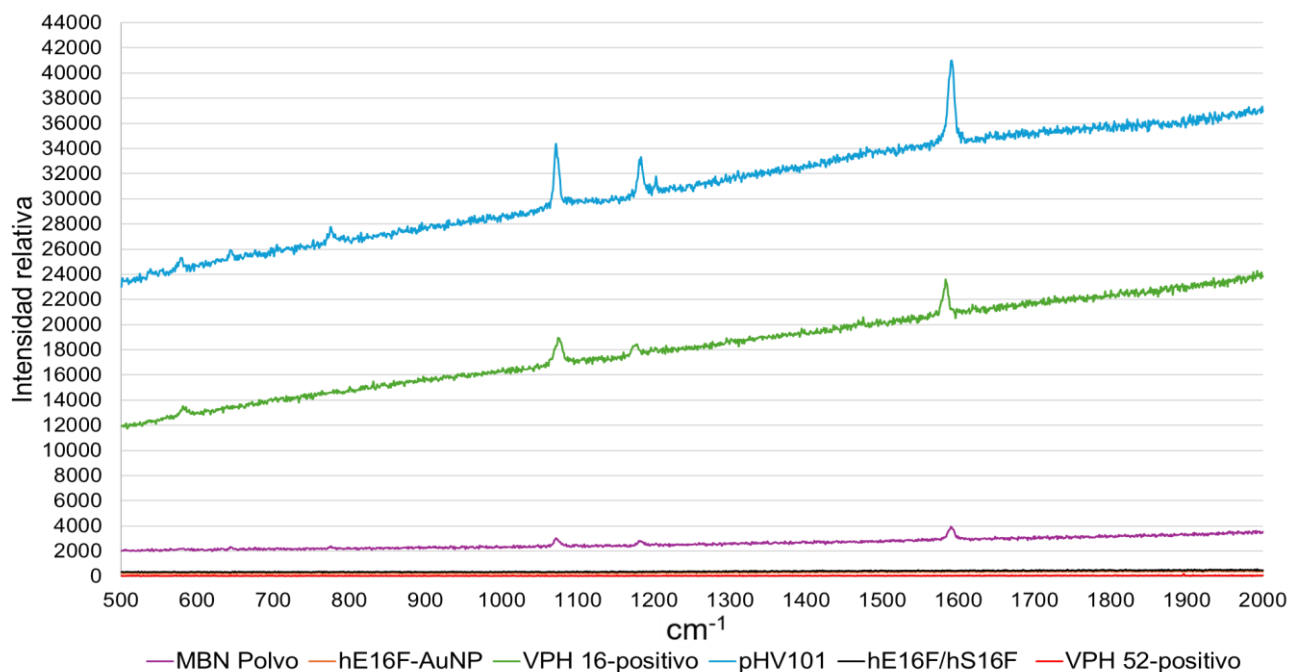
569 **Fig. 10. Análisis DLS de hE16R-AuNP**

570 AuNP monodispersas, con diámetro hidrodinámico promedio de 36.72 nm.

571

572 **Ensayo ECH-SERS para VPH 16**

573 El ensayo ECH-SERS preliminar para VPH 16 fue exitoso. Las AuNP
574 funcionalizadas con hE16F no generaron una señal Raman característica, lo que
575 indica ausencia de interferencias en la medición. La intensidad de los tres picos
576 característicos de la señal Raman de MBN (1080 cm^{-1} , 1183 cm^{-1} y 1590 cm^{-1}) fue
577 mínima, pero aumentó sustancialmente en la mezcla con ADN del raspado cervical
578 VPH 16 positivo y mucho más en la mezcla con pHV102 que porta el inserto de la
579 secuencia blanco del gen *E6* de VPH 16, pero no con ADN de un raspado VPH 52-
580 positivo, ni en ausencia de muestra (Fig. 15).



581

582 **Fig. 11. Espectros Raman de las mezclas del ensayo ECH-SERS para VPH 16** 583 **con la pareja hE16F/hS16F**

584 Los registros corresponden a polvo de MBN (línea morada), mezcla hE16F-AuNP
585 (línea naranja), una muestra de raspado de cérvix VPH 16 positiva (línea verde),
586 pHV101 con el gen de *E6* de VPH 16 (línea azul), mezcla hE16F/hS16F-AuNP (línea
587 negra) y una muestra de raspado de cérvix VPH 52 positiva (línea roja).
588

Discusión

589

590 El presente estudio se centró en el desarrollo de un ensayo ECH-SERS para la
591 detección de los oncogenes *E6* de VPH 16 y 18. Los resultados muestran avances
592 significativos en el montaje de esta técnica para la detección específica y sensible
593 de las secuencias nucleotídicas de los tipos de virus de interés.

594 Nuestros hallazgos demuestran la eficacia del diseño de horquillas para la
595 detección del gen *E6* de VPH 16 mediante ECH. La evaluación *in silico* de las
596 secuencias diseñadas predijo la formación exitosa de estructuras en horquilla, lo
597 cual sugiere que tienen la capacidad de reconocer las secuencias objetivo. Además,
598 la detección exitosa de *E6*-VPH 16 por PCR directa en muestras de ADN de un
599 raspado cervical VPH 18-positivo y de células SiHa confirmó la especificidad de las
600 horquillas diseñadas.

601 Las AuNP sintetizadas resultaron adecuadas para la implementación del
602 ensayo ECH-SERS, pues exhibieron las propiedades físicas esperadas para su
603 funcionalización con hE y utilizarlas como sondas para la detección de las
604 secuencias específicas de VPH 16. La conjugación de las AuNP con las horquillas
605 hE y de las horquillas hS a MBN fueron la base para la detección selectiva del
606 oncogén *E6* de VPH 16.

607 El ensayo ECH-SERS preliminar fue exitoso para detectar la secuencia
608 específica de VPH 16. La ausencia de señal Raman en las AuNP funcionalizadas
609 con hE16F en ausencia de muestra y el aumento significativo de la intensidad de la
610 señal con los picos característicos de MBN en presencia de ADN del oncogén *E6*
611 de VPH 16 confirma la especificidad y sensibilidad de la técnica desarrollada.

612 En resumen, nuestros resultados indican que el ensayo ECH-SERS
613 preliminar es una plataforma prometedora para la detección rápida, específica y
614 sensible del oncogén *E6* de VPH 16 que podría ampliarse para VPH 18 y otros tipos
615 virales de alto y bajo riesgo.

616 Por otra parte, la experiencia adquirida en este trabajo podrá ampliarse para
617 desarrollar métodos similares como el de Si et al. (2020) para la detección de micro
618 ARN marcadores de ciertos tipos de cáncer. Tales métodos podrían aplicarse

619 también para la detección de blancos moleculares de ADN y ARN de otros agentes
620 patógenos.

621 **Referencias**

622 Allabashi R, Stach W, De La Escosura-Muñiz A, et al (2009) ICP-MS: A powerful
623 technique for quantitative determination of gold nanoparticles without
624 previous dissolving. *Journal of Nanoparticle Research* 11:2003–2011.
625 <https://doi.org/10.1007/S11051-008-9561-2/TABLES/4>

626 Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, et al (2020) Estimates of incidence and
627 mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob
628 Health* 8:e191–e203. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30482-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30482-6)

629 Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, et al (2010) Cervical Human Papillomavirus
630 Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal
631 Cytological Findings. *J Infect Dis* 202:1789–1799.
632 <https://doi.org/10.1086/657321>

633 Cavalli F (2012) *Cáncer el gran desafío*. Traducción del alemán Editorial
634 Ciencias Médicas La Habana

635 de Martel C, Georges D, Bray F, et al (2020) Global burden of cancer
636 attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet
637 Glob Health* 8:e180–e190. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-
638 7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7)

639 Fernández-Deaza G, Caicedo-Martinez M, Serrano B, et al Cervical cancer
640 screening programs in Latin America: current recommendations for facing
641 elimination challenges. <https://doi.org/10.21149/13204>

642 Frens G (1973) Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in
643 Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science* 241:20–22.
644 <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>

645 Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG (2007) Determination of size and
646 concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Anal Chem*
647 79:4215–4221. <https://doi.org/10.1021/AC0702084>

648 Hibbitts S, White PL, Green J, et al (2014) Human papilloma virus genotyping
649 by surface-enhanced Raman scattering. *Anal Methods* 6:1288–1290.
650 <https://doi.org/10.1039/C4AY00155A>

651 Hu K, Wang W, Liu X, et al (2018) Comparison of treatment outcomes between
652 squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of cervix after definitive
653 radiotherapy or concurrent chemoradiotherapy. *Radiation Oncology* 13:1–
654 7. <https://doi.org/10.1186/S13014-018-1197-5/TABLES/3>

655 Kannappan S, Heon Lee J, Balaguru Rayappan JB (2021) Methods for
656 Screening of Cervical Cancer: State of Art. *Biomarkers and Biosensors for*
657 *Cervical Cancer Diagnosis* 47–56. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-](https://doi.org/10.1007/978-981-16-2586-2_4/FIGURES/2)
658 [2586-2_4/FIGURES/2](https://doi.org/10.1007/978-981-16-2586-2_4/FIGURES/2)

659 Kimling J, Maier M, Okenve B, et al (2006) Turkevich method for gold
660 nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B* 110:15700–15707.
661 <https://doi.org/10.1021/JP061667W>

662 Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al (2003) Epidemiologic Classification of
663 Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer.
664 <https://doi.org/101056/NEJMoa021641> 348:518–527.
665 <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>

666 Papanicolaou GN, Traut HF (1941) The Diagnostic Value of Vaginal Smears in
667 Carcinoma of the Uterus. *Am J Obstet Gynecol* 42:193–206.
668 [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(16\)40621-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(16)40621-6)

669 Qu W, Jiang G, Cruz Y, et al (1997) PCR detection of human papillomavirus:
670 comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin*
671 *Microbiol* 35:1304–1310. [https://doi.org/10.1128/JCM.35.6.1304-](https://doi.org/10.1128/JCM.35.6.1304-1310.1997)
672 [1310.1997](https://doi.org/10.1128/JCM.35.6.1304-1310.1997)

673 Richart RM, Barron BA (1969) A follow-up study of patients with cervical
674 dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 105:386–393.
675 [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(69\)90268-3](https://doi.org/10.1016/0002-9378(69)90268-3)

676 Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, et al (2011) Human Papillomavirus
677 Testing in the Prevention of Cervical Cancer. *JNCI: Journal of the National*
678 *Cancer Institute* 103:368–383. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq562>

679 Si Y, Xu L, Deng T, et al (2020) Catalytic Hairpin Self-Assembly-Based SERS
680 Sensor Array for the Simultaneous Measurement of Multiple Cancer-
681 Associated miRNAs. ACS Sens 5:4009–4016.
682 <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01876>

683 Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, et al (2004) Detection and Typing of Human
684 Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. J Clin Microbiol 42:3176–
685 3184. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004>

686 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al (2021) Global Cancer Statistics 2020:
687 GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36
688 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin 71:209–249.
689 <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

690 Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J (1951) A study of the nucleation and growth
691 processes in the synthesis of colloidal gold. Discuss Faraday Soc 11:55–
692 75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>

693 Walboomers JMM, Jacobs M V., Manos MM, et al (1999) Human papillomavirus
694 is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol
695 189:12–19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-
696 9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F)

697 Williams J, Kostiuk M, Biron VL (2022) Molecular Detection Methods in HPV-
698 Related Cancers. Front Oncol 12:.
699 <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.864820>

700 Woodman CBJ, Collins SI, Young LS (2007) The natural history of cervical HPV
701 infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer 7:11–22.
702 <https://doi.org/10.1038/nrc2050>

703 Yin P, Choi HMT, Calvert CR, Pierce NA (2008) Programming biomolecular self-
704 assembly pathways. Nature 2008 451:7176 451:318–322.
705 <https://doi.org/10.1038/nature06451>

706 zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical
707 application. Nat Rev Cancer 2:342–350. <https://doi.org/10.1038/nrc798>
708