

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Cambios conformacionales de una variante de aptámero en la
interacción con nanotubos de carbono funcionalizados**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

María Lourdes Pérez Madrid

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
María Lourdes Pérez Madrid

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes
Director de tesis

Dra. Verónica Andrea Jiménez Curihual

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez

Dr. Jonathan Guerrero Sánchez

Dr. Abraham Marcelino Vidal Limón



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Copyright © 2022, Todos los Derechos Reservados, CICESE

Prohibida su reproducción parcial o total sin la autorización por escrito del CICESE

Resumen de la tesis que presenta **María Lourdes Pérez Madrid** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Cambios conformacionales de una variante de aptámero en la interacción con nanotubos de carbono funcionalizados

Resumen aprobado por:

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes

Director de tesis

Los virus del papiloma humano (VPH) son una familia de pequeños virus de DNA sin envoltura con un genoma circular de casi 8000 pares de bases. Los genotipos del VPH se dividen en dos categorías: de riesgo bajo y de riesgo alto, según el espectro de lesiones que inducen. Los VPH de riesgo alto causan cerca del 5% de todos los cánceres en el mundo, siendo el cáncer de cuello uterino de los más frecuentes y una de las principales causas de muerte en los países de ingresos bajos y medios donde las pruebas de detección y el tratamiento no son de fácil acceso. El genoma de los VPH codifica solo ocho genes, E6 y E7 son las principales oncoproteínas y su expresión representa biomarcadores específicos para estrategias de diagnóstico y terapia. Bajo este enfoque, los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla que pueden utilizarse para identificar una amplia variedad de moléculas (incluyendo los productos génicos de los virus). Además, se han utilizado para generar biosensores en diferentes formatos. Aunado a esto, los materiales nanoestructurados a base de carbono han atraído una especial atención por sus propiedades fisicoquímicas únicas que derivan en un gran potencial para su uso en el diagnóstico y terapia del cáncer. La presente investigación tuvo por objetivo caracterizar los cambios conformacionales de un aptámero con capacidad de unión hacia la oncoproteína E7 del VPH en su interacción con nanotubos de carbono provistos de diferentes funcionalizaciones ya que son plataformas prometedoras para desarrollar biosensores de diagnóstico. La metodología desarrollada consistió en el modelado de seis sistemas distintos para estudiar mediante simulaciones de dinámica molecular la influencia de diferentes grupos funcionales en el nanotubo de carbono sobre el comportamiento estructural del aptámero. El estudio de varios complejos del aptámero y nanotubos de carbono con varios tipos de funcionalizaciones permitió determinar que el complejo que poseía el nanotubo prístino fue el mejor candidato para inmovilizar el aptámero bajo las condiciones de trabajo. Además de los resultados obtenidos en esta investigación, se establecieron las bases para continuar con los estudios *in silico* y diseñar un nanobiosensor.

Palabras clave: aptámero, funcionalización, nanotubo de carbono, Virus del Papiloma Humano

Abstract of the thesis presented by **María Lourdes Pérez Madrid** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Conformational changes of an aptamer variant on the interaction with functionalized carbon nanotubes

Abstract approved by:

PhD. Sergio Andrés Águila Puentes

Thesis Director

Human Papillomaviruses (HPVs) are small non-enveloped DNA tumor viruses with a circular genome of nearly 8 Kbp. HPV genotypes are divided into the low-risk and high-risk categories based on the spectrum of induced lesions. The high-risk group causes about 5% of all cancers worldwide, with cervical cancer among the most common and a leading cause of death in developing countries, where screening and treatment are not widely available. HPV genome encode eight genes, of which E6 and E7 have transforming properties and their expression represents specific biomarkers for diagnostic and therapeutic strategies. In recent years there has been considerable interest in biological sensing by means of nucleotide material. Under this approach, aptamers are single-stranded oligonucleotides that can be used to identify a wide variety of molecules (including virus gene products), and have also been used to generate biosensors in different formats. Additionally, carbon-based nanostructured materials have attracted special attention for their unique physicochemical properties that lead in significant potential for use in cancer diagnosis and therapy. The aim of this work was to characterize the conformational changes of an aptamer with binding affinity towards the HPV E7 oncoprotein in its interaction with carbon nanotubes provided with different functionalization, since they are promising platforms for developing diagnostic biosensors. The experimental design consisted of modeling six systems to study, through molecular dynamics simulations, the influence of different functional groups on the structural behavior of the aptamer. The study of several complexes of the aptamer and carbon nanotubes with several types of functionalizations allowed to determine that the complex that had the pristine nanotube was the best candidate to immobilize the aptamer, under the working conditions. Furthermore, these results pave the way to continue with the *in silico* studies to design a nanobiosensor.

Keywords: aptamer, carbon nanotube, functionalization, Human Papillomavirus

Dedicatoria

A mi madre, soy muy afortunada de tenerte.

A mi abuelita.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, investigadores, profesores y a todo el personal que forma parte de ambas instituciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los recursos económico brindados para realizar mis estudios de maestría.

A los proyectos de investigación, Diseño y obtención de un nanobiosensor para el diagnóstico del virus del papiloma humano, Proyecto de Grupo IG200320, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Estudio *in silico* sobre la interacción proteína–ligando para desarrollar un método de búsqueda de compuestos candidatos para aplicación en la nanomedicina, Proyecto de Investigación Grande, LANCAD-UNAM-DGTIC-286.

A mi director de tesis, y a quien ahora considero mi amigo, Dr. Sergio Andrés Águila Puentes por recibirme en su grupo de investigación y darme la oportunidad de aprender un poco de todo este mundo de las simulaciones. No hay palabras para expresar mi gratitud por regalarme la oportunidad de ver la ciencia con otros ojos y desde otra perspectiva. Ha sido un verdadero placer alcanzar una de mis metas en la vida con su ayuda y apoyo.

A los miembros de mi comité de tesis, Dra. Verónica Andrea Jiménez Curihual, Dr. Carlos Brizuela Rodríguez, Dr. Jonathan Guerrero Sánchez y Dr. Abraham Marcelino Vidal Limón por sus valiosas aportaciones, apoyo y correcciones siempre acertadas.

A la Dra. Verónica Jiménez de la Universidad Andrés Bello, Campus Concepción por recibirme con tanta calidez y brindarme su apoyo, recursos y enseñanza que fueron indispensables para que este trabajo haya llegado a su realización.

Gracias a los miembros del AguilaLab por sus consejos y por siempre estar dispuestos a ayudar y resolver dudas.

A mis amigos y compañeros del posgrado, Carlos, Javier, Lalo, Gerardo, Marina y Salma quienes hicieron más llevadero este último año de la maestría. Fue un placer conocerlos y aprender de ustedes, les deseo mucho éxito en sus planes futuros.

A mis amigos que deje en casa pero que me acompañaron a la distancia, saber que puedo contar con ustedes a pesar de la distancia y que me reciban con los brazos abiertos es invaluable.

A mi pequeña familia, a mi mamá, mi hermana y a mi padre. No soy nada sin ustedes, gracias por su apoyo incondicional a pesar de las dificultades, gracias por creer en mí aun cuando yo no lo hago y gracias por impulsarme a cumplir mis sueños. Los amo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	4
1.1.1 Virus del Papiloma Humano (VPH).....	4
1.1.1.1 Clasificación y prevalencia.....	4
1.1.1.2 Genoma del VPH	6
1.1.1.3 Virología del VPH.....	7
1.1.1.4 Habilidades transformadoras de las oncoproteínas E6 y E7	8
1.1.2 Aptámeros.....	9
1.1.3 Nanotubos de carbono.....	12
1.1.3.1 Estructura atómica de los nanotubos de carbono: quiralidad y sus efectos	13
1.1.3.2 Aplicaciones de los nanotubos de carbono.....	15
1.1.3.3 Biosensores basados en nanotubos de carbono.....	16
1.1.3.4 Conjugación de nanotubos de carbono con aptámeros	17
1.1.4 Modelado molecular	17
1.1.4.1 Simulaciones de dinámica molecular	18
1.2 Justificación	20
1.3 Hipótesis.....	21
1.4 Objetivos	22
1.4.1 Objetivo general	22
1.4.2 Objetivos específicos.....	22

Capítulo 2. Metodología.....	23
2.1 Modelos estructurales	24
2.1.1 Modelado de los nanotubos de carbono	24
2.1.2 Modelado del aptámero	25
2.2 Generación de los complejos aptámero–nanotubo.....	25
2.3 Simulaciones de dinámica molecular	27
2.3.1 Preparación de los sistemas.....	27
2.3.2 Minimización, <i>simulated annealing</i> y equilibrado	28
2.3.3 Simulaciones de dinámica molecular	30
2.4 Análisis de trayectorias de dinámica molecular.....	30
2.4.1 RMSD: Root Mean Square Deviation	31
2.4.2 RMSF: Root Mean Square Fluctuation	31
2.4.3 Radio de Giro.....	32
2.4.4 Contactos atómicos aptámero–CNT	32
2.4.4.1 Interacciones tipo π	32
2.4.4.2 Enlaces de hidrógeno	33
Capítulo 3. Resultados y discusiones.....	35
3.1 Minimización, <i>simulated annealing</i> y equilibrado	35
3.2 Producción de dinámica molecular.....	36
3.3 Análisis de las trayectorias de dinámica molecular	38
3.3.1 Determinación de RMSD: Root Mean Square Deviation	38
3.3.2 Determinación de RMSF: Root Mean Square Fluctuation	44
3.3.3 Determinación del Radio de giro.....	48
3.3.4 Contactos atómicos aptámero – CNTs	52
3.3.4.1 Determinación de interacciones tipo π	55
3.3.4.2 Determinación de enlaces de hidrógeno	57
3.3.5 Determinación de RMSD: residuos 28 al 80.....	59
Capítulo 4. Conclusiones	60

Capítulo 5. Perspectivas	61
Literatura citada	62
Anexos	68

Lista de figuras

Figura	Página
1. Relación evolutiva entre los virus del papiloma humano. Tomado de Doorbar et al., 2012.....	5
2. Representación esquemática del genoma del virus del papiloma humano (VPH). Tomado de Choi y Park, 2016.....	6
3. Concepto básico de SELEX, del cual existen diversas modificaciones. Tomado de Groff et al., 2015.....	10
4. Ilustración esquemática que muestra las diferentes aplicaciones de los nanotubos de carbono. Modificado de Alshehri et al., 2016.....	12
5. Representación esquemática que muestra la estructura de un SWCNT y un MWCNT, respectivamente.....	13
6. Estructuras esquemáticas de los SWCNT y como determinan sus propiedades electrónicas. Modificado de Dai, 2002.....	14
7. Esquema que muestra cómo se realiza una simulación de dinámica molecular. Modificado de Durrant y McCammon, 2011.....	19
8. Ejemplo de una ecuación utilizada para aproximar las fuerzas atómicas que gobiernan el movimiento molecular. Modificado de Durrant y McCammon, 2011.....	20
9. Metodología empleada para estudiar los cambios conformacionales del aptámero conjugado con diferentes nanotubos de carbono funcionalizados.....	23
10. Representación del nanotubo de carbono tipo armchair creado con CHARMM GUI....	24
11. Representación del conector hexametileno con un grupo amina terminal, creado con "Molefactory" de VMD.....	26
12. Representación del nanotubo de carbono, conector y aptámero.....	27
13. Representación esquemática de diferentes configuraciones geométricas de interacciones entre anillos aromáticos. Tomado de Zhuang et al., 2019.....	33
14. Minimización, <i>simulated annealing</i> y equilibrado del sistema aptámero.....	35
15. Propiedades físicas del sistema aptámero durante la fase de producción de dinámica molecular.....	36
16. RMSD del aptámero en todos los sistemas simulados.....	39
17. RMSF del aptámero en cada uno de los sistemas simulados.....	44
18. RMSF por <i>cluster</i> del aptámero en cada uno de los sistemas simulados.....	46
19. Radio de giro de los átomos de la cadena principal del aptámero (derecha). Representación gráfica del plegamiento del aptámero sobre los distintos CNTs (izquierda).....	49
20. Relación del radio de giro vs número de contactos en los sistemas simulados.....	51
21. <i>Heatmap</i> que muestra los residuos del aptámero que tienen contacto con los CNTs según el sistema y con la oncoproteína E7, así como la frecuencia de interacción.....	54

22.	Representación de las interacciones tipo π identificadas entre el aptámero y los CNTs.....	56
23.	RMSD de los residuos libres para la interacción con la oncoproteína E7.....	59
24.	Gráfico que condensa los resultados del cálculo de RMSD para todos los sistemas.....	68
25.	Gráfico que condensa los resultados del cálculo de RMSF para todos los sistemas.....	68
26.	Gráfico que condensa los resultados del cálculo de Radio de Giro para todos los sistemas.....	69

Lista de tablas

Tabla		Página
1.	Funciones de los genes del virus del papiloma humano.....	7
2.	Nomenclatura de cada sistema, descripción y número de átomos.....	28
3.	RMSD promedio de la trayectoria de DM en referencia a la estructura nativa del aptámero.....	41
4.	<i>Clusters</i> conformacionales identificados para cada sistema.....	42
5.	Residuos que forman enlaces de hidrógeno con los CNTs por sistema.....	58

Capítulo 1. Introducción

Los virus del papiloma humano (VPH) son una familia de pequeños virus de DNA sin envoltura con un genoma circular de casi 8000 pares de bases (Chouhy et al., 2013). Se han identificado más de 200 tipos de virus y aproximadamente un tercio de ellos infectan el epitelio escamoso del tracto genital (Moody y Laimins, 2010). Estos virus se pueden transmitir por relaciones sexuales vaginales, anales u orales (VPH y el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer, 2021).

Los genotipos del VPH se dividen en dos categorías: de riesgo bajo y de riesgo alto, según el espectro de lesiones que inducen. Los genotipos de riesgo bajo producen verrugas en el área de los genitales, el ano, la boca o la garganta. El grupo de riesgo alto está asociado con el desarrollo de muchos carcinomas de pene, vagina, vulva, ano y cánceres orales. Además, se consideran los agentes causantes de la mayoría de los cánceres de cuello uterino (Friend Tambunan y Aditya, 2012; Moody y Laimins, 2010). Se han reportado alrededor de 14 tipos de VPH de riesgo alto, dos de estos el VPH-16 y el VPH-18 son los responsables de la mayoría de los cánceres relacionados con el VPH (Schiffman et al., 2007).

En la mayoría de los casos, los VPH resultan asintomáticos o causan síntomas menores en las personas infectadas. La infección por el VPH de riesgo alto no causa síntomas. Los cambios precancerosos en las células debido a una infección persistente por el VPH en el cuello uterino tampoco causan síntomas. Sin embargo, es posible que las lesiones precancerosas en otros sitios del cuerpo si causen síntomas (VPH y el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer, 2021).

En todo el mundo, la incidencia de los cánceres relacionados con el VPH es muy grande. Los VPH de riesgo alto causan cerca del 5 % de todos los cánceres a nivel mundial. Entre estos, se calcula que 570 000 mujeres y 60 000 hombres tienen un cáncer relacionado con el VPH cada año. El cáncer de cuello uterino es de los cánceres más frecuentes y una de las principales causas de muerte relacionadas con el cáncer en los países de ingresos bajos y medios, donde las pruebas de detección y el tratamiento de los cambios iniciales en las células del cuello uterino no son de fácil acceso (VPH y el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer, 2021).

Como método preventivo contra el VPH, se ha desarrollado y empleado la vacuna Gardasil que protege contra la infección por nueve tipos de VPH: los dos tipos de riesgo bajo que causan la mayoría de las verrugas genitales y los siete tipos de riesgo alto que causan la mayoría de los cánceres relacionados con el VPH (VPH y el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer, 2021). En la actualidad, todavía no se dispone de un tratamiento eficaz y seguro contra las infecciones por VPH. Para las personas ya infectadas las opciones

terapéuticas actuales están más dirigidas a la erradicación quirúrgica o la destrucción de lesiones malignas mediante intervención física o quimioterapéutica (Friend Tambunan y Aditya, 2012).

El genoma del virus del papiloma humano codifica solo ocho genes, de los cuales E6 y E7 son las principales oncoproteínas codificadas. Cada una tiene numerosas dianas celulares, la proteína p53 y la proteína del retinoblastoma (pRB) son las más importantes. La inhibición de p53 por E6 bloquea la apoptosis, mientras que la inhibición de pRB por E7 anula la detención del ciclo celular (Schiffman et al., 2007). La acción combinada de las proteínas E6 y E7 al dirigirse a estos reguladores del ciclo celular también da como resultado la supresión de muchos puntos de control. En las células infectadas de forma persistente con el VPH, esto deriva en la acumulación de mutaciones celulares a lo largo del tiempo y la consecuente progresión al cáncer (Moody y Laimins, 2010).

Los biomarcadores específicos de enfermedades son una herramienta importante para el manejo oportuno y eficaz de condiciones patológicas, incluida la determinación de la susceptibilidad, el diagnóstico y el seguimiento de la eficacia de las estrategias preventivas o terapéuticas (Graham y Zarbl, 2012). En este sentido, la expresión de los genes de las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano representa candidatos a biomarcadores específicos para estrategias de diagnóstico y terapia (Toscano-Garibay et al., 2011).

Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla con tamaños entre 70 y 100 nucleótidos que pueden ser generados contra una amplia gama de moléculas, entre las que se incluyen los productos génicos de los virus (James, 2007). El concepto de aptámeros surgió a través de la observación de que las macromoléculas con diferentes estructuras moleculares primarias adoptan una configuración tridimensional única, cada una de las cuales tiene afinidades específicas para unirse y formar complejos con otras moléculas (Graham y Zarbl, 2012).

Los aptámeros tienen el potencial de emular a los anticuerpos en muchas aplicaciones, e incluso, de superarlos, debido a su alta afinidad de unión y su capacidad para discriminar entre objetivos estrechamente relacionados. Además, pueden ser muy pequeños, por lo tanto, alcanzan objetivos que pueden ser inaccesibles para los anticuerpos. Adicionalmente, no son inmunogénicos y pueden sintetizarse con una pureza muy alta y modificarse de diversas formas para aumentar su estabilidad (Nicol et al., 2013). Se pueden producir *in vitro* y, por lo tanto, no se requiere de otros métodos para producir cantidades masivas. Una vez que se determina la secuencia de ácidos nucleicos de un aptámero funcional,

se pueden producir grandes cantidades del oligómero específico mediante síntesis química o enzimática a bajo costo y alta eficacia (Graham y Zarbl, 2012).

Bajo este enfoque, los aptámeros pueden usarse para identificar una amplia variedad de moléculas que incluyen ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos, así como modificaciones postraduccionales de dichas moléculas que se encuentran expuestas en la superficie de las células (Graham y Zarbl, 2012). También son útiles en el diseño de métodos de detección y como alternativas terapéuticas para diversas enfermedades. Una prueba de esto es que se han seleccionado muchos aptámeros de RNA para identificar una gran cantidad de dianas, desde pequeñas moléculas como aminoácidos hasta grandes estructuras proteicas como partículas virales o incluso células y microorganismos enteros (Toscano-Garibay et al., 2011). También, se han utilizado para generar biosensores en una amplia variedad de formatos (James, 2007). Estas moléculas biológicas se pueden combinar con nanoestructuras inorgánicas para formar materiales híbridos multifuncionales con propiedades únicas que impulsarán los avances en nanoelectrónica, seguridad ambiental y medicina (Johnson et al., 2008).

Con los recientes avances en el campo de la nanobiotecnología, los materiales nanoestructurados a base de carbono (nanotubos de carbono, grafeno, fullerenos, puntos cuánticos) han atraído una atención especial por sus propiedades fisicoquímicas únicas que derivan en un gran potencial para el diagnóstico y terapia del cáncer (Augustine et al., 2017). Los nanotubos de carbono (CNTs, por sus siglas en inglés) tienen muchas propiedades físicas, mecánicas y electrónicas únicas (Sinha y Yeow, 2005). Estos materiales se pueden funcionalizar con biomoléculas a través de diversas estrategias de recubrimiento de superficies, por lo tanto, es posible utilizarlos para aplicaciones en biosensores (Augustine et al., 2017; Vaseashta, 2006).

Las técnicas computacionales son muy adecuadas para obtener información detallada sobre sistemas a nanoescala, son muy útiles para completar los detalles donde los métodos experimentales no pueden (Johnson et al., 2008). Dentro de este campo está el modelado molecular, el cual describe la generación, manipulación o representación de estructuras tridimensionales de moléculas y sus propiedades físico-químicas asociadas. Implica una gama de técnicas computacionales basadas en métodos físicos y químicos, teóricos y datos experimentales para predecir propiedades moleculares físicas, químicas y biológicas; se encuentra en algún lugar entre la teoría, la observación y el experimento (The rise of molecular modelling | Feature | RSC Education, 2017). Es una herramienta que juega un papel clave en la predicción de estructuras y propiedades de diferentes tipos de sistemas y ayuda en la comprensión de muchos fenómenos observados experimentalmente (Barbosa et al., 2017).

Por lo anterior, y debido a la prevalencia del VPH, el propósito de esta investigación fue estudiar los cambios conformacionales de un aptámero (desarrollado específicamente para identificar la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano) en su interacción con nanotubos de carbono provistos de diversas funcionalizaciones, ya que estos sistemas ofrecen una intrigante combinación de propiedades derivadas de una biomolécula esencial y ubicua y uno de los materiales inorgánicos más aclamados, lo que les confiere potenciales aplicaciones como biosensores de diagnóstico; todo esto, utilizando técnicas de modelado molecular.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Virus del Papiloma Humano (VPH)

1.1.1.1 Clasificación y prevalencia

Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae* (Y. J. Choi y Park, 2016) que, a su vez, se clasifican dentro de cinco géneros distintos: *Alfa-papilomavirus*, *Beta-papilomavirus*, *Gama-papilomavirus*, *Mu-papilomavirus* y *Nu-papilomavirus* (Figura 1). Esta clasificación taxonómica ha sido establecida de acuerdo al tipo de lesiones que causan, al tropismo celular y a la similitud de las secuencias genéticas. La patogenicidad del VPH varía según el genotipo (Doorbar et al., 2012).

El género *Alpha-papillomavirus* incluye los genotipos del VPH que infectan tanto la mucosa oral como la genital (Y. J. Choi y Park, 2016). Este género específico de VPH está asociado con el cáncer de cuello uterino.

El VPH también se puede agrupar en categorías de "riesgo alto" y "riesgo bajo" según su potencial oncogénico. Entre los 14 genotipos de VPH de riesgo alto (VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), los dos más comunes (VPH-16 y 18) son los factores causantes del 70% de los cánceres de cuello uterino. Dos genotipos de VPH de riesgo bajo (VPH-6 y 11) contribuyen a la formación de verrugas genitales, la mayoría de las cuales requieren tratamiento (Y. J. Choi y Park, 2016).

En el año de 2018, estos virus causaron un estimado de 570,000 casos nuevos de cáncer de cuello uterino en mujeres. Casi el 90% de las 311,000 muertes ocurridas en todo el mundo en este mismo año ocurrieron

en países de ingresos bajos y medios (Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer, 2020). Esta enfermedad se ubica como el cuarto cáncer diagnosticado con mayor frecuencia y la cuarta causa de muerte por cáncer en las mujeres. El cáncer de cuello uterino ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad después del cáncer de mama en entornos con IDH (índice de desarrollo humano) más bajo; sin embargo, es el cáncer más comúnmente diagnosticado en 28 países (Hoja de datos sobre cáncer de cuello uterino, 2019).

En México, desde 2006, el cáncer de cuello uterino es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. Anualmente se estima una ocurrencia de 13,960 casos en mujeres, con una incidencia de 23.3 casos por 100,000 mujeres. La distribución de los casos de cáncer de cuello uterino en relación al grupo de edad, muestra un incremento a partir de los 35 años, siendo el grupo de 50 a 59 años de edad el que registra el mayor porcentaje (22.2%) de todos los casos para el año 2017. El 77.5% de los genotipos reportados de VPH corresponden a otros VPH de riesgo alto, un 10.1% a VPH-16, un 4.2% a VPH-18 y el resto fueron debido a coinfección de estos genotipos (Hoja de datos sobre cáncer de cuello uterino, 2019).

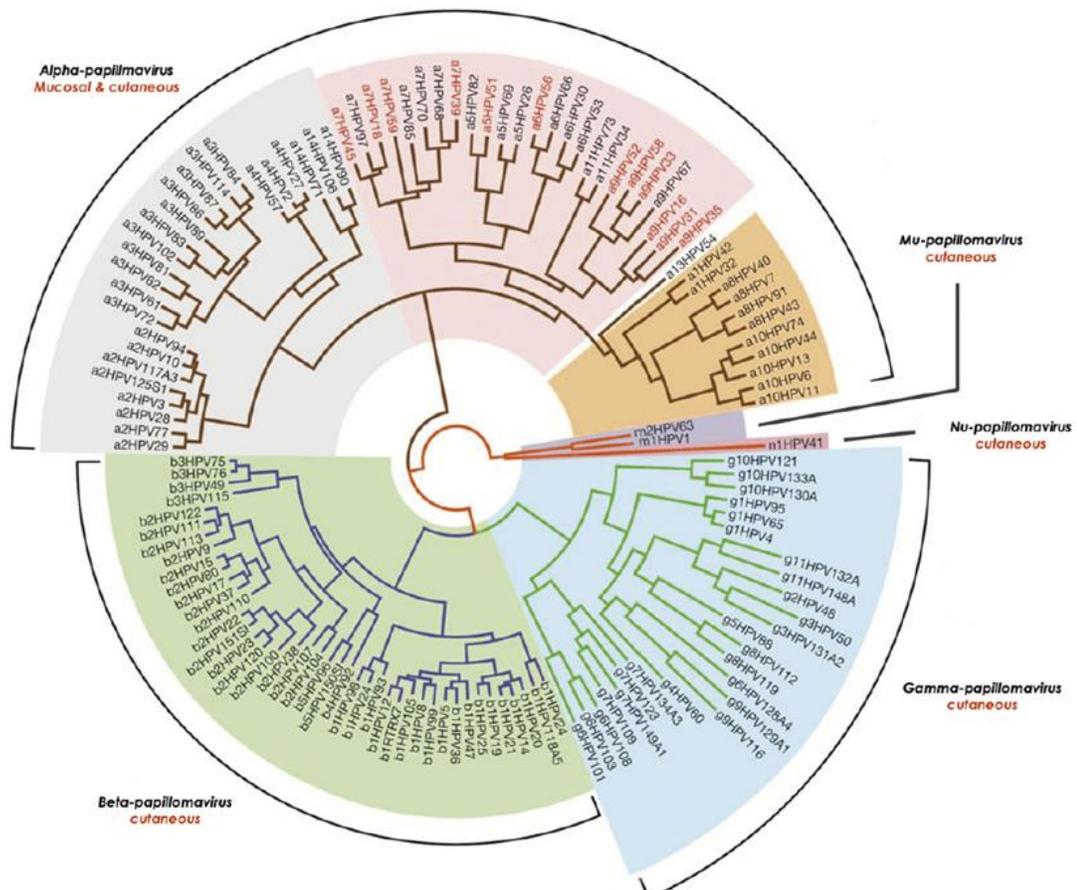


Figura 1. Relación evolutiva entre los virus del papiloma humano. Tomado de Doorbar et al., 2012.

Es importante destacar que estos virus también están asociados con cánceres en otras partes del cuerpo, incluido el pene en los hombres, la vagina y la vulva en las mujeres y, en ambos sexos, la zona de transformación anal, las amígdalas, la orofaringe y la base de la lengua (Doorbar et al., 2012).

1.1.1.2 Genoma del VPH

El VPH es un virus pequeño de DNA bicatenario, consiste en una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros con formas que se asemejan a estrellas de cinco picos. Existe un genoma de virus dentro de la cápside que alberga ocho marcos de lectura abiertos. El genoma se divide en tres regiones: una zona de expresión temprana (E: *early*), una zona de expresión tardía (L: *late*) y una región larga de control (LCR: *long control region*) (Figura 2) (Y. J. Choi y Park, 2016).

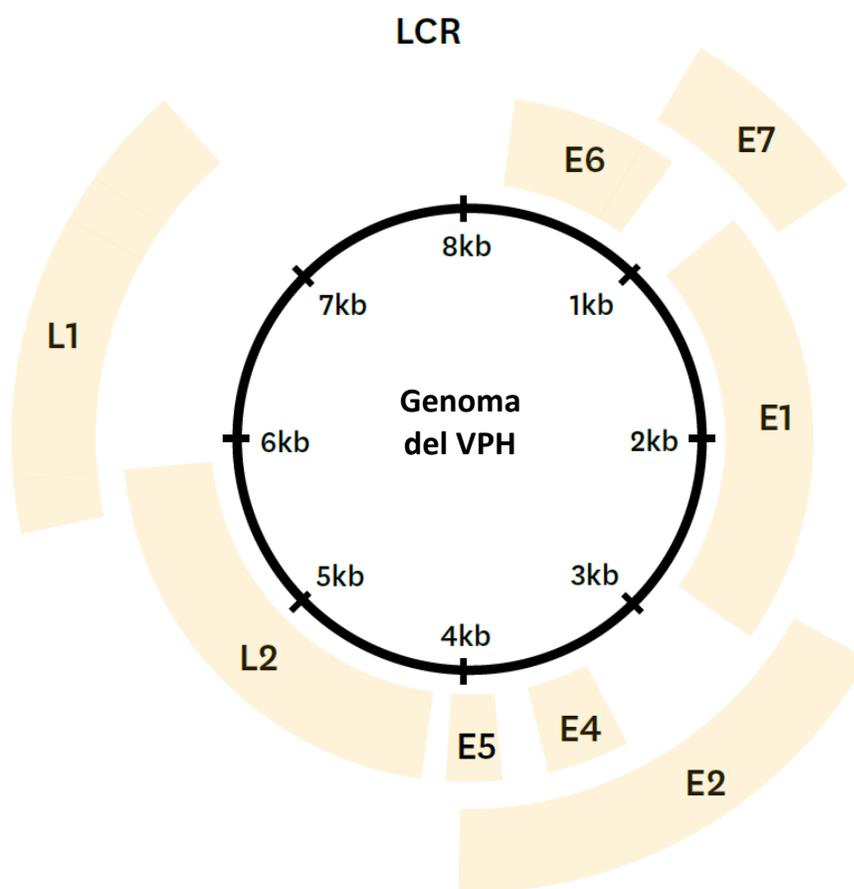


Figura 2. Representación esquemática del genoma del virus del papiloma humano (VPH). Tomado de Choi y Park, 2016.

En la Tabla 1 se muestran las funciones de los genes del VPH. La zona de expresión temprana del genoma codifica los genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7, que participan en la replicación viral, la regulación de la transcripción y la oncogénesis. La zona de expresión tardía del genoma codifica las proteínas estructurales L1 y L2. Estas proteínas comprenden la proteína de la cápside, protegen al genoma viral ubicado en el interior y se expresan en la capa superior del epitelio (Ochoa-Carrillo, 2014).

Tabla 1. Funciones de los genes del virus del papiloma humano.

Región	Gen	Función
Región codificante		
<i>Región temprana (E)</i>	E1	<ul style="list-style-type: none"> Permite la replicación episomal y actúa como helicasa replicativa.
	E2	<ul style="list-style-type: none"> Regula la transcripción viral; particularmente inhibe E6 y E7.
	E4	<ul style="list-style-type: none"> Se une a las proteínas del citoesqueleto y rompe la red citoesquelética, contribuyendo a la deformación de las células infectadas (coilocitosis).
	E5	<ul style="list-style-type: none"> Inhibe la apoptosis y la exposición de complejos de histocompatibilidad tipos I y II; evitando así una respuesta mediada por células T. Interactúa con los receptores del factor de crecimiento.
	E6	<ul style="list-style-type: none"> Se une al gen supresor de tumores, p53.
	E7	<ul style="list-style-type: none"> Se une al gen supresor de tumores de retinoblastoma (Rb).
<i>Región tardía (L)</i>	L1	<ul style="list-style-type: none"> Codifica una proteína de la cápside estructural importante (55 kDa de tamaño).
	L2	<ul style="list-style-type: none"> Codifica una proteína de la cápside estructural menor (70 kDa de tamaño).
Región no codificante		
<i>Región de control larga</i>	LCR	<ul style="list-style-type: none"> Involucrado en la replicación y transcripción viral.

1.1.1.3 Virología del VPH

La mayoría de los virus infectan una célula diana y producen virus descendientes de esa misma célula infectada. Por el contrario, en las infecciones por VPH, la síntesis de nuevos viriones se produce solo después de que la célula infectada haya sufrido mitosis y una de las células hijas infectadas se haya diferenciado. Los VPH infectan las células de la capa basal del epitelio escamoso estratificado con la entrada de la partícula a través de micro laceraciones en la piel hasta alcanzar la capa basal del epitelio (Moody y Laimins, 2010). Una vez ahí, el virus infecta los queratinocitos basales adentrándose en ellos a través de una endocitosis mediada por receptor. Posteriormente, dentro de la célula, los viriones se

desensamblan y el DNA vírico, unido a la proteína L2, es internalizado en el núcleo celular (Doorbar et al., 2012).

Después de la infección, los genomas del VPH se establecen como elementos extracromosómicos o episomas dentro del núcleo de la célula, y dependen de las proteínas de replicación de la célula huésped para mediar en la síntesis de DNA viral. Los genes E1 y E2 son necesarios para el mantenimiento de los genomas virales en las células huésped, ya que sirven como sitios iniciales para la replicación del DNA viral y también reclutan la DNA polimerasa celular necesaria para la replicación (Moody y Laimins, 2010). Durante esta fase, el VPH toma el control del ciclo celular lo que hace estimular la proliferación de la célula infectada y con ello la diseminación del genoma viral en las células hijas. Para lograr esto, las oncoproteínas E6 y E7 actúan para mejorar la proliferación celular, lo que resulta en un mayor número de células infectadas y viriones infecciosos (Y. J. Choi y Park, 2016). Además, su acción combinada al dirigirse a reguladores del ciclo celular da como resultado la abrogación de muchos puntos de control del ciclo celular (Moody y Laimins, 2010).

Posteriormente, cuando el queratinocito infectado entra en el estadio final de diferenciación, al pasar de la fase S a la fase G2, el virus incrementa sus niveles de replicación con ayuda de las proteínas E1, E2, E4 y E5; lo que produce un aumento del número de episomas por célula (Bodily y Laimins, 2011). Tras la replicación, da comienzo la expresión de las proteínas L1 y L2 las cuales son reclutadas dentro del núcleo en donde llevan a cabo la encapsidación del genoma. Por último, la maduración de estas partículas virales ocurre en los queratinocitos más superficiales y senescentes del epitelio, a partir de los cuales las partículas infecciosas son liberadas (Doorbar et al., 2012).

En las células infectadas de forma persistente con el VPH, esto conduce a la acumulación de mutaciones celulares a lo largo del tiempo y la consecuente progresión al cáncer (Moody y Laimins, 2010).

1.1.1.4 Habilidades transformadoras de las oncoproteínas E6 y E7

La principal actividad transformadora de los VPH de alto riesgo la proporcionan las oncoproteínas E6 y E7. Estos dos factores actúan de manera cooperativa en el desarrollo de cánceres inducidos por el VPH, y la acción de un factor complementa la del otro. Tanto E6 como E7 son proteínas pequeñas, de aproximadamente 18 y 13 kDa de tamaño, respectivamente, localizadas en el núcleo. Las proteínas E6 también se encuentran en el citoplasma y algunos estudios han sugerido que E7 también tiene un

componente citoplasmático. La combinación de E6 y E7 es muy eficaz para inmortalizar la mayoría de los tipos de células primarias (Moody y Laimins, 2010).

En la fase productiva del ciclo de vida del VPH, E6 y E7 promueven la proliferación de células suprabasales indiferenciadas y diferenciadas y también permiten evitar la apoptosis. Esto conduce a la acumulación de daño y mutaciones en el DNA que pueden resultar en la transformación y el desarrollo de carcinomas (Moody y Laimins, 2010). Es por esto que estos biomarcadores específicos de transformación son útiles para estudios de progresión de la enfermedad, prevención y/o respuesta a la terapia (Graham y Zarbl, 2012).

En este sentido, surge una propuesta en torno al uso de biomoléculas con alta capacidad de reconocimiento de dianas celulares. Los aptámeros, por ejemplo, son macromoléculas que pueden ser dirigidas hacia el reconocimiento de determinados blancos en función de su estructura tridimensional.

1.1.2 Aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena corta de DNA o RNA monocatenario, generalmente en el rango de 40 a 100 nucleótidos (Kudłak y Wiczerzak, 2020). Pueden unirse a sus objetivos con alta especificidad y afinidad a través de fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, puentes salinos, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas. Tienen la capacidad de plegarse en formas tridimensionales complejas y estables, lo que les permite plegarse dentro o alrededor de sus objetivos. Los aptámeros de DNA tienen una mayor estabilidad química, mientras que los de RNA producen formas más estructurales debido a su mayor flexibilidad (Groff et al., 2015).

Estos oligonucleótidos pueden unirse a una amplia gama de enzimas, proteínas reguladoras, factores de crecimiento, anticuerpos monoclonales y policlonales, lectinas, así como vitaminas de bajo peso molecular, antibióticos, pigmentos orgánicos, aminoácidos, péptidos, nucleótidos, tejidos y organismos, células e incluso algunos iones metálicos (Kudłak y Wiczerzak, 2020).

Los aptámeros se reportaron por primera vez en 1990, y fueron conceptualizados independientemente por tres grupos de investigadores: Ellington y Szostak (1990), Robertson y Joyce (1990) y Tuerk y Gold (1990). Estos últimos llamaron al proceso de producción Evolución Sistemática de Ligandos por

Enriquecimiento Exponencial (SELEX: *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) (Figura 3) (Groff et al., 2015).

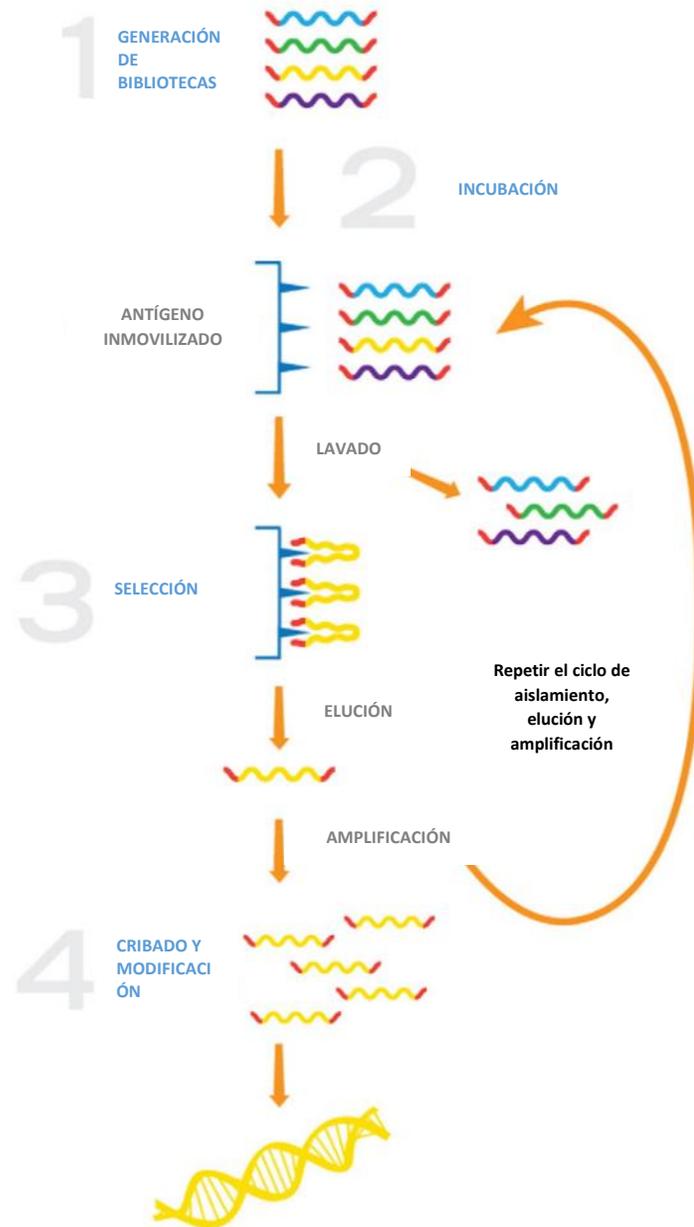


Figura 3. Concepto básico de SELEX, del cual existen diversas modificaciones. Implica: **1)** Los oligonucleótidos de secuencia aleatoria se sintetizan con una región central aleatoria y sitios de unión terminales. **2)** Se incuba una diana inmovilizada con la biblioteca de oligonucleótidos. **3)** Los oligonucleótidos que se unen a la diana se aíslan, eluyen y amplifican. Este ciclo se repite hasta que se seleccionan los oligonucleótidos con alta afinidad de unión. **4)** Los oligonucleótidos que se unen a la diana se clonan, secuencian, se verifica su capacidad de unión y se modifican para el uso previsto. Tomado de Groff et al., 2015.

Es posible integrar aptámeros con varias plataformas y transductores que convertirán la señal del aptámero unido con el analito en señales fluorescentes, colorimétricas o electroquímicas medibles y que dependen de la concentración del analito. Los aptámeros producidos comercialmente están disponibles a través de múltiples proveedores (Aptagen LLC, BasePair Biotechnologies Inc., AptaMatrix Inc.) que brindan servicios para ajustar su sensibilidad y su estructura (Kudlak y Wiczerzak, 2020).

Los aptámeros se han convertido en herramientas moleculares cada vez más importantes para el diagnóstico y terapia. En particular, los biosensores basados en aptámeros poseen ventajas sin precedentes en comparación con los biosensores que utilizan anticuerpos y enzimas (Song et al., 2008):

- En primer lugar, los aptámeros con alta especificidad y afinidad pueden, en principio, seleccionarse *in vitro* para cualquier diana dada, lo que hace posible desarrollar una amplia gama de biosensores basados en aptámeros.
- En segundo lugar, los aptámeros, una vez seleccionados, pueden sintetizarse con alta reproducibilidad y pureza a partir de fuentes comerciales. Además, a diferencia de los anticuerpos o enzimas basados en proteínas, los aptámeros de DNA suelen ser muy estables químicamente.
- En tercer lugar, los aptámeros a menudo sufren cambios conformacionales significativos al unirse a la diana. Esto ofrece una gran flexibilidad en el diseño de nuevos biosensores con alta sensibilidad y selectividad de detección.

Con estas ventajas, se han logrado avances significativos en la detección basada en aptámeros; la publicación de artículos bajo las palabras clave “aptámero” y “biosensor” ha ido creciendo exponencialmente. Si bien una serie de fármacos basados en aptámeros y moléculas de direccionamiento han entrado en ensayos clínicos e incluso han sido aprobados, como Macugen, hay pocos productos de diagnóstico basados en aptámeros en el mercado (Zhou et al., 2014).

Para el desarrollo de biosensores en la mayoría de los casos se requiere la inmovilización del receptor en una superficie para su integración en un dispositivo. Un objetivo importante para la inmovilización de aptámeros es mantener la afinidad de unión y la selectividad que muestra el aptámero en solución (Balamurugan et al., 2008a).

Uno de los mayores éxitos de la nanobiotecnología se relaciona con el desarrollo de sensores biológicos de próxima generación. Recientemente, las nanoestructuras como los nanotubos de carbono, se han

demostrado con éxito como sensores biológicos sensibles. Se ha informado que la detección en tiempo real de virus, moléculas pequeñas y proteínas es posible con biosensores que utilizan transistores de nanotubos de carbono como transductor activo (So et al., 2005).

1.1.3 Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (CNTs) tienen propiedades físicas, mecánicas, ópticas y electrónicas únicas. Estas propiedades distintivas pueden aprovecharse de tal modo que estos nanomateriales tienen potenciales aplicaciones que van desde sensores y actuadores hasta materiales compuestos (Sinha y Yeow, 2005). Los CNTs se encuentran entre los nanomateriales más prometedores para aplicaciones en el campo biomédico, incluida la administración de fármacos, la terapia génica, los biosensores y las aplicaciones en ingeniería de tejidos (Figura 4) (Simon et al., 2019).

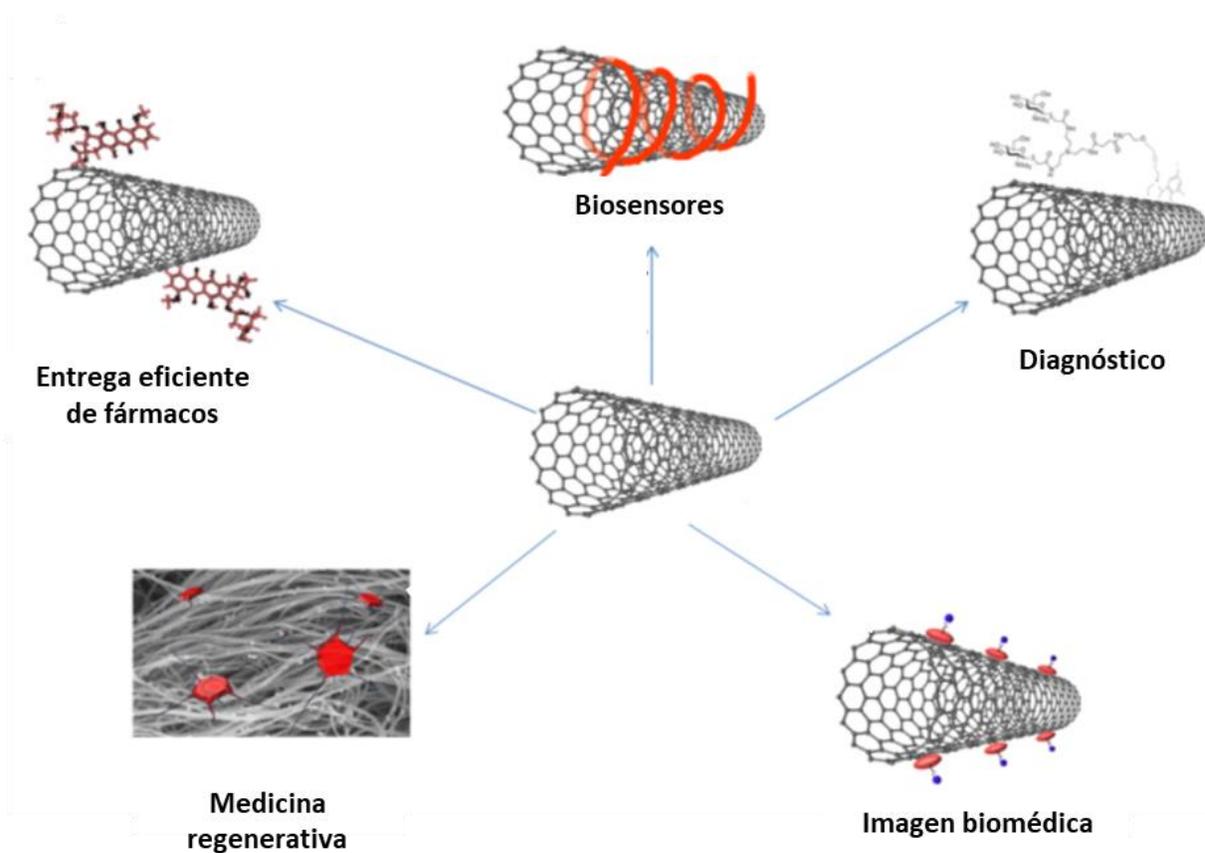


Figura 4. Ilustración esquemática que muestra las diferentes aplicaciones de los nanotubos de carbono. Se incluyen: entrega de fármacos, diagnóstico, biosensores, imagen biomédica, así como ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Modificado de Alshehri et al., 2016.

Los nanotubos de carbono son una forma alotrópica del carbono identificada en 1991 por Iijima, desde entonces han sido ampliamente estudiados y utilizados en una vasta gama de aplicaciones. Se pueden sintetizar mediante diferentes métodos, que incluyen la descarga de arco eléctrico, la ablación con láser y la amplia familia de técnicas de deposición química de vapor (Simon et al., 2019).

Los CNTs se pueden describir como una lámina de grafeno enrollada, a veces cerrada en los extremos por tapas de fullereno (Simon et al., 2019). Los diámetros típicos de los CNTs están en el intervalo de 1 nm a 100 nm, mientras que la longitud puede ser de varios centímetros. Los nanotubos de carbono se clasifican como nanotubos de pared múltiple (MWCNT: *multi-wall carbon nanotube*) y nanotubos de pared simple (SWCNT: *single-wall carbon nanotube*). Un MWCNT se compone de una matriz de cilindros concéntricos de diámetro creciente separados 0.34 nm, mientras que un SWCNT posee la geometría de una sola lámina con un diámetro entre 0.4 nm y 3 nm (Figura 5). Las propiedades materiales de los nanotubos de carbono, incluidas su rigidez y conductividad, tienen una dependencia exclusiva de su estructura atómica, tamaño y geometría. Pueden tener diferentes propiedades físicas, estas dependen de la orientación de los anillos de carbono hexagonales en la estructura de su red atómica (Harik, 2018).

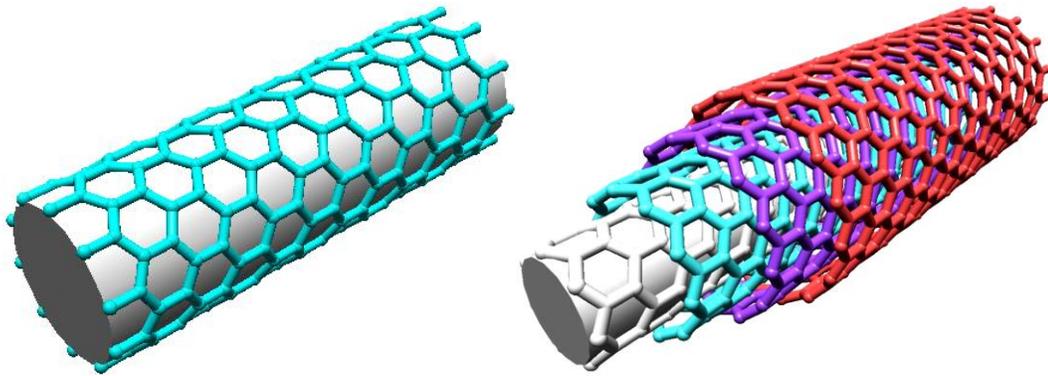


Figura 5. Representación esquemática que muestra la estructura de un SWCNT y un MWCNT, respectivamente.

1.1.3.1 Estructura atómica de los nanotubos de carbono: quiralidad y sus efectos

Al enrollar una lámina de grafeno en un cilindro de modo que el principio y el final de un vector de red (m,n) en el plano del grafeno se unan, se obtiene un nanotubo (m,n) . Los índices (m,n) determinan el diámetro del nanotubo y también la llamada “quiralidad” (la quiralidad es la propiedad de la estructura

atómica de los nanotubos de carbono asociada con una orientación sesgada de los anillos de carbono hexagonales). Los nanotubos con índices (m,m) son tubos *armchair*, ya que los átomos alrededor de la circunferencia están en un patrón de sillón (Figura 6a). Los índices $(m,0)$ identifican a los nanotubos denominados *zigzag* en vista de la configuración atómica a lo largo de la circunferencia (Figura 6b, c). El otro tipo de nanotubos es llamado *quiral*, con filas de hexágonos en espiral a lo largo del eje de los nanotubos (Figura 6d) (Dai, 2002).

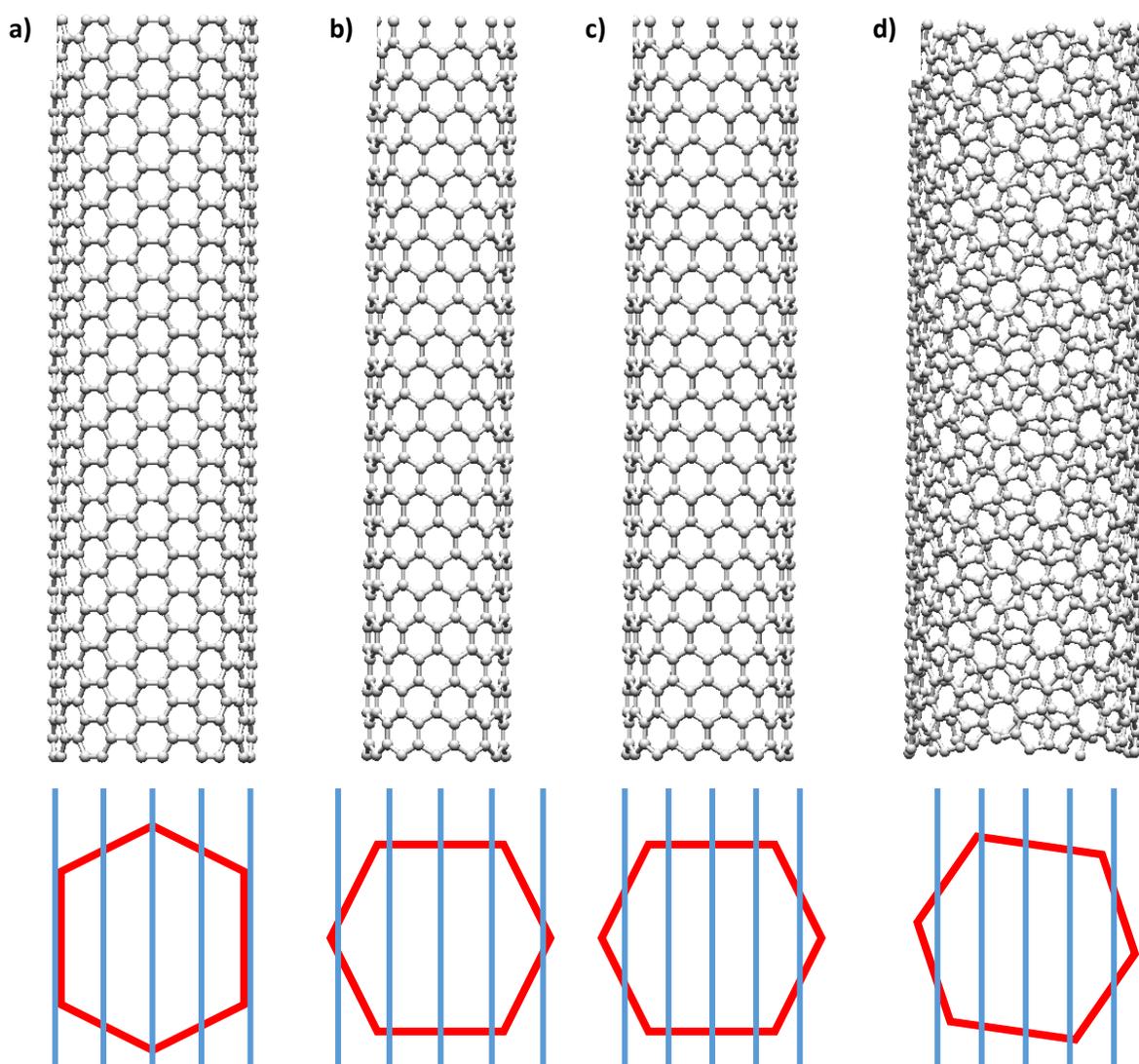


Figura 6. Estructuras esquemáticas de los SWCNT y como determinan sus propiedades electrónicas. **a)** Nanotubo armchair $(10,10)$. Panel inferior: el hexágono representa la primera zona de Brillouin de una hoja de grafeno en el espacio recíproco. Las líneas verticales representan los estados electrónicos del nanotubo. La línea central cruza dos esquinas del hexágono, dando como resultado un nanotubo metálico. **b)** Nanotubo zigzag $(12,0)$. Los estados electrónicos cruzan las esquinas del hexágono, pero se puede desarrollar una pequeña banda prohibida debido a la curvatura del nanotubo. **c)** Nanotubo zigzag $(14,0)$. Semiconductor porque los estados de las líneas verticales pierden los puntos de las esquinas del hexágono. **d)** Nanotubo quirál $(7,16)$. Semiconductor. Esta figura ilustra la extrema sensibilidad de las estructuras electrónicas de nanotubos al diámetro y la quiralidad. Modificado de Dai, 2002.

Como se mencionó anteriormente, la orientación de los anillos de carbono en la estructura de los nanotubos afecta sus propiedades físicas. La red atómica de los SWCNT *armchair* está asociada con las propiedades metálicas de los nanotubos de carbono, por ejemplo, la conductividad eléctrica. La estructura atómica en *zigzag* de los SWCNT está asociada con propiedades de materiales frágiles y semiconductores (Maruyama, 2021).

Los SWCNT tipo *armchair* son metálicos y conductores, mientras que los SWCNT tipo *zigzag* son frágiles y semiconductores. La rigidez y la fuerza de los SWCNT están influenciadas por su quiralidad, es decir, la orientación de su estructura de red atómica. Las propiedades elásticas de los SWCNT metálicos y semiconductores también se ven afectadas por su radio. Los nanotubos de carbono más pequeños tienen un módulo elástico más alto. Los fragmentos pequeños y las capas cortas de los nanotubos de carbono tienen propiedades diferentes a las de sus contrapartes más largas, según su tamaño o la cantidad de anillos de carbono que abarcan su longitud (Harik, 2018).

1.1.3.2 Aplicaciones de los nanotubos de carbono

Como se ha explicado, los nanotubos de carbono son nanomateriales muy prometedores debido a sus extraordinarias propiedades materiales (resistencia y deformación hasta el fallo, alto módulo elástico y conductividad eléctrica). Los SWCNT y los MWCNT también son sistemas unidimensionales críticos que se utilizan para reforzar y modificar las propiedades de los materiales en nanocompuestos con matrices poliméricas, metálicas y cerámicas (Harik, 2018). Los nanotubos de carbono también se pueden usar como sondas a nanoescala para AFM y sensores, debido a su alta rigidez y alta relación de aspecto. Otros ejemplos de aplicaciones basadas en nanotubos de carbono incluyen: transistores, puntos cuánticos, biosondas a nanoescala, biosensores, membranas de polímero mejoradas con nanotubos, sensores de película delgada y nanocompuestos multifuncionales (Harik, 2018). Los sensores y actuadores basados en nanotubos de carbono se pueden utilizar en muchas aplicaciones industriales, instrumentación y dispositivos médicos.

La aplicación de los CNTs en el campo biomédico presenta algunos desafíos. El primero está relacionado con la seguridad e implica el uso de CNTs de muy alta pureza para limitar la posible liberación de iones tóxicos en cualquier entorno biológico. Otros desafíos están más relacionados con cuestiones de formulación, no solo en el campo biomédico, como por ejemplo el poder lograr buenas dispersiones de CNTs en solventes y especialmente en agua es uno de los principales retos técnicos a resolver. Otro desafío

es el típico aumento de la viscosidad relacionado con la dispersión adecuada de CNTs en un fluido, incluso a baja concentración, lo que puede dificultar la preparación de materiales nanocompuestos con una fracción de alto volumen de CNTs bien dispersados (Simon et al., 2019). Sin embargo, con la funcionalización adecuada, los nanotubos de carbono se pueden utilizar para construir sensores de alto rendimiento para aplicaciones prometedoras en diagnósticos y terapias médicas (Y. Yang et al., 2018a).

1.1.3.3 Biosensores basados en nanotubos de carbono

Siendo el diagnóstico temprano un punto clave para un tratamiento eficaz, la mejora de los métodos de detección cobra especial relevancia. Por lo tanto, el desarrollo de dispositivos confiables y económicos que permitan un análisis directo, altamente sensible/selectivo y rápido podría impactar a la humanidad derivando en una mejor calidad de vida. Los biosensores, que combinan un reconocimiento biológico con una transducción química o física, han demostrado ser prometedores en la ventaja de la utilización, y sobre todo la comercialización para satisfacer las demandas actuales (N. Yang et al., 2015).

Debido a las propiedades electrónicas superiores de los CNTs, junto con su tamaño y naturaleza mecánicamente robusta, hacen que estos nanomateriales sean extremadamente atractivos para el desarrollo de plataformas de biodetección de próxima generación (Lawal, 2016; Simon et al., 2019). Hay muchos estudios que han informado sobre el uso de CNTs como sensores de presión, flujo, térmicos, de gas, químicos y biológicos (Sinha y Yeow, 2005). Recientemente, los sensores químicos y biológicos basados en CNTs han generado un considerable interés de investigación. Esto no solo se debe al aumento de la eficiencia de detección del sensor cuando están presentes los CNTs, sino también, a las numerosas formas en que se pueden funcionalizar y conjugar con varias biomoléculas, lo que hace ampliar enormemente la gama de posibles aplicaciones bioquímicas (Sanginario et al., 2017).

En el año 2016, Lawal publicó un estudio exhaustivo de la literatura sobre biosensores electroquímicos basados en CNTs. El autor informa sobre biosensores que adoptan CNTs para la detección de numerosas biomoléculas, como glucosa, hemoglobina, DNA, dopamina, colesterol y otras (Lawal, 2016). En el mismo año, Wang et al. investigaron el uso de CNTs y otros materiales a base de carbono para la fabricación de aptasensores electroquímicos, es decir, sensores cuya transducción la realizan aptámeros. Los biosensores basados en aptámeros han generado un gran interés en la ciencia del análisis, lo que se atribuye principalmente a su alta sensibilidad, selectividad superior, bajo costo, fácil construcción y fácil miniaturización (Z. Wang et al., 2016).

1.1.3.4 Conjugación de nanotubos de carbono con aptámeros

Los aptámeros son las moléculas biológicas con más potencial para modificaciones de CNTs, además, pueden unirse fácilmente a los nanotubos de carbono a través de interacciones covalentes y no covalentes (Mehra et al., 2014). Los biosensores basados en aptámeros exhiben ventajas sobresalientes en términos de alta sensibilidad, selectividad superior, respuesta rápida, bajo costo y potencial de miniaturización.

Como se mencionó anteriormente, para lograr el reconocimiento o la detección molecular específica en la mayoría de los casos se requiere la funcionalización de la superficie. Los métodos de funcionalización covalente pueden deteriorar significativamente la estructura híbrida tipo sp^2 de la red hexagonal de carbono e inducir la formación de defectos socavando así, las propiedades electrónicas. La funcionalización covalente del aptámero de ácido nucleico en los nanomateriales de carbono a menudo se produce mediante la formación de enlaces amida (Y. Yang et al., 2018b). En un ejemplo característico, Zelada-Guillén, G. A. et al. diseñaron un biosensor potenciométrico para la detección selectiva y en tiempo real de *Salmonella Typhi*. El aptámero de ácido nucleico con un grupo amina se combinó covalentemente con los SWNT carboxilados mediante la formación de enlaces amida (Y. Yang et al., 2018b).

El enfoque de funcionalización no covalente no interrumpe la estructura intrínseca, ni las propiedades mecánicas y electrónicas de los nanomateriales de carbono. Las fuerzas impulsoras para la funcionalización no covalente de nanomateriales de carbono con moléculas orgánicas o polímeros involucran las interacciones tipo π , las fuerza de van der Waals, los complejos de donador–aceptor de electrones, la interacción iónica y los enlaces de hidrógeno (Y. Yang et al., 2018a).

1.1.4 Modelado molecular

El modelado molecular es la ciencia y el arte de estudiar la estructura y función molecular a través de la construcción y el cálculo de modelos (Schlick, 2010). El campo del modelado es relativamente joven, comenzó en la década de 1960 y solo ganó impulso desde mediados de la década de 1980 con la llegada de las supercomputadoras. La construcción de modelos puede ser tan simple o tan sofisticada como se requiera. Los cálculos abarcan mecánica molecular, mecánica cuántica *ab initio* y semi–empírica, mecánica empírica, dinámica molecular, Monte Carlo, energía libre y métodos de solvatación, relaciones estructura/actividad (SAR), información y bases de datos químicas/bioquímicas y muchos otros procedimientos establecidos (Schlick, 2002). Aunque los modelos representan una versión muy

simplificada, los estudios sistemáticos basados en herramientas cuantitativas manejables pueden ayudar a discernir patrones y agregar conocimiento que de otro modo sería difícil de observar (Cohen et al., 2002). La clave en el modelado es desarrollar y aplicar modelos que sean apropiados para las preguntas que se examinan con ellos.

A lo largo de los años, el modelado molecular y la simulación de biomoléculas se ha convertido en una herramienta importante en las biociencias moleculares. El modelado molecular es utilizado cada vez más por científicos interesados en investigar problemas biológicos y ya es prácticamente obligatorio en las publicaciones científicas. Este desarrollo se ha visto respaldado por hardware mejorado, como procesadores multinúcleo o unidades de procesamiento gráfico, por un lado, y algoritmos de muestreo acelerado, por otro lado, que aumentan la escala de tiempo sin aumentar las demandas en el hardware o el tiempo de cálculo (Kukol, 2014).

1.1.4.1 Simulaciones de dinámica molecular

En los últimos años, las vistas estáticas de las moléculas se han ampliado considerablemente para incluir nuevas perspectivas introducidas por la dinámica molecular (DM). Las estructuras cristalinas de rayos X representan una estructura promediada en el tiempo de un sistema en movimiento continuo, mientras que la dinámica molecular simula el movimiento instantáneo real del sistema. Cada átomo se trata como una partícula que responde a las ecuaciones de movimiento de Newton, las integraciones sucesivas de estas ecuaciones conducen a la trayectoria del átomo a lo largo del tiempo en forma de una lista de posiciones y velocidades (Cohen et al., 2002). Las simulaciones DM, que representan la interfaz entre la teoría y el experimento, ocupan una posición importante en la encrucijada de las matemáticas, la biología, la química, la física y la informática (Schlick, 2002).

Siguiendo la dinámica de un sistema molecular en el espacio y el tiempo, se puede obtener una gran cantidad de información sobre sus propiedades estructurales y dinámicas. Dicha información incluye geometrías y energías moleculares, fluctuaciones atómicas medias, fluctuaciones locales, tasas de cambios de conformación, unión enzima–sustrato, energías libres y la naturaleza de varios tipos de mociones concertadas (Schlick, 2002).

Como se mencionó brevemente, las simulaciones de dinámica molecular se basan en la física newtoniana para simular movimientos atómicos. El proceso general de aproximación utilizado se describe en la Figura

7. En primer lugar, se prepara un modelo informático del sistema molecular a partir de datos de modelado por homología, cristalográficos o de resonancia magnética nuclear (RMN) (Durrant y McCammon, 2011).

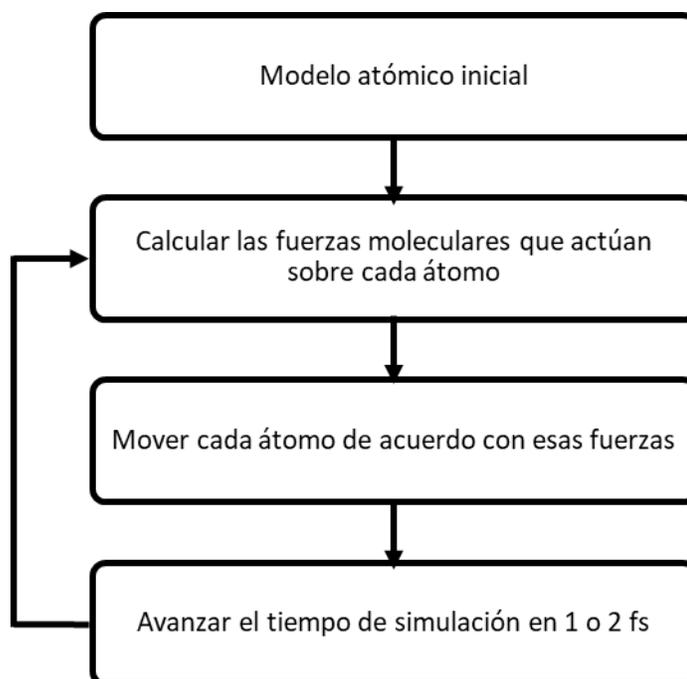


Figura 7. Esquema que muestra cómo se realiza una simulación de dinámica molecular. En primer lugar, se prepara un modelo informático del sistema. Se utiliza una ecuación como la que se muestra en la Figura 8 para estimar las fuerzas que actúan sobre cada uno de los átomos del sistema. Las posiciones de los átomos se mueven de acuerdo con las leyes de movimiento de Newton. El tiempo de simulación se adelanta y el proceso se repite múltiples veces. Modificado de Durrant y McCammon, 2011.

De manera general, contribuyen las fuerzas que surgen de las interacciones entre átomos enlazados y no enlazados (Figura 8). Los enlaces químicos y los ángulos atómicos se modelan usando resortes virtuales simples, y los ángulos diédricos (rotaciones alrededor de un enlace) se modelan con una función sinusoidal que aproxima las diferencias de energía entre conformaciones eclipsadas y escalonadas. Las fuerzas no enlazadas surgen debido a las interacciones de van der Waals, modeladas con el potencial de Lennard–Jones 6–12, y las interacciones electrostáticas, modeladas con la ley de Coulomb (Bayly et al., 2002; Karplus y Petsko, 1990).

Para reproducir el comportamiento real de las moléculas en movimiento, los términos de energía descritos anteriormente se parametrizan para que se ajusten a los cálculos de mecánica cuántica y los datos experimentales. Esta parametrización incluye identificar la rigidez y las longitudes ideales de los resortes que describen los enlaces químicos y los ángulos atómicos, determinar las mejores cargas atómicas

parciales utilizadas para calcular las energías de interacción electrostática, identificar los radios atómicos de van der Waals adecuados, etc. En conjunto, estos parámetros se denominan “campo de fuerza” porque describen las contribuciones de las diversas fuerzas atómicas que gobiernan la dinámica molecular (Durrant y McCammon, 2011). Varios campos de fuerza se usan comúnmente en simulaciones de dinámica molecular, incluidos AMBER (J. Wang et al., 2004), CHARMM (Brooks et al., 1983) y GROMOS (Christen et al., 2005). Difieren principalmente en la forma en que se parametrizan, pero generalmente dan resultados similares.

$$E_{total} = \sum_{enlaces} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{ángulos} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{diedros} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

The diagram illustrates the components of the total energy equation. It is divided into two main categories: 'Enlazantes' (bonded) and 'No enlazantes' (non-bonded).
 - **Enlazantes:** This section includes three terms: $\sum_{enlaces} K_r (r - r_{eq})^2$ (bond stretching), $\sum_{ángulos} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2$ (angle bending), and $\sum_{diedros} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)]$ (dihedral rotation). Below these terms are three diagrams: a bond with length r , an angle θ between two bonds, and a dihedral angle ϕ between two bonds.
 - **No enlazantes:** This section includes the electrostatic and van der Waals interaction term: $\sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$. Below this term is a diagram showing two atoms with charges q_i and q_j separated by a distance R_{ij} , with a plus sign and a minus sign indicating opposite charges.

Figura 8. Ejemplo de una ecuación utilizada para aproximar las fuerzas atómicas que gobiernan el movimiento molecular. Las fuerzas atómicas que gobiernan el movimiento molecular se pueden dividir en aquellas causadas por interacciones entre átomos que están químicamente enlazados entre sí y aquellas causadas por interacciones entre átomos que no están enlazados. Modificado de Durrant y McCammon, 2011.

Una vez que se han calculado las fuerzas que actúan sobre cada uno de los átomos del sistema, las posiciones de estos átomos se mueven de acuerdo con las leyes de movimiento de Newton. Luego, el tiempo de simulación avanza y el proceso se repite, generalmente millones de veces. Debido a que se requieren tantos cálculos, las simulaciones de dinámica molecular generalmente se realizan en grupos de computadoras o supercomputadoras (Christen et al., 2005).

1.2 Justificación

El cáncer de cuello uterino es una enfermedad neoplásica común que afecta a las mujeres en todo el mundo. La expresión de los genes de las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano se asocian con el cáncer de cuello uterino, lo que representa dianas ideales para las estrategias diagnósticas y

terapéuticas. A pesar de la disponibilidad de una vacuna preventiva para la infección por VPH, sigue existiendo una necesidad importante de desarrollar herramientas de diagnóstico que estén específicamente asociadas con la carcinogénesis del VPH en lugar de simplemente con la infección. Los aptámeros son ligantes de oligonucleótidos capaces de unirse con alta afinidad y especificidad a marcadores relevantes en terapias y detección de enfermedades; esta afinidad y especificidad guiada hacia las principales oncoproteínas del VPH se pueden utilizar para la detección de la infección por el virus y, por ende, del cáncer de cuello uterino.

El experimento juega un papel central en la ciencia; es la riqueza de los resultados experimentales lo que proporciona una base para la comprensión de la maquinaria de la vida. Sin embargo, las técnicas de modelado molecular han alterado la interacción entre la teoría y el experimento. En este sentido el modelado molecular ha adquirido un papel cada vez más importante en las ciencias bioquímicas y biomoleculares porque permite imitar y estudiar la estructura y el comportamiento de las moléculas, que van desde pequeños sistemas químicos hasta grandes moléculas biológicas y ensamblajes de materiales. La ventaja crucial es la capacidad de expandir el horizonte de complejidad de los fenómenos que se quieran estudiar, además, probar las propiedades de una molécula o sistema utilizando modelos es más rápido y menos costoso que sintetizarlos y caracterizarlos en un experimento real.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como propósito estudiar los cambios conformacionales de un aptámero desarrollado específicamente para reconocer la proteína E7 del VPH en su interacción con nanotubos de carbono, ya que esto constituye el primer paso hacia el diseño de plataformas de detección más precisas, económicas y resistentes contra el cáncer de cuello uterino, la principal causa de muerte por cáncer en el mundo subdesarrollado.

1.3 Hipótesis

Diferentes funcionalizaciones en los nanotubos de carbono, estudiadas por modelado molecular, afectan el estado conformacional de un aptámero con especificidad de unión a la oncoproteína E7 del Virus del Papiloma Humano.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Caracterizar los cambios conformacionales del aptámero conjugado con nanotubos de carbono funcionalizados a través de métodos computacionales.

1.4.2 Objetivos específicos

- Construir los modelos estructurales de los nanotubos de carbono con diferentes funcionalizaciones.
- Conjugar el aptámero con los nanotubos de carbono funcionalizados.
- Obtener la dinámica molecular del aptámero en su forma libre, así como conjugado con los nanotubos de carbono.
- Analizar los resultados de las dinámicas moleculares de cada conjugado.

Capítulo 2. Metodología

En este capítulo se presenta la metodología empleada haciendo hincapié en cada uno de los objetivos planteados. El esquema de la Figura 9 traza el flujo para el desarrollo de este trabajo. Los cálculos de simulación de dinámica molecular se realizaron en GPUs del clúster de supercomputo Miztli de la UNAM.

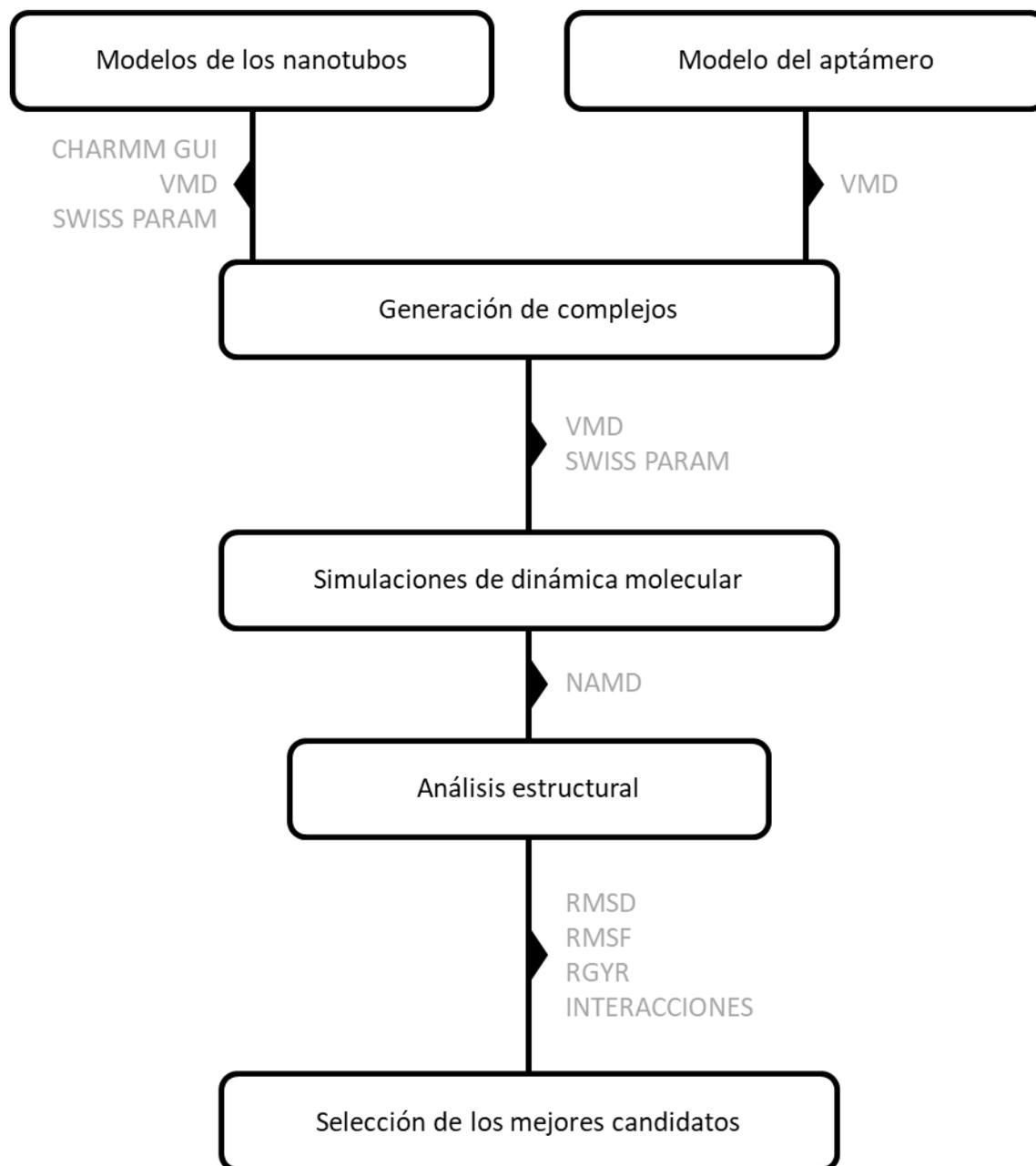


Figura 9. Metodología empleada para estudiar los cambios conformacionales del aptámero conjugado con diferentes nanotubos de carbono funcionalizados. Se hace referencia a las principales herramientas utilizadas en cada paso.

2.1 Modelos estructurales

2.1.1 Modelado de los nanotubos de carbono

El modelo estructural del nanotubo de carbono se construyó con ayuda de la plataforma web CHARMM GUI utilizando el módulo “Nanomaterial Modeler” (Y. K. Choi et al., 2022) que ayuda a construir estructuras de nanomateriales para simulaciones de DM. Se creó un nanotubo de carbono con una estructura atómica tipo *armchair* de índices quirales (10,10), con una longitud igual a 98.4 Å y un diámetro de 13.6 Å (Figura 10).

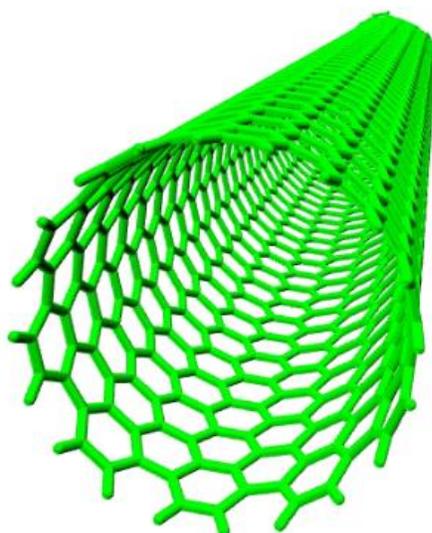


Figura 10. Representación del nanotubo de carbono tipo armchair creado con CHARMM GUI.

Se realizó la funcionalización de los nanotubos de carbono con un grupo carboxilo desprotonado en el borde para más adelante poder llevar a cabo la conjugación covalente de ambas estructuras mediante la formación de un enlace amida. Además de dicha funcionalización, se construyeron 5 modelos con diferentes funcionalizaciones para estudiar sus efectos en el aptámero:

1. CNT: nanotubo de carbono
2. CNT_COO: nanotubo de carbono con grupo carboxilato

3. CNT_O: nanotubo de carbono con grupo epoxido
4. CNT_OH: nanotubo de carbono con grupo hidroxilo
5. CNT_OOH: nanotubo de carbono con grupo epoxido y grupo hidroxilo

Para agregar los diferentes grupos funcionales a la estructura de los nanotubos de carbono se usó el complemento “Molefactory” de VMD (Molefactory Plugin, Version 2.0, 2019) que proporciona una interfaz para crear y editar moléculas (agregar, eliminar o manipular su estructura a nivel atómico), además, proporciona una serie de opciones para la construcción y la tipificación de átomos de las nuevas moléculas donde se asigna la topología de la molécula que se está editando. “Molefactory” prepara estructuras para ser simuladas por medio del uso del campo de fuerza CHARMM36. Se minimizaron las estructuras donde “Molefactory” invoca al minimizador NAMD usando el mismo campo de fuerza.

2.1.2 Modelado del aptámero

El modelo estructural del aptámero fue proporcionado por el alumno de maestría y compañero Luis Vargas, quien en su proyecto de tesis se dedicó a modelar varios aptámeros de acuerdo con la literatura (Graham y Zarbl, 2012; Nicol et al., 2013; Toscano-Garibay et al., 2011) y estudiar su interacción con la oncoproteína E7 del VPH.

La predicción de la estructura terciaria del aptámero se realizó con ayuda del software gratuito SimRNA. SimRNA utiliza una representación simplificada de grano grueso para la caracterización de nucleótidos, una semi-función de energía basada en cálculos probabilísticos depositados en diversas bases de datos, un esquema de simulación Monte Carlo para el muestreo del espacio conformacional y un potencial estadístico para describir las interacciones en el proceso de plegamiento (Magnus et al., 2016). Posteriormente se llevó a cabo un refinamiento de la estructura tridimensional mediante DM.

2.2 Generación de los complejos aptámero–nanotubo

La elección de la estrategia de inmovilización del aptámero depende de qué tipos de grupos funcionales terminales estén disponibles. Los tres grupos más comunes empleados para la unión a la superficie son

hidroxilo, amina y ácido carboxílico. El diseño del aptámero para su inmovilización superficial muchas veces incluye un grupo conector enlazado al grupo funcional terminal, la función del conector es unir covalentemente al aptámero con los grupos superficiales del CNT, y así promover que los analitos objetivos se unan al sitio de unión del aptámero. En todos los casos, el conector incorporó un grupo alquilo unido directamente al grupo funcional terminal, el grupo alquilo más utilizado es un conector hexametileno [$-(CH_2)_6-$] (Balamurugan et al., 2008b).

Conforme a lo anterior, con la ayuda del complemento “Molefactory” de VMD se construyó un conector hexametileno enlazado a un grupo amina (Figura 11). Se asignó la topología a la molécula y se minimizó donde “Molefactory” invoca al minimizador de NAMD.

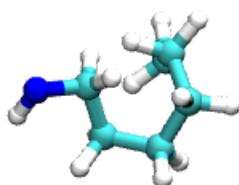


Figura 11. Representación del conector hexametileno con un grupo amina terminal, creado con “Molefactory” de VMD.

Una vez listos los archivos de coordenadas y topología de los CNTs, el aptámero y el conector (Figura 12) se continuó con la conjugación para formar los complejos aptámero–CNT. Se utilizó el complemento “Merge Structures” de VMD (MergeStructs Plugin, Version 1.1, 2011). “Merge Structures” es una herramienta que permite combinar dos estructuras, cada una definida por un archivo PDB y un archivo PSF, en un solo par de archivos PDB/PSF. Se conservan los enlaces existentes en las dos estructuras, pero no se crean enlaces nuevos entre los átomos de las estructuras combinadas.

Para la creación del enlace entre el conector y el aptámero, y de estos con el CNT, se utilizó el complemento “TopoTools” de VMD (TopoTools Plugin, Version 1.8, 2020). “TopoTools” es un complemento para manipular información de topología. Es un instrumento muy optimizado que permite construir topologías para biomoléculas, además, tiene una serie de herramientas de alto nivel que permiten la lectura y escritura de formatos de archivo de topología y para generar archivos de entrada necesarios para simulaciones de dinámica molecular. El conector se puede unir en el extremo 5’ o en el extremo 3’, en la literatura se ha informado que ambas posiciones se han utilizado para el desarrollo de sensores (Balamurugan et al., 2008a). En este caso la unión se realizó en el extremo 5’ del aptámero.

Finalmente, se llevó a cabo un ciclo de 20 000 pasos de minimización que derivaron en la modificación de las coordenadas de los átomos desplazando al sistema hacia un mínimo local de energía.

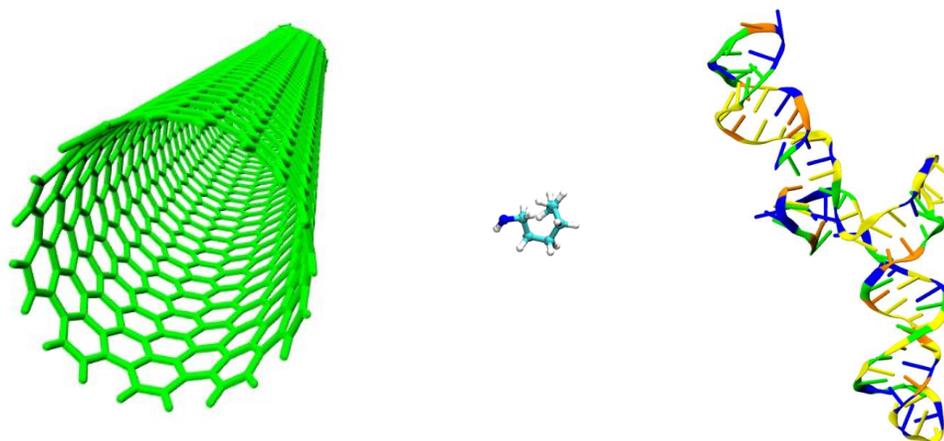


Figura 12. Representación del nanotubo de carbono, conector y aptámero.

2.3 Simulaciones de dinámica molecular

La DM permite generar una trayectoria de puntos que evolucionan con el tiempo al seguir la segunda ley de Newton. Se trata de un método determinista, es decir, el estado de un punto de la trayectoria permite predecir el estado del siguiente, en consecuencia, es posible estudiar los cambios conformacionales de los modelos bajo condiciones dadas de temperatura, solvente, iones, entre otras. Para cada caso los ensayos de simulación de DM fueron realizados con el software NAMD 2.14 (J. C. Phillips et al., 2020), con el protocolo que se describe a continuación.

2.3.1 Preparación de los sistemas

Para llevar a cabo las simulaciones de DM se prepararon los sistemas con NAMD, los cuales están descritos por los siguientes dos archivos:

- Archivo PDB: contiene las coordenadas de los átomos del sistema.

- Archivo PSF: contiene los parámetros del campo de fuerza, información sobre la topología del sistema y propiedades de los átomos (carga, masa, tipo de átomo).

Así mismo, es necesario un archivo de parámetros del campo de fuerza que define las fuerzas de unión, longitudes de equilibrio, etc. Los parámetros de los sistemas se describieron con el campo de fuerza CHARMM36 porque es uno de los campos de fuerza más comúnmente utilizados para simular CNTs y, además, es uno de los más exitosos en el estudio de biomoléculas (Alexiadis y Kassinos, 2008; Zhu et al., 2012). También se requiere un archivo de configuración en el que se especifican todas las opciones que NAMD debe adoptar al ejecutar una simulación. El archivo de configuración le define a NAMD cómo se ejecutará la simulación.

Se solvataron los sistemas utilizando el complemento “Solvate” de VMD (Solvate Plugin, Version 1.5, 2012) en una caja de agua (modelo TIP3P) cuyas dimensiones fueron 15 Å más allá del último átomo del complejo en los tres ejes. El sistema fue neutralizado añadiendo una concentración de 0.15mol/L de iones de Cl⁻ o Na⁺ (según sea el caso) todo esto utilizando el complemento “Autoionize” de VMD (Autoionize Plugin, Version 1.5, 2017). Como resultado se obtuvieron los archivos PDB/PSF que representan a los sistemas, la Tabla 2 enlista la nomenclatura de los sistemas, así como el número total de átomos de cada uno.

Tabla 2. Nomenclatura de cada sistema, descripción y número de átomos.

Sistema	Descripción	Número de átomos
APT	Aptámero libre	105 376
APT@CNT	Aptámero en complejo con nanotubo de carbono prístino	154 767
APT@CNT_COO	Aptámero en complejo con nanotubo de carbono con grupo carboxilato	152 153
APT@CNT_O	Aptámero en complejo con nanotubo de carbono con grupo epoxido	156 492
APT@CNT_OH	Aptámero en complejo con nanotubo de carbono con grupo hidroxilo	154 489
APT@CNT_OOH	Aptámero en complejo con nanotubo de carbono con grupo hidroxilo y epoxido	154 484

2.3.2 Minimización, *simulated annealing* y equilibrado

Cualquier ejecución de dinámica molecular consta de cuatro pasos importantes:

1. Minimización: para liberar el exceso de tensión. Relaja el sistema y elimina cualquier choque estérico o geometría inusual que podría elevar artificialmente la energía.

2. Calentamiento: para elevar la temperatura del sistema a la temperatura a la que se desea realizar la simulación.
3. Equilibrado: para equilibrar el sistema antes de que se puedan medir las propiedades.
4. Producción: el paso de salida útil que arroja información sobre el sistema que se está estudiando.

Primero, es necesario que el sistema sea estable o que esté al mínimo de energía, esto se lleva a cabo en el paso de minimización utilizando alguno de los algoritmos más conocidos como lo son el método de gradiente conjugado o el método del descenso más pronunciado. Dado la función que cumple este paso de minimización se lleva a cabo a 0 K, por lo que el siguiente paso es calentar el sistema a la temperatura especificada (en algunos casos el sistema es calentado a una temperatura superior a la temperatura de trabajo, y luego se vuelve a enfriar en un ciclo llamado *simulated annealing*). El siguiente paso es el equilibrado para finalmente dar lugar a la producción. Los valores obtenidos aquí se utilizan para obtener información útil sobre el sistema y para analizar los resultados de los cálculos.

La minimización de la energía potencial del sistema fue llevada a cabo mediante un proceso de 20 000 ciclos utilizando el algoritmo del gradiente conjugado. El método de gradientes conjugados se usa para seleccionar direcciones de búsqueda sucesivas (comenzando con el gradiente inicial) que eliminan la minimización repetida a lo largo de las mismas direcciones. A lo largo de cada dirección, primero se pone un mínimo entre paréntesis (rigurosamente delimitado) y luego se converge mediante una búsqueda de sección o, cuando es posible, un método de convergencia cuadrática utilizando información de gradiente.

Posteriormente, se empleó el método de *Simulated Annealing* (SA) para relajar el sistema y favorecer su equilibrio termodinámico a 300 K. El protocolo de SA fue el que indica a continuación:

- Calentamiento de 0 K a 400 K en un lapso de 0.1 ns
- Mantenimiento a 400 K por 0.1 ns
- Enfriamiento de 400 K a 300 K en 0.2 ns
- Mantenimiento a 300 K por 0.6 ns

Finamente, se llevó a cabo una fase de equilibrado de 5 ns a 300 K.

El tipo de simulación utilizado durante el SA y el equilibrado fue de un colectivo NVT con condiciones de frontera periódicas. Se empleó el método *Langenvin dynamics* como termostato, y el tiempo de integración utilizado fue de 1 fs por paso para el calentamiento y 2 fs por paso para el equilibrado. Como resultado se obtuvo un archivo *restart* con las coordenadas finales de los átomos y sus velocidades.

2.3.3 Simulaciones de dinámica molecular

Una vez que el sistema ha sido preparado, optimizado y las velocidades han sido asignadas, comienza la simulación propiamente dicha. Para ello se utilizó el archivo *restart* que posee las coordenadas de los átomos y sus velocidades correspondientes al último paso del equilibrado.

El intervalo de integración utilizado fue de 2 fs, y se utilizó un colectivo NPT manteniendo la temperatura del sistema a $T \approx 300$ K, y la presión a $P \approx 1$ atm. El tiempo total de simulación fue de 100 ns. Como resultado se obtuvo un archivo de trayectoria *dcd* con las coordenadas de los átomos de cada una de las conformaciones (*frames*) correspondientes a la dinámica del sistema.

2.4 Análisis de trayectorias de dinámica molecular

Las simulaciones de DM arrojan datos muy complejos. Las posiciones cartesianas de cada átomo del sistema se registran en cada paso de tiempo de la trayectoria, por lo tanto, se necesita algún tipo de análisis adicional para extraer información útil de los datos.

El análisis de trayectorias de las simulaciones de DM se llevó a cabo utilizando el programa de visualización molecular VMD 1.9.4 (*Visual Molecular Dynamics*). VMD es un programa de gráficos moleculares diseñado para la visualización y el análisis de ensamblajes moleculares, en particular biopolímeros como proteínas y ácidos nucleicos (Humphrey et al., 1996). También se utilizó el paquete Bio3D que contiene utilidades para procesar, organizar y explorar datos de estructura y secuencia implementado en lenguaje de programación R (Grant et al., 2006). Así mismo se utilizó pytraj que es un paquete de Python vinculado al popular programa cpptraj. Está escrito para extender la flexibilidad de cpptraj y exponer la funcionalidad de cpptraj al ecosistema de Python (Roe y Cheatham, 2013).

2.4.1 RMSD: *Root Mean Square Deviation*

Para el análisis estructural se utilizó la medida RMSD, la cual mide la distancia media entre los átomos de dos estructuras moleculares previamente superpuestas. Si se calcula el RMSD entre dos conjuntos de coordenadas atómicas, el valor es una medida de cuánto ha cambiado la conformación del aptámero. En este caso, se consideraron únicamente los átomos del *backbone* (compuesto por grupos alternantes del azúcar y fosfato) del ácido nucleico, y se evaluó cada *frame* t a lo largo del tiempo de la trayectoria frente al *frame* de referencia $t = 0$, el cual corresponde a la estructura nativa del aptámero. La ecuación es la siguiente:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{\text{átomos}}} (r_i(t) - r_i(0))^2}{N_{\text{átomos}}}} \quad (1)$$

Donde *RMSD* es el valor en Å entre una estructura en el instante t y una estructura de referencia en el instante t' (usualmente 0). $N_{\text{átomos}}$ es el número de átomos en el aptámero; $r_i(t)$ y $r_i(0)$ son los vectores de coordenadas del átomo i en los *frames* t y 0 , respectivamente.

2.4.2 RMSF: *Root Mean Square Fluctuation*

Posteriormente, para evaluar la flexibilidad estructural por residuo del aptámero se utilizó la medida RMSF, la cual sigue un principio similar al del RMSD con la diferencia de que se evalúa de forma independiente para cada fosfato (PO^{2-}) de cada residuo del RNA, y de que la estructura de referencia es la media de todas las coordenadas (x, y, z) que dicho átomo tiene a lo largo de una trayectoria. Por lo tanto, el RMSF analiza las partes de la estructura que fluctúan más (o menos) con respecto a su estructura media. La ecuación es la siguiente:

$$\text{RMSF}_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^T ((\alpha_{ij} - \bar{\alpha}))^2}{T}} \quad (2)$$

Con:

$$\bar{\alpha} = \frac{\sum_{i=1}^T \alpha_i}{T} \quad (3)$$

Donde $RMSF_j$ es el valor de RMSF en Å del PO^{2-} de un residuo j del aptámero. T es el número de *frames* en la trayectoria; α_j es el vector de coordenadas de α en el *frame* i del residuo j ; y $\bar{\alpha}$ es el vector de la media de las coordenadas de α en el residuo j tomando en cuenta todos los *frames*.

2.4.3 Radio de Giro

Para tener una medida aproximada del grado de compactación de una estructura, se puede calcular el radio de giro. El radio de giro se define como el promedio cuadrático medio de la distancia de todos los átomos desde el centro de masa de la molécula. La ecuación es la siguiente:

$$RGYR = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (r(i) - r_{centro})^2}{N}} \quad (4)$$

Donde N es el número de átomos en el aptámero, $r(i)$ son las coordenadas del átomo i y r_{centro} las coordenadas del centro de masa.

2.4.4 Contactos atómicos aptámero–CNT

Las interacciones moleculares resultan de contactos atómicos cercanos. La afinidad de las regiones moleculares entre sí y con otras estructuras puede medirse por el recuento de contactos. Los contactos se definen típicamente usando un *cutoff* en la distancia entre átomos, un valor típico es 4.5 Å. Los recuentos acumulativos de contactos atómicos, independientemente de las moléculas específicas que interactúan, proporcionan la afinidad de un contacto. El análisis de los contactos más frecuentes solo requiere una cantidad suficiente de “tomas” distribuidas en un intervalo de tiempo suficiente para muestrear todos los contactos posibles (Fogolari et al., 2012). Aquí, un contacto se define cuando la distancia entre un átomo del aptámero y un átomo del CNT es ≤ 4 Å.

2.4.4.1 Interacciones tipo π

En química, las interacciones de apilamiento π – π son un tipo de interacción no covalente y se refieren específicamente a las interacciones que involucran grupos aromáticos que contienen enlaces π . De

acuerdo con la geometría de las interacciones aromáticas, las interacciones π se dividen en las siguientes tres categorías (Figura 13):

- Apilamiento borde–cara (en forma de T) (*Edge-to-face stacked*)
- Apilamiento compensado (*offset stacked*)
- Apilamiento cara–superficie (*face-to-face stacked*)

Varios estudios han confirmado que el apilamiento borde–cara y el apilamiento compensado son energéticamente superiores al apilamiento cara–superficie entre los grupos aromáticos (Zhuang et al., 2019). La distancia característica entre centroides de dos estructuras completamente paralelas es de aproximadamente 3.5 Å (Gowtham et al., 2007), mientras que en un acoplamiento borde–cara la distancia entre los centros de masa es de 4.96 Å (Chen et al., 2018)

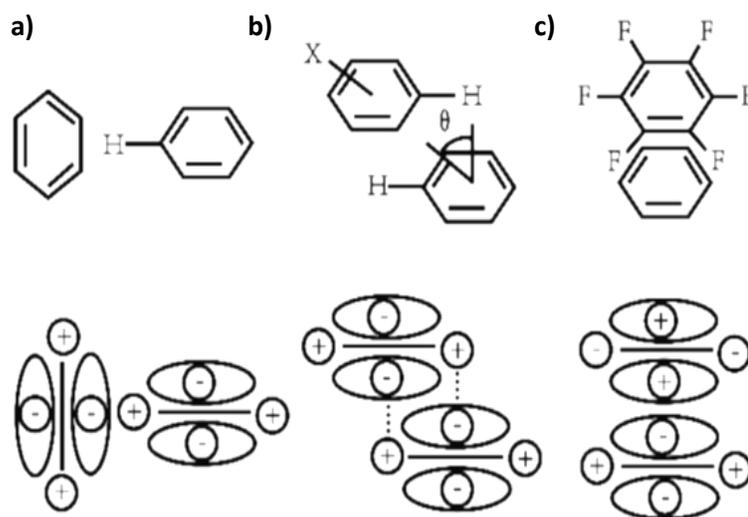


Figura 13. Representación esquemática de diferentes configuraciones geométricas de interacciones entre anillos aromáticos. **a)** Acoplamiento borde–cara. **b)** Acoplamiento compensado. **c)** Acoplamiento cara–superficie. Tomado de Zhuang et al., 2019.

2.4.4.2 Enlaces de hidrógeno

Los enlaces de hidrógeno constituyen un tipo único de interacción interatómica, con energías típicamente en el intervalo de 2 a 10 kcal/mol. Estos valores son intermedios entre los enlaces covalentes y las

interacciones débiles, como las fuerzas de van der Waals. La energía pequeña pero significativa del enlace de hidrógeno permite su formación y ruptura bajo una amplia gama de temperaturas y condiciones fisiológicas (Martin y Derewenda, 1999). Esta fuerza los hace bastante resistentes a la disrupción térmica, además, estas interacciones son tanto de corto alcance como dependientes del ángulo. Esta combinación de fuerza, direccionalidad y corto rango de influencia permite que los enlaces de hidrógeno desempeñen un papel importante en la estructuración de diversas moléculas que contienen grupos de enlaces de hidrógeno.

Un enlace de hidrógeno se forma entre un átomo con un hidrógeno unido a él (el donante, D) y otro átomo (el aceptor, A) siempre que la distancia D–A sea menor que la distancia de la suma de los radios de van der Waals de los átomos A y D. Para el cálculo de los enlaces de hidrógeno se utilizó el complemento “Hbonds” de VMD (HBonds Plugin, Version 1.2, 2021) que cuenta el número de enlaces de hidrógeno formados a lo largo de una trayectoria, la búsqueda se puede restringir a una sola selección o entre dos selecciones distintas, así como a un rango de la trayectoria dado. Aquí se aplicó el límite de distancia de 3.5 Å y un límite de ángulo de 180° para decidir si los átomos involucrados están lo suficientemente cerca para formar un enlace de hidrógeno. Se eligió este límite porque es aproximadamente la suma de los radios de Van de Waals de dos átomos pesados en un enlace de hidrógeno común (N–N, N–O u O–O) (Liu et al., 2008).

Capítulo 3. Resultados y discusiones

3.1 Minimización, *simulated annealing* y equilibrado

Los resultados de las fases de minimización, SA y equilibrado fueron evaluados para cada experimento. En la Figura 14a se muestra que la energía potencial inicial del sistema llegó a descender hasta -216 503.6717 kcal/mol tras 20 000 ciclos de minimización.

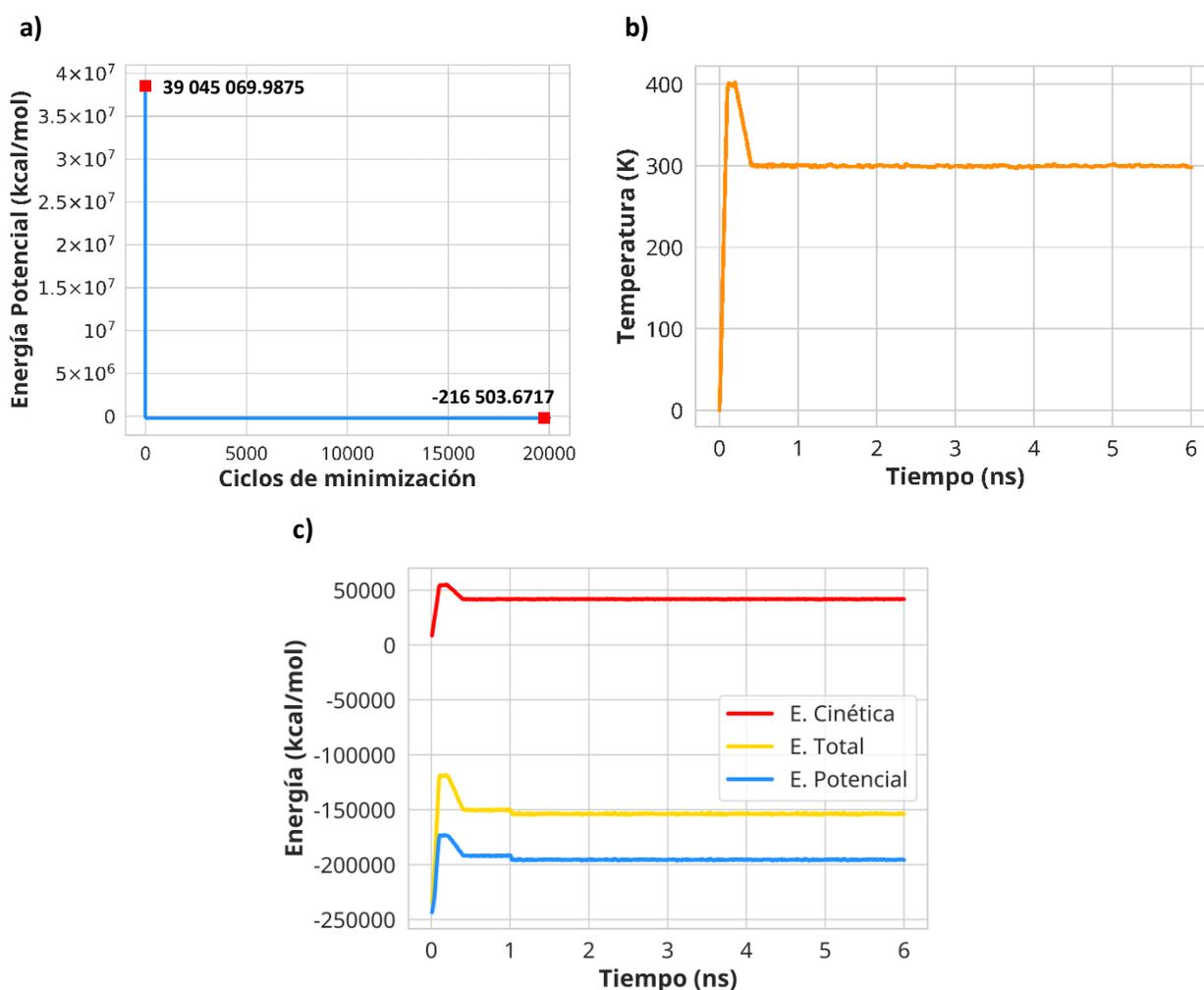


Figura 14. Minimización, *simulated annealing* y equilibrado del sistema aptámero. **a)** Descenso en la energía potencial del sistema tras 20 000 ciclos de minimización. **b)** Temperatura del sistema durante el proceso de SA y equilibrado. **c)** Valores de energía Cinética (rojo), Potencial (azul) y Total (amarillo) del sistema durante el SA y equilibrado.

La Figura 14b y c muestra la variación en la temperatura y las energías del sistema a lo largo de los 6 ns de simulación correspondientes a la fase de SA (1 ns) y equilibrado (5 ns). El tiempo transcurrido durante el equilibrado muestra la estabilidad del sistema a una temperatura promedio de 299.45 K.

3.2 Producción de dinámica molecular

Las propiedades físicas del sistema fueron evaluadas en la fase de producción de dinámica molecular. Los valores de energía potencial, energía cinética, energía total, temperatura, volumen y presión fueron registrados cada 2 fs a lo largo de los 150 ns de simulación. La Figura 15 muestra como ejemplo los resultados del ensayo del sistema aptámero. Se puede observar que las propiedades evaluadas se mantuvieron cerca de los valores esperados: la temperatura se mantuvo estable y próxima a los 308 K (Figura 15d), el volumen mostró un valor medio de $598\,375.587\text{ \AA}^3$ con una variación de $1\,321.316\text{ \AA}^3$ (Figura 15e).

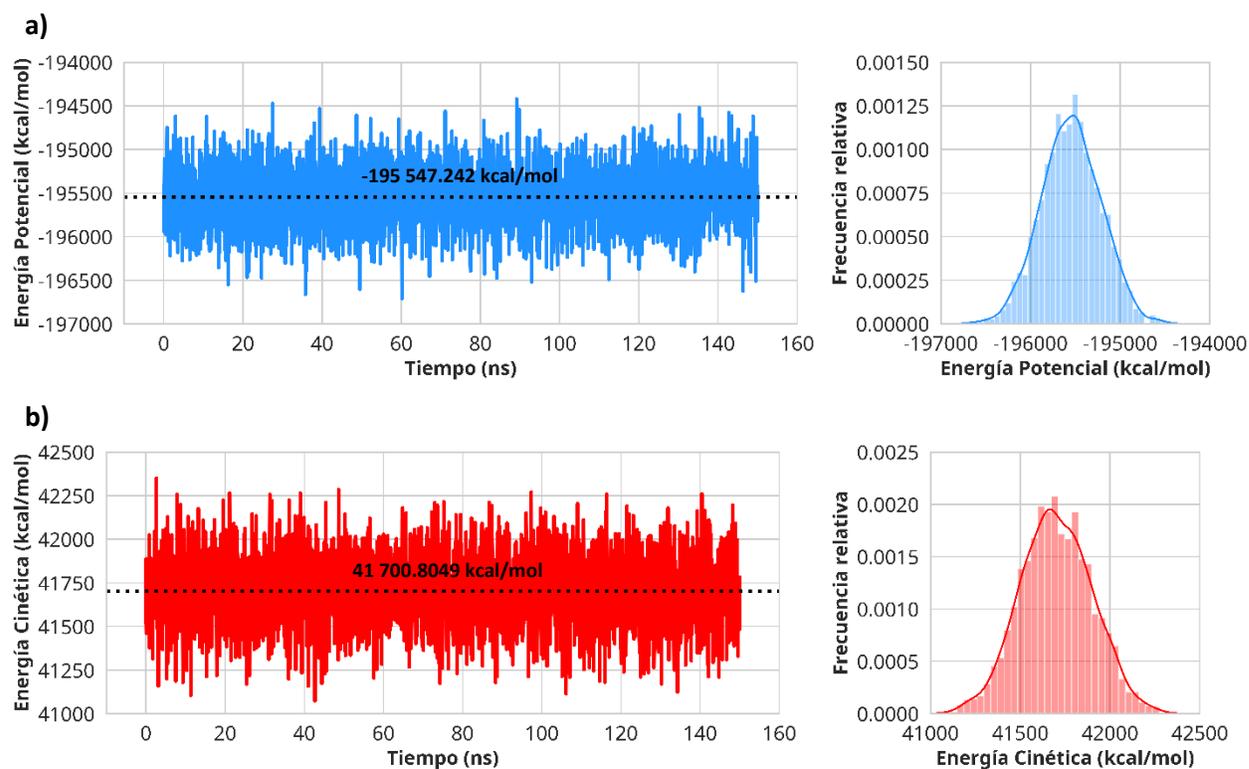


Figura 15. Propiedades físicas del sistema aptámero durante la fase de producción de dinámica molecular. Se muestra la fluctuación de los valores de cada propiedad a lo largo de los 150 ns de la simulación (derecha), y los histogramas con la frecuencia relativa de los valores de la propiedad correspondiente (izquierda). **a)** Valores de energía Potencial. **b)** Valores de energía Cinética (continúa página siguiente).

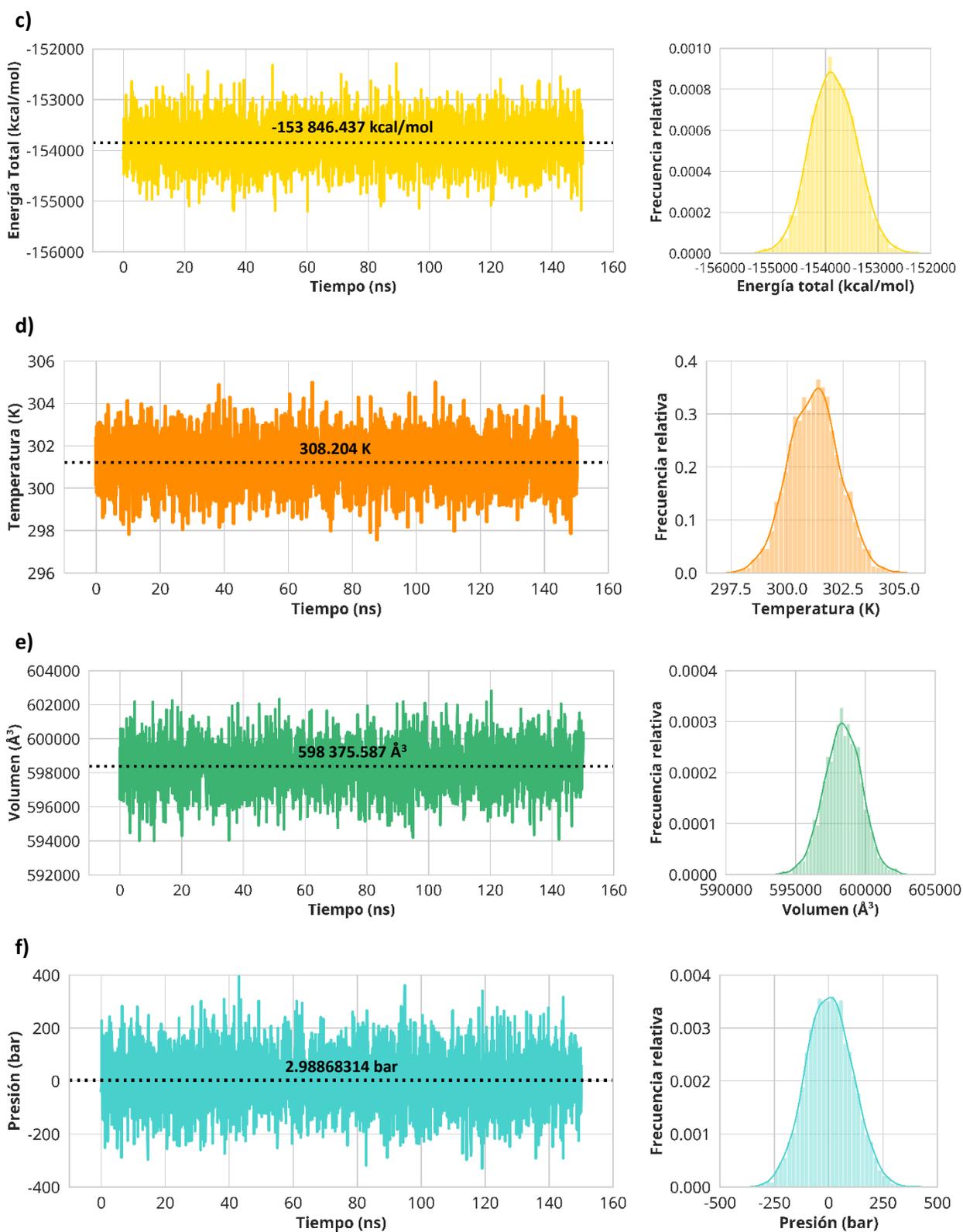


Figura 15 (continuación). Propiedades físicas del sistema aptámero durante la fase de producción de dinámica molecular. Se muestra la fluctuación de los valores de cada propiedad a lo largo de los 150 ns de la simulación (derecha), y los histogramas con la frecuencia relativa de los valores de la propiedad correspondiente (izquierda). **c)** Energía Total. **d)** Temperatura. **e)** Volumen. **f)** Presión.

Por su parte la presión mostró una amplia variación y una oscilación entre valores positivos y negativos (Figura 15f). Dicho comportamiento es esperable aun cuando se trata de la simulación de un sistema NPT. El integrador NPT cambia el volumen para reaccionar a la presión, no es que la presión fluctúe porque el volumen esté cambiando. La presión siempre fluctúa sin importar si se mantiene el volumen de la celda constante o no y las fluctuaciones de presión son grandes porque el agua no es compresible en fase condensada. En contraste, los cambios de volumen son pequeños dado que se están haciendo simulaciones en cajas de tamaño finito con condiciones de contorno periódicas. Además, las fluctuaciones de presión son causadas por cambios locales en la densidad (átomos chocando entre sí) y, por lo tanto, cuanto más grande sea un sistema menor serán las fluctuaciones de la presión total debido al promedio de las fluctuaciones locales (no correlacionadas).

3.3 Análisis de las trayectorias de dinámica molecular

3.3.1 Determinación de RMSD: *Root Mean Square Deviation*

La Figura 16 muestra la evolución temporal de los valores de RMSD (ecuación 1) de los ensayos realizados para cada uno de los sistemas durante los 150 ns de simulación. Se tomó como referencia la estructura nativa del aptámero. Los gráficos corresponden a los valores de RMSD de los átomos de la cadena principal de aptámero, acompañados de un histograma que permite apreciar la distribución de los mismos. El Anexo A Figura 24, condensa los resultados para todos los sistemas.

En lo que corresponde a la estructura del aptámero libre (Figura 16a) los valores de RMSD oscilan entre un mínimo de 4.98 Å y un máximo de 12.65 Å con un RMSD promedio de 9.35 Å, valores que reflejan el amplio rango de movilidad que tiene el aptámero por sí solo. Las Figuras 16b, c, d, e y f ofrecen una comparativa de los valores de RMSD para el sistema correspondiente y los del aptámero libre mostrando así la tendencia que tiene la estructura del aptámero a alcanzar un mayor rango de movimiento cuando está conjugado con los diferentes CNTs, con el valor mayor de RMSD (25.40 Å) en el sistema con la funcionalización de grupo carboxilato (Figura 16c). La Tabla 3 muestra los RMSD promedio de la trayectoria de DM en referencia a la estructura inicial del aptámero. Estos RMSD altos sugieren que la estructura local del aptámero no se mantiene durante la simulación de DM.

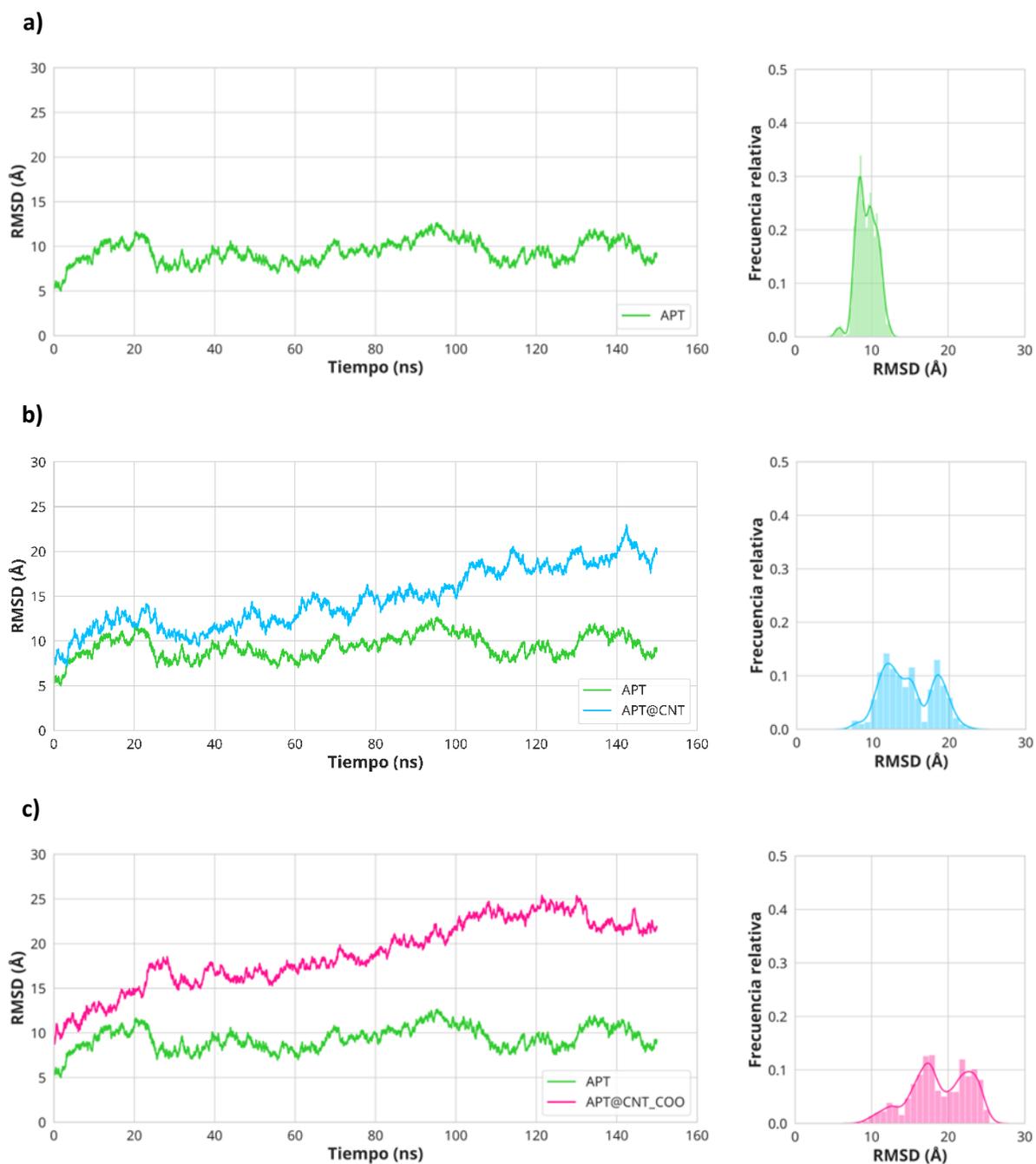


Figura 16. RMSD del aptámero en todos los sistemas simulados. RMSD de la cadena principal del aptámero en cada ensayo a lo largo de los 150 ns (derecha), histogramas con la frecuencia relativa de los valores de RMSD (izquierda).
a) Sistema APT. **b)** Sistema APT@CNT. **c)** Sistema APT@CNT_COO (continúa página siguiente).

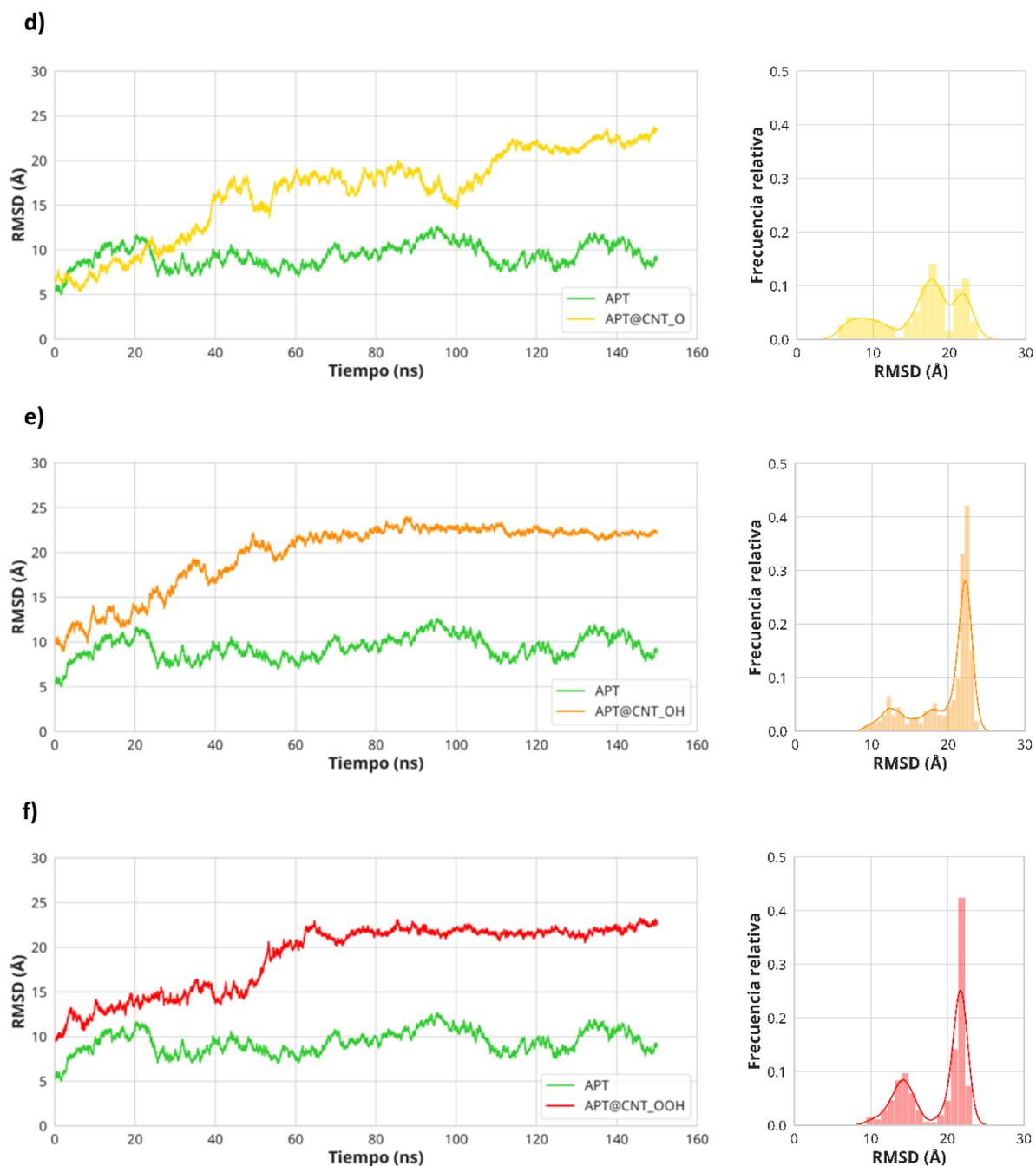


Figura 16. (continuación) RMSD del aptámero en todos los sistemas simulados. RMSD de la cadena principal del aptámero en cada ensayo a lo largo de los 150 ns (derecha), histogramas con la frecuencia relativa de los valores de RMSD (izquierda). **d)** Sistema APT@CNT_O. **e)** Sistema APT@CNT_OH. **f)** Sistema APT@CNT_OOH.

Tabla 3. RMSD promedio de la trayectoria de DM en referencia a la estructura inicial del aptámero.

Sistema	RMSD (Å)		
	Media	Máximo	Mínimo
<i>APT</i>	9.35	12.65	4.98
<i>APT@CNT</i>	14.72	22.95	7.20
<i>APT@CNT_COO</i>	18.79	25.40	8.76
<i>APT@CNT_O</i>	16.41	23.76	5.39
<i>APT@CNT_OH</i>	19.75	23.97	8.94
<i>APT@CNT_OOH</i>	18.90	23.25	9.43

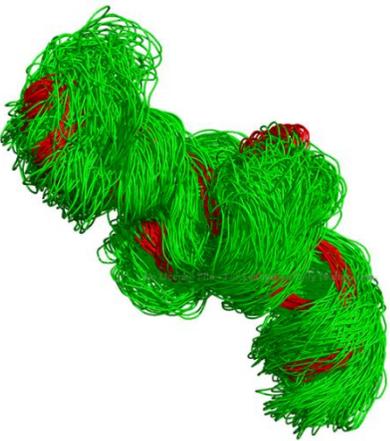
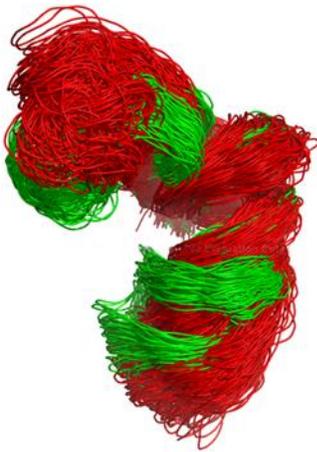
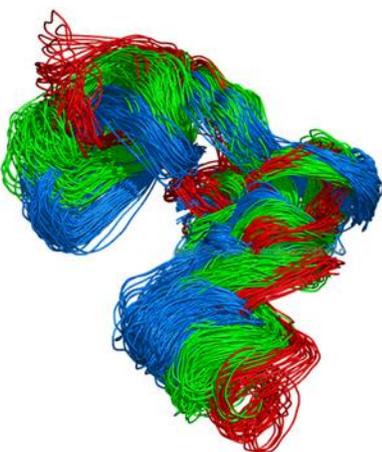
Es importante señalar que, en este caso, el RMSD refleja una medida del cambio conformacional intrínseco del aptámero por el hecho de estar unido a los CNTs con las diferentes funcionalizaciones que posee cada uno, pero no refleja la movilidad global del aptámero en torno al CNT.

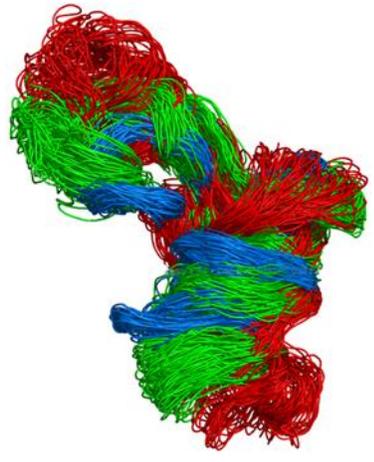
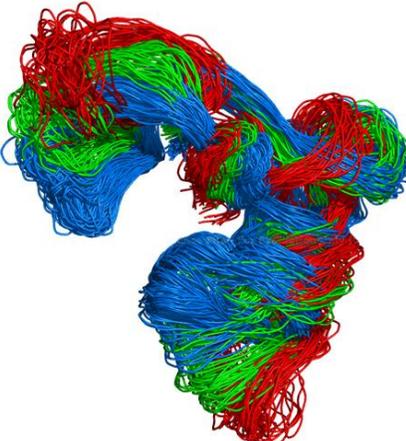
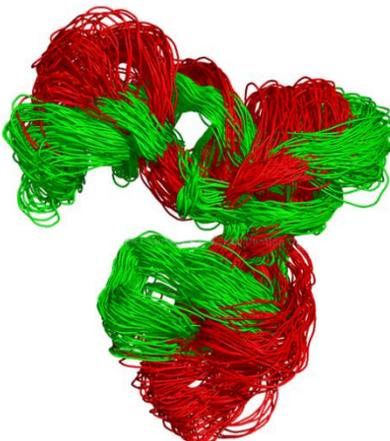
Solo con estos resultados se está demostrando que hay cambios conformacionales importantes y marcados en el aptámero por el simple hecho de estar unido a un CNT y por lo tanto se puede obviar que ya no tiene el mismo comportamiento en comparación a su forma libre.

Las simulaciones de dinámica molecular son una técnica poderosa para muestrear las conformaciones transicionales de biomoléculas, es decir, es posible dividir los conjuntos estructurales en *clusters* que comparten características conformacionales similares (J. L. Phillips et al., 2011). Se espera que el agrupamiento permita generar grupos discretos que correspondan a los estados descriptivos del sistema. Esto brinda una visión refinada de cómo una molécula está muestreando el espacio conformacional y permite la caracterización directa de los *clusters* conformacionales visitados durante la simulación de DM (Shao et al., 2007).

Dado que el cambio conformacional del aptámero a gran escala durante la DM puede conducir a una gran varianza para el cálculo de distintas propiedades se espera que la agrupación de la trayectoria en *clusters* pueda minimizar esta variación y proporcionar información más útil sobre el conjunto de conformaciones muestreadas. En función de las distribuciones de RMSD se identificaron *clusters* conformacionales que adopta el aptámero durante el tiempo químico simulado en cada uno de los sistemas. La Tabla 4 condensa esta información donde se despliegan los *clusters* característicos de cada sistema (diferenciados por colores: rojo, verde y azul), el porcentaje de la trayectoria que corresponde a cada uno, así como una representación gráfica de estas conformaciones que toma el aptámero según el sistema del que se trate.

Tabla 4. Clusters conformacionales identificados para cada sistema.

Sistema	Clusters	% de la trayectoria	Media (Å)	Representación grafica
APT	Cluster 1	1.97	5.71	
	Cluster 2	98.03	9.43	
APT@CNT	Cluster 1	67.00	12.69	
	Cluster 2	33.00	18.83	
APT@CNT_COO	Cluster 1	11.80	12.01	
	Cluster 2	45.53	17.09	
	Cluster 3	42.67	22.48	

<i>APT@CNT_O</i>	Cluster 1	25.90	9.06	
	Cluster 2	50.20	17.55	
	Cluster 3	23.90	21.97	
<i>APT@CNT_OH</i>	Cluster 1	16.47	12.29	
	Cluster 2	16.93	17.68	
	Cluster 3	66.60	22.13	
<i>APT@CNT_OOH</i>	Cluster 1	35.13	13.97	
	Cluster 2	64.87	21.57	

Los *clusters* demuestran que efectivamente hay cambios conformacionales en el aptámero. En su forma libre mantiene preferentemente una estructura abierta y desordenada en cambio, cuando esta conjugado con los CNTs, empieza a plegarse y las conformaciones comienzan a ser más compactas y rígidas.

3.3.2 Determinación de RMSF: *Root Mean Square Fluctuation*

Los movimientos locales detallados de la estructura del aptámero durante la simulación de DM en cada sistema se reflejaron cuantitativamente a partir de los valores de RMSF (ecuación 2) ya que indica las partes de la estructura que fluctúan más o menos con respecto a la estructura media. La Figura 17 muestra los gráficos con los resultados para el grupo fosfato (PO_4^{2-}) de cada nucleótido, acompañados de una representación estructural de la cadena principal del aptámero que muestra en una comparativa donde se superpuso la estructura inicial del aptámero, así como una estructura representativa del *cluster* con mayor población los residuos que tuvieron mayor movimiento durante los 150 ns de simulación. La Figura 25 del Anexo A condensa los resultados para todos los sistemas.

En términos generales, la fluctuación en Å del aptámero libre son menores alcanzando un máximo de 10.0 Å para el residuo 17 que corresponde a un uracilo. Sin embargo, se observa un patrón de flexibilidad en los grupos de residuos 10 al 20 y 50 al 70 donde la movilidad se ve aumentada significativamente en los sistemas en los que el CNT presenta una funcionalización extra (Figura 17 a–e), siendo el sistema APT@CNT_O (Figura 17c) el que alcanza valores más altos de movilidad por residuo (18.4 Å residuo 15 que corresponde a una adenina). Esto es un indicativo estructural de que estos grupos de residuos contribuyen más al movimiento global del aptámero.

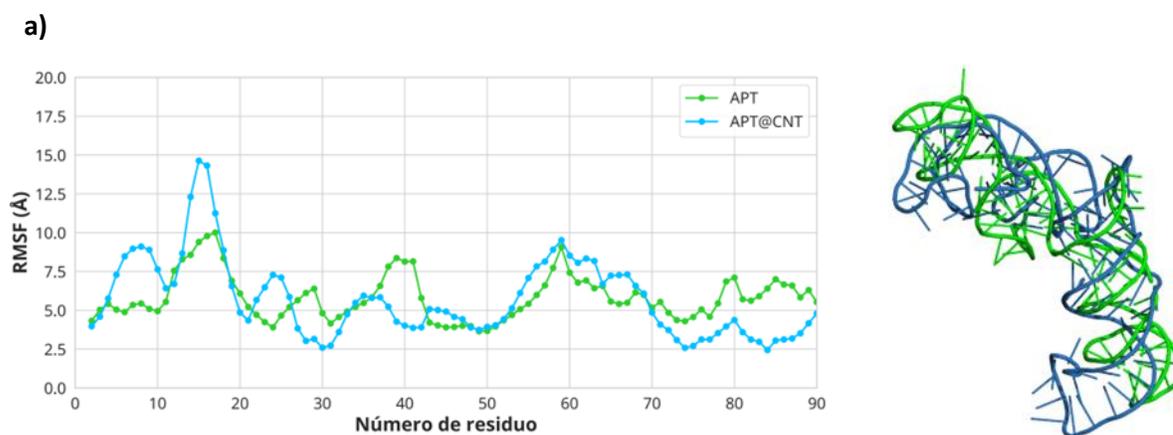


Figura 17. RMSF del aptámero en cada uno de los sistemas simulados. A la derecha de cada gráfico se encuentra una representación estructural de la cadena principal del aptámero que muestra las regiones más flexibles. **a)** Sistema APT vs APT@CNT (continúa página siguiente).

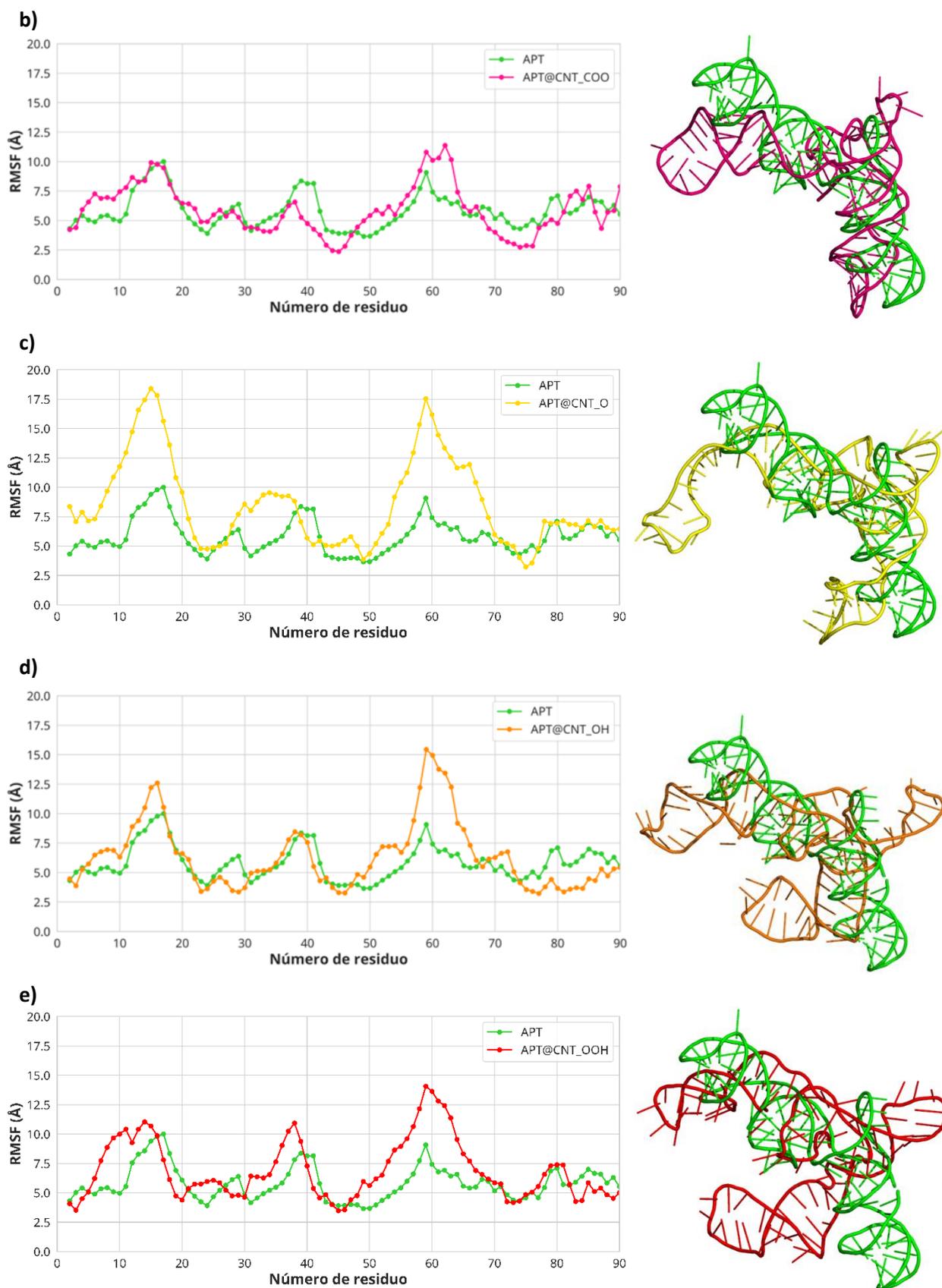


Figura 17. (continuación) RMSF del aptámero en cada uno de los sistemas simulados. **b)** APT vs APT@CNT_COO. **c)** APT vs APT@CNT_O. **d)** APT vs APT@CNT_OH. **e)** APT vs APT@CNT_OOH.

Es notable la flexibilidad del aptámero cuando está conjugado con los CNTs y también en forma libre, hecho que se ve reflejado en los valores de RMSF obtenidos por sistema, existiendo variaciones que superan los 18 Å como lo es en el caso del sistema APT@CNT_O. Sin embargo, esta varianza en los valores se puede atribuir a que el aptámero está cambiando de un estado conformacional a otro durante los 150 ns de simulación. Idealmente, el grado de similitud entre dos conformaciones dentro del mismo grupo será mayor que la similitud entre dos conformaciones que están en diferentes grupos. Por esta razón se calcularon los valores de RMSF por residuo de cada uno de los *clusters* identificados (señalados en la sección 3.3.1). La Figura 18 reúne los gráficos con los valores de RMSF para cada *cluster* en cada uno de los sistemas simulados.

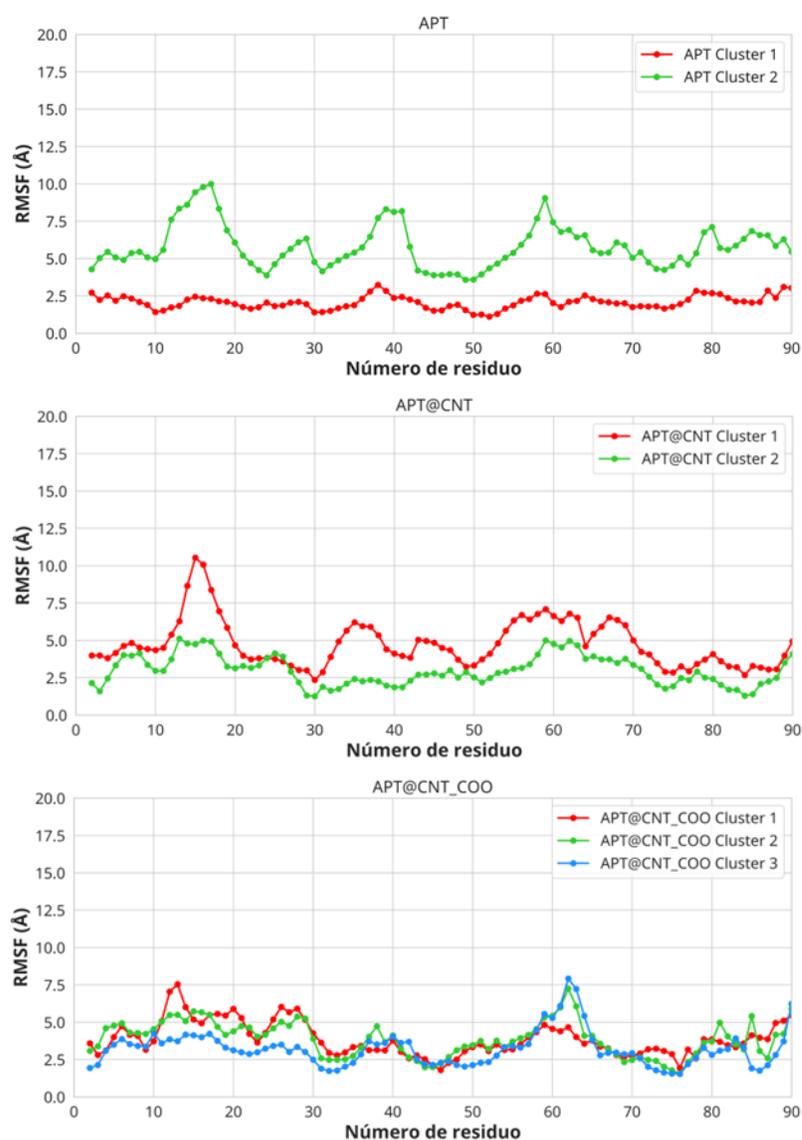


Figura 18. RMSF por *cluster* del aptámero en cada uno de los sistemas simulados. Los *clusters* se identifican por los colores rojo, verde y azul (continúa siguiente página).

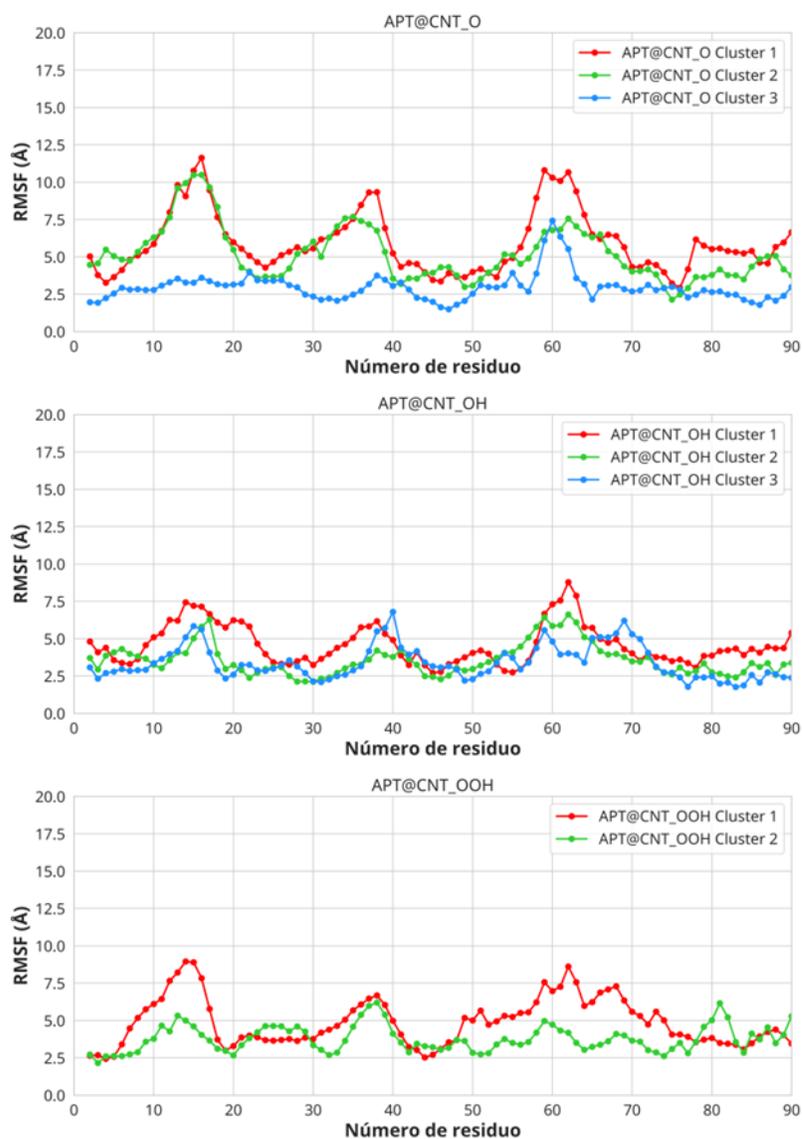


Figura 18. (continuación) RMSF por *cluster* del aptámero en cada uno de los sistemas simulados. Los *clusters* se identifican por los colores rojo, verde y azul.

Esta agrupación de los estados conformacionales es un marco más preciso y cuantitativo para discutir las diferencias entre los RMSFs obtenidos y las características de los sistemas. Si bien estos valores siguen reflejando la amplia flexibilidad por residuo del aptámero, como era de esperarse disminuyeron una vez que se hizo el cálculo de cada *cluster*, lo que confirma el supuesto bajo el cual se realizó este agrupamiento.

En lo que respecta al aptámero en su forma libre, el residuo 17 sigue siendo el que tiene más movilidad con un valor de 10 Å para el *cluster* 2. Este valor fue igual al obtenido cuando se calculó el RMSF inicialmente (Figura 17). Este valor fue igual y se puede explicar debido a que para el aptámero libre solo

se identificaron dos *clusters* en el cual el número 2 el que incluye casi todo el espacio conformacional del aptámero ya que representó el 98.03% de toda la trayectoria.

Por el otro lado, para el caso donde se identificó la mayor variabilidad por residuo correspondiente al sistema APT@CNT_O, una vez hecho el agrupamiento se alcanzó un valor máximo de 11.6 Å para el residuo 16 del *cluster 1*, lo que representa una evidencia de que el aptámero mostraba valores tan grandes de flexibilidad por residuo debido a que estaba pasando deliberadamente de un estado conformacional a otro.

3.3.3 Determinación del Radio de giro

Para analizar el tamaño del aptámero durante el tiempo químico del experimento (150 ns) se calculó el radio de giro (ecuación 4). Aquí se tomó en cuenta solamente los átomos de la cadena principal. El cálculo del radio de giro es uno de los indicadores más significativos y se utiliza ampliamente para predecir la actividad estructural de una macromolécula (Sneha y Priya Doss, 2016). En la Figura 19 se muestran los resultados de la determinación del radio de giro en función del tiempo para todos los sistemas acompañados de una representación gráfica que ejemplifica el plegamiento del aptámero sobre el CNT. La Figura 26 del Anexo A condensa los resultados para todos los sistemas.

Los valores más bajos corresponden a una conformación plegada del aptámero mientras que valores más altos corresponden a conformaciones desplegadas, lo que nota una tendencia al plegamiento del aptámero en los sistemas en los que está unido a los diferentes CNTs. En su forma libre, el aptámero tiende a plegarse en menor medida en comparación con los demás sistemas, comienza con un valor de 32.7 Å y al finalizar la simulación el radio de giro es igual a 29.2 Å. En contraste, el sistema que presenta una mayor variación desde el inicio y hacia el final de la simulación es el correspondiente al CNT prístino (APT@CNT) donde comienza con una estructura desplegada muy similar al aptámero libre con un radio de giro igual a 32.6 Å y finaliza en un valor de 23.5 Å.

En todos los sistemas se parte de una conformación abierta, esa conformación es muy parecida a la del aptámero en su estado libre, conforme transcurre el tiempo de simulación el aptámero se pliega sobre el CNT porque interactúa con su superficie.

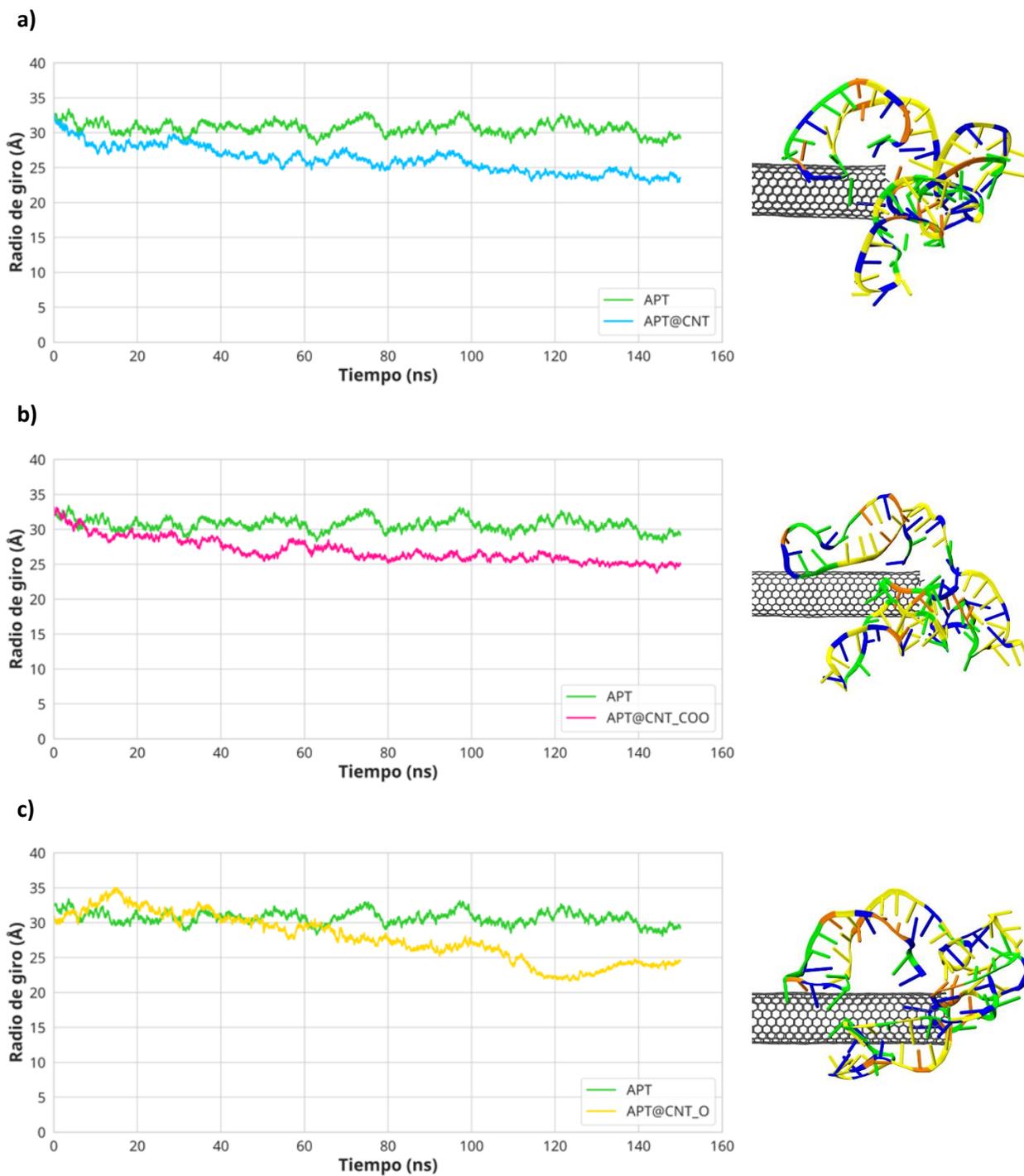


Figura 19. Radio de giro de los átomos de la cadena principal del aptámero (derecha). Representación gráfica del plegamiento del aptámero sobre los distintos CNTs (izquierda). **a)** APT vs APT@CNT. **b)** APT vs APT@CNT_COO. **c)** APT vs APT@CNT_O (continúa siguiente página).

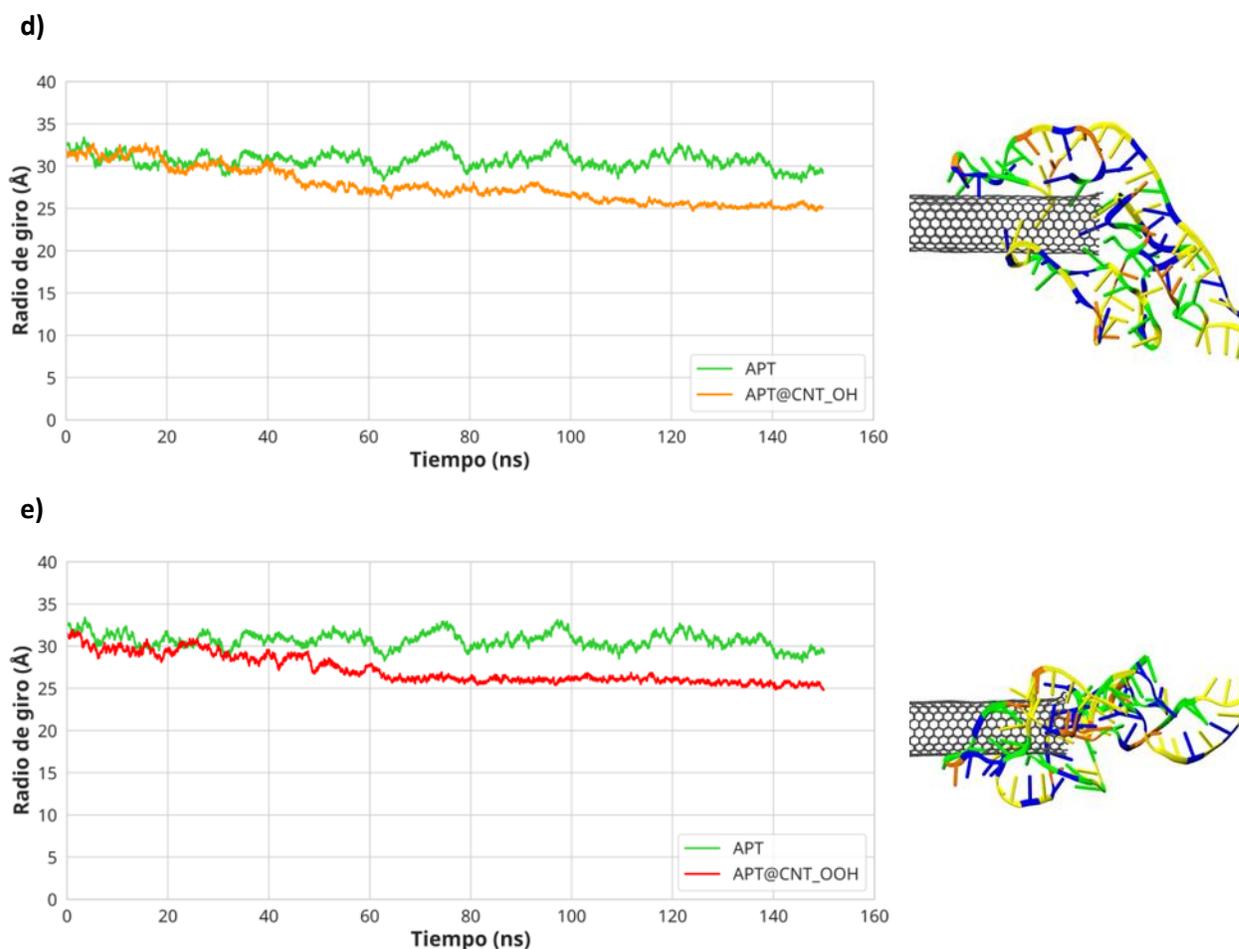


Figura 19. (continuación) Radio de giro de los átomos de la cadena principal del aptámero (derecha). Representación gráfica del plegamiento del aptámero sobre los distintos CNTs (izquierda). **d)** APT vs APT@CNT_OH. **e)** APT vs APT@CNT_OOH.

Se sabe que las macromoléculas no son rígidas y que, de hecho, su flexibilidad y cambios conformacionales son clave para su función. Entonces, debido a factores o agentes intrínsecos y extrínsecos se puede pensar que el radio de giro va a tener una variación durante el transcurso del experimento porque naturalmente una macromolécula tiene una tendencia a plegarse o extenderse. Ahora bien, si el plegamiento está detonado por el establecimiento de contactos atómicos se espera que, si el radio de giro disminuye, el número de contactos vaya en aumento o viceversa.

Como se observa en la representación que acompaña a cada uno de los gráficos del radio de giro en la Figura 19 y también en la visualización de las trayectorias, los sistemas en los que el aptámero está enlazado a los CNTs se pliegan debido a que durante la simulación ocurren contactos atómicos del aptámero con la superficie del CNT. Se llevó a cabo un análisis cuantitativo del número de contactos que

tiene el aptámero con el CNT en los diferentes sistemas simulados y cómo estos guardan una relación con la disminución del radio de giro durante toda la trayectoria (3000 *frames*). Como se mencionó en la sección de Metodología apartado 2.4.4, aquí, un contacto se define cuando la distancia entre un átomo del aptámero y un átomo del CNT es menor o igual que 4 Å. Los resultados se muestran en los gráficos de la Figura 20, donde se observa una clara relación en la que, al ir aumentando el número de contactos que tiene el aptámero con el CNT, el radio de giro a su vez va disminuyendo.

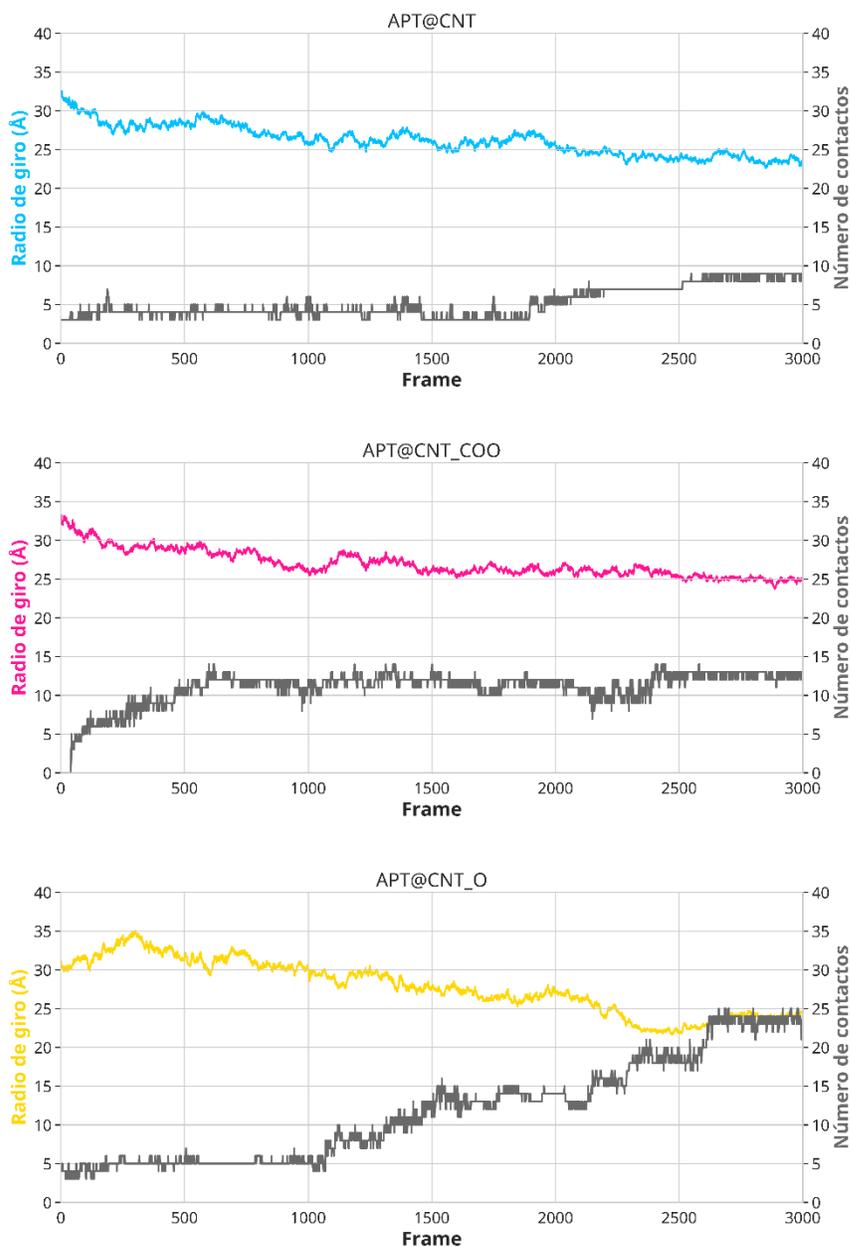


Figura 20. Relación del radio de giro vs número de contactos en los sistemas simulados (continúa siguiente página).

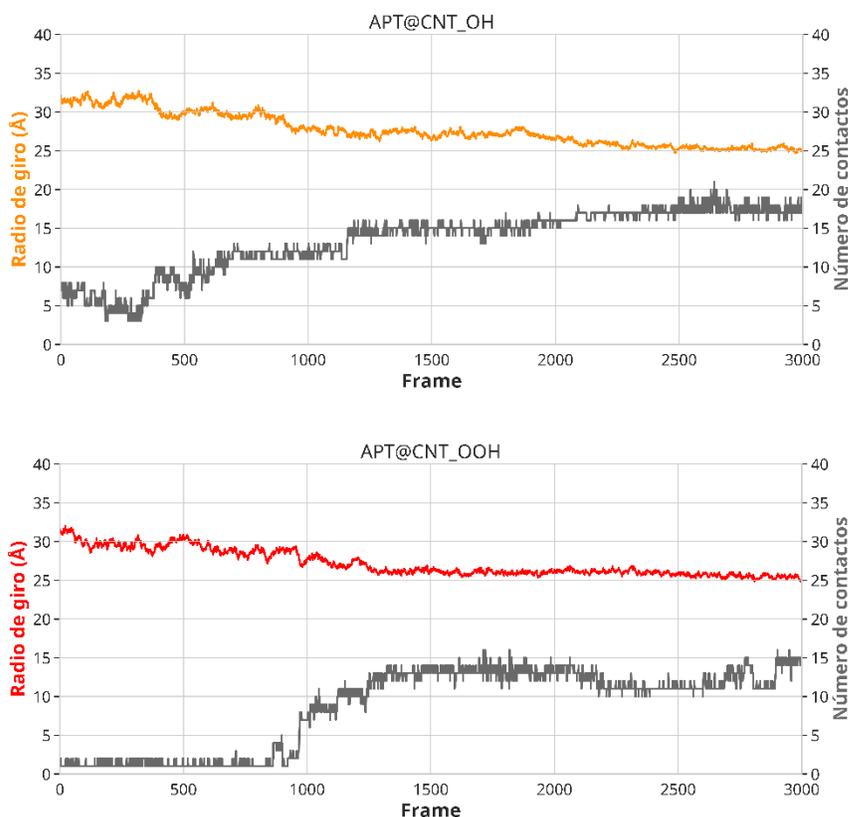


Figura 20. (continuación) Relación del radio de giro vs número de contactos en los sistemas.

Se puede deducir entonces que lo que está pasando es que los contactos establecidos entre el aptámero y el CNT median el cambio conformacional, lo que se está viendo es el plegamiento del aptámero en torno al CNT.

3.3.4 Contactos atómicos aptámero–CNTs

Al conocer que el plegamiento del aptámero es debido a que ciertos residuos entran en contacto con la superficie de los CNTs dependiendo del sistema en cuestión, se realizó un análisis cuantitativo y cualitativo para identificar cuáles son los residuos que se ven involucrados y con qué frecuencia lo hacen y, de esta manera, caracterizar exactamente qué regiones del aptámero están interactuando con los CNTs y si estas regiones cambian dependiendo la funcionalización que esté presente. Los resultados se muestran en el *heatmap* de la Figura 21 donde, de los 90 residuos con los que cuenta el aptámero, solo aparecen aquellos que presentaron un contacto con los CNTs. Además, para descartar si se inactiva o no el potencial de

asociación del aptámero con la proteína de interés, se analizó qué región/es del aptámero tienen interacción con la proteína E7 resultado que se incluyen en la Figura 21.

El sistema que establece una menor cantidad de contactos aptámero – CNT es en el que el aptámero está unido al nanotubo prístino (APT@CNT), donde los residuos 84, 85 y 86 correspondientes a una citosina, adenina y adenina, respectivamente, interactúan el 99.1% de todo el tiempo de duración del experimento. Para el caso del sistema APT@CNT_COO los residuos que mantienen un contacto mayor al 50% de tiempo de simulación son el 16, 17, 18, 19, 20, 81, 82, 83, 84, 88 y 89. En el sistema APT@CNT_O los residuos que tienen contacto con el CNT más de la mitad de los 150 ns de simulación son el 13, 14, 15, 17, 18, 19, 84, 85, 86 y 87. Para el sistema APT@CNT_OH los residuos que cumplen con esta característica son el 2, 3, 16, 17, 18, 19, 20, 61, 62, 63, 82, 83, 85, 86 y 90. Por último los contactos más significativos del aptámero con el CNT en el sistema APT@CNT_OOH son los que involucran a los residuos 11, 12, 13, 18, 19, 20, 61, 62, 63, 85 y 86. Los residuos que mantienen una interacción significativa (mayor al 50% del tiempo) sin importar el sistema de que se trate son el 18 y el 19, correspondientes a un uracilo y una guanina.

Por otro lado, la oncoproteína E7 establece contactos con la totalidad del aptámero. Sin embargo, hay regiones con las que este contacto es más significativo y se mantiene por la mayor parte del tiempo químico simulado (más del 80%). Entre los residuos involucrados están el 2, 3, 17, 19, 20, 21, 29, 30, 46, 47, 48, 49, 50, 74, 75, 76, 77, 86, 87, 88.

A pesar de que en todos los sistemas con sus respectivas funcionalizaciones el aptámero tiene un contacto significativo con el CNT, la región de los residuos 28 al 80 queda disponible para que el aptámero cumpla su finalidad de reconocer a la oncoproteína E7.

Como se está comprobando por lo mostrado en la Figura 21, debido a la libertad conformacional que tiene el aptámero, aleatoriamente un residuo puede estar cerca del CNT, pero como se midió la frecuencia de estos contactos hay grupos de residuos que interactúan más frecuentemente con el CNT. Por lo tanto, los datos sugieren que estos contactos ya no son aleatorios sino propios de una interacción; de tal forma que a distancias $\leq 4 \text{ \AA}$ los contactos que ocurren por más del 50% del tiempo total de simulación ya no pueden ser considerados como aleatorio.

Teniendo en cuenta lo anterior, el aptámero se pliega sobre la superficie de los CNTs y lo que se observa es que este plegamiento es debido a la formación de interacciones, ahora bien, ¿Qué tipo de interacciones gobiernan la asociación del aptámero en la superficie de los CNTs?

La heterogeneidad de interacción de los CNTs es una característica ampliamente reconocida de las interacciones químicas entre estas nanoestructuras y las moléculas orgánicas. Sin embargo, debido a que diferentes mecanismos pueden actuar simultáneamente (principalmente interacciones hidrofóbicas, interacciones tipo π y enlaces de hidrógeno) la predicción de la interacción con moléculas orgánicas en los CNTs no es sencilla. El mecanismo de adsorción dominante es diferente para los distintos tipos de moléculas orgánicas (polares y no polares) (Pan y Xing, 2008). Cuando los CNTs no están modificados mediante funcionalizaciones interactúan con las moléculas orgánicas mediante apilamiento tipo π . Pero a menudo, la funcionalización de los CNTs propicia el establecimiento de interacciones más fuertes como por ejemplo los enlaces de hidrógeno (Chazot y Hart, 2019).

Los diferentes mecanismos de interacción responden de manera diferente a los cambios en las condiciones ambientales, por lo que la contribución relativa de un mecanismo individual es de gran importancia para predecir la interacción de sustancias orgánicas en los CNTs. Los estudios actuales enfatizan la importancia de los mecanismos individuales, pero nunca proponen un método para determinar cuantitativamente la contribución relativa de los mecanismos individuales (Pan y Xing, 2008).

3.3.4.1 Determinación de interacciones tipo π

Se sabe que los compuestos aromáticos interactúan con el grafeno y, en consecuencia, con las paredes laterales de los CNTs. Por lo tanto, un CNT y una molécula orgánica plana interactúan a través de los electrones π . Las interacciones tipo π son similares a las interacciones electrostáticas en que el sistema π rico en electrones actúa como una región de carga negativa que puede interactuar con iones, moléculas polares u otro sistema π . Los más comunes incluyen el apilamiento π - π , o las interacciones NH- π y CH- π . Estos últimos implican la alineación de un grupo funcional con los arreglos hexagonales de carbono del nanotubo (Chazot y Hart, 2019). Dentro de este esquema de interacciones π , los dos subsistemas mantienen su individualidad.

Los detalles de la interacción de los ácidos nucleicos con los CNTs aún no se han entendido por completo, aunque generalmente se supone que está mediada por las redes de electrones π de las bases nitrogenadas y de la superficie de los CNTs (Khanduri et al., 2008). La fuerza de la interacción entre las bases y el CNT se basa en la superposición de los orbitales moleculares y depende de la estructura química de la base nitrogenada. Debido a que, la interacción entre el CNTs y el RNA está impulsada por una fuerte atracción

de van der Waals entre las caras de las bases nitrogenadas y la pared lateral de los CNTs, los contactos establecidos pueden catalogarse como interacciones tipo π .

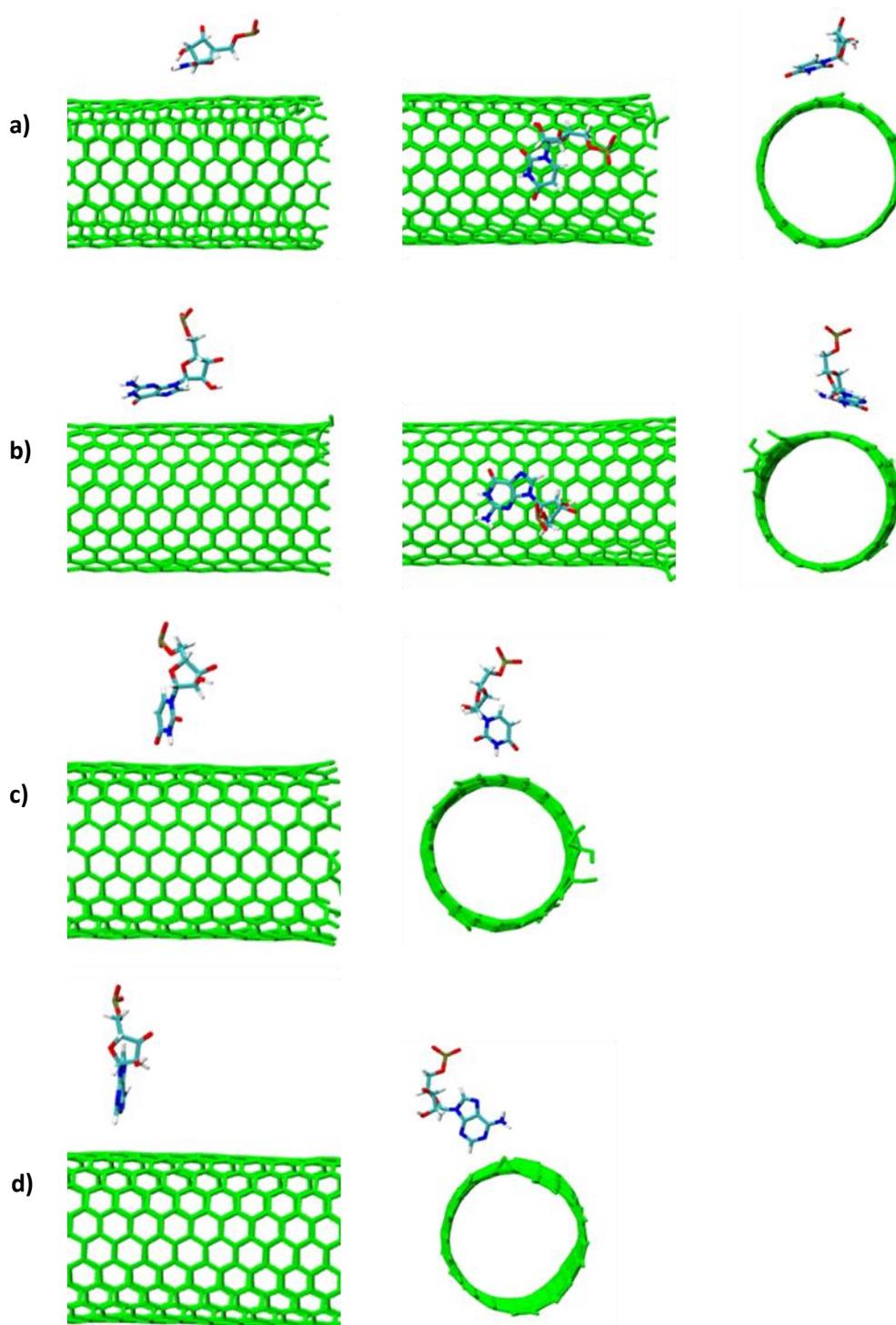


Figura 22. Representación de las interacciones tipo π identificadas entre el aptámero y los CNTs. **a)** Acoplamiento compensado con un uracilo. **b)** Acoplamiento compensado con una guanina. **c)** Acoplamiento borde – cara con un uracilo. **d)** Acoplamiento borde – cara con una adenina.

La examinación minuciosa de las trayectorias de DM y el criterio de distancia ($\leq 4 \text{ \AA}$) dejó ver que, en efecto, la interacción que se establece entre las bases nitrogenadas y los CNTs está dentro de las interacciones tipo π . Como los ácidos nucleicos en solución acuosa están cargados negativamente y contienen muchos grupos funcionales polares, se pueden esperar dos cosas: un apilamiento desplazado de los anillos (apilamiento compensado), o bien, un apilamiento en forma de T (apilamiento borde–cara). La Figura 22 muestra ejemplos de las subclases de interacciones tipo π identificadas.

Se puede observar una interacción del tipo apilamiento compensado entre el CNT y la base nitrogenada uracilo (Figura 22a), igualmente en la Figura 22b se observa una interacción dentro de la misma categoría, pero esta vez con una guanina. También se identificaron apilamientos en forma de T (apilamiento borde–cara) entre el NH de un uracilo (Figura 22c) y el CH de una adenina (Figura 22d).

Al considerar el hecho de que las interacciones de tipo π son fáciles, no destructivas y sobre todo reversibles (Chen et al., 2018), y también, debido a que los contactos entre la proteína E7 y el aptámero son mucho más frecuentes y suceden con la mayoría de los residuos del aptámero se puede suponer que estas interacciones podrían verse interrumpidas una vez que la proteína esté presente en el complejo, lo que mantendría la capacidad de reconocimiento del aptámero.

3.3.4.2 Determinación de enlaces de hidrógeno

La funcionalización de los CNTs tiene como objetivo facilitar su procesamiento, pero al mismo tiempo, las interacciones que establecen con compuestos orgánicos pueden alterarse en gran medida. Los grupos funcionales pueden hacer que los CNTs sean más hidrofílicos y adecuados para la interacción con compuestos polares y de peso molecular relativamente bajo (Lu et al., 2006)

Se evaluó la formación de enlaces de hidrógeno entre los átomos del aptámero y los átomos de los CNTs de cada sistema. La Tabla 5 reúne estos datos, donde se despliega qué residuos del aptámero son los que forman enlaces de hidrógeno, así como su porcentaje de ocupación durante el tiempo de simulación (150 ns). El sistema APT@CNT_OH es el que establece más enlaces de hidrógeno con un total de 7, 4 de ellos tienen un porcentaje de ocupación superior al 5% con los residuos 16, 83, 85 y 86, dicho resultado se contrasta con el *heatmap* mostrado en la Figura 20 (sección 3.3.4), donde estos 4 residuos mantienen un contacto superior al 75% de todo el tiempo de la simulación. Por otro lado, el sistema APT@CNT y el sistema APT@CNT_OOH solo establecen 3 enlaces de hidrógeno cada uno. En este último, dos de los

enlaces tienen un porcentaje de ocupación significativo con el residuo 19 y 85 correspondientes a una guanina y una adenina, respectivamente.

Tabla 5. Residuos que forman enlaces de hidrógeno con los CNTs por sistema.

Sistema	Residuo	Ocupación (%)
<i>CNT</i>	17 URA	1.33
	84 CYT	30.67
	85 ADE	11.97
<i>CNT_COO</i>	16 ADE	2.33
	17 URA	4
	81 GUA	1.8
	82 URA	10.27
	88 CYT	3.7
<i>CNT_O</i>	14 CYT	2.8
	17 URA	2.8
	84 CYT	43.43
	85 ADE	2.87
	86 ADE	5.2
<i>CNT_OH</i>	16 ADE	7.93
	61 GUA	1.17
	82 URA	2.93
	83 GUA	9.97
	85 ADE	23.24
	86 ADE	37.26
	90 URA	1.7
<i>CNT_OOH</i>	11 ADE	3.53
	19 GUA	13.3
	85 ADE	11.94

En investigaciones previas los enlaces de hidrógeno se han estudiado extensivamente para entender la adsorción de compuestos químicos por el carbón activado. Varios estudios informaron que el aumento de los grupos funcionales que contienen oxígeno en el carbón activado produce la disminución de la interacción con compuestos que pueden formar enlaces de hidrógeno (Pan y Xing, 2008). Un argumento similar aplica para las interacciones de los CNTs con compuestos orgánicos. Esto podría explicar por qué el sistema APT@CNT_OOH es el que forma una menor cantidad de enlaces de hidrógeno en comparación con los demás sistemas y además que el porcentaje de ocupación no supere el 15%. Aunado a esto, las moléculas de agua también pueden formar enlaces de hidrógeno con los grupos funcionales, y por lo tanto podrían estar compitiendo con las moléculas orgánicas (en este caso los nucleótidos del aptámero) por los sitios de interacción.

3.3.5 Determinación de RMSD: residuos 28 al 80

Los residuos del 28 al 80 del aptámero son cruciales para la interacción de éste con la oncoproteína E7 ya que son los que de alguna manera quedan libres y no se ven interrumpidos (o lo hacen, pero en menor medida) por las interacciones que tiene el aptámero con los CNTs. Bajo esta premisa, se evaluó qué tanto varía la conformación de esta sección del aptámero durante los 150 ns de los experimentos con respecto a la conformación que toma el aptámero una vez esta interaccionando con la proteína E7. Se sabe que estos residuos quedan libres para la interacción con E7, pero no se sabe si están en la conformación adecuada para propiciar esta interacción. La Figura 23 muestra la medida de cuánto cambia la conformación del aptámero en los diferentes sistemas

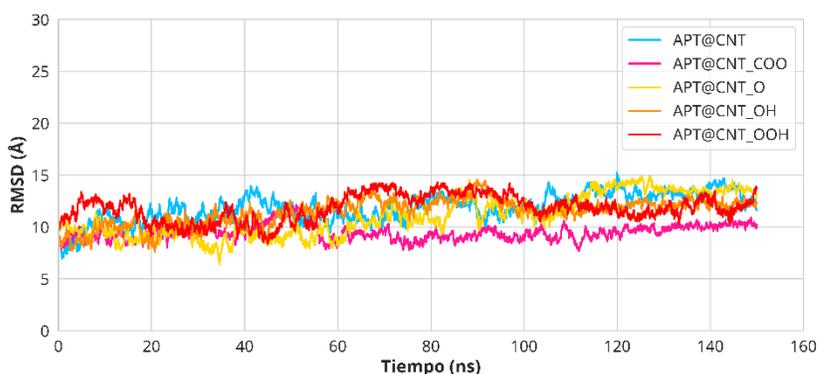


Figura 23. RMSD de los residuos libres para la interacción con la oncoproteína E7.

En general, las variaciones que ocurren entre los 7 a los 15 Å, es para el sistema APT@CNT_COO en el cual se mantienen los valores más bajos con respecto a la estructura de referencia. Sí bien existe una variación notable, los datos sugieren que a pesar de las interacciones mostradas entre el aptámero y los CNTs, éste fragmento conserva una conformación libre significativa que le permita interactuar con la proteína de interés y cumplir el fin último de su utilización.

Capítulo 4. Conclusiones

Los cánceres relacionados con el virus del papiloma humano, en especial el cáncer de cuello uterino, son enfermedades neoplásicas que afectan a las mujeres en todo el mundo por ello la necesidad de desarrollar herramientas de diagnóstico que estén al alcance de todos sigue latente. Los biomarcadores específicos de enfermedades como lo es la oncoproteína E7 del VPH representan dianas ideales para el diagnóstico oportuno aunado a esto, aprovechar las calidades estructurales, químicas y biológicas de los aptámeros y nanotubos de carbono marca la pauta para el diseño de métodos de detección como lo son los biosensores. Sin embargo, para reducir costos y tiempo de experimentación el modelado molecular permite imitar y estudiar el comportamiento de sistemas biológicos mediante la creación de modelos, lo que le confiere la gran capacidad de expandir el horizonte de complejidad de los fenómenos que se quieran estudiar.

En el presente trabajo se estudiaron los efectos de diferentes grupos funcionales ($-\text{COO}$, $-\text{O}$, $-\text{OH}$, $-\text{OOH}$) en nanotubos de carbono sobre un aptámero de RNA que tiene capacidad de reconocimiento para la oncoproteína E7 de virus del papiloma humano a través de simulaciones de dinámica molecular.

Las características conformacionales y la estabilidad estructural del aptámero se discutieron de acuerdo a los resultados de las simulaciones, esto brindó una mejor perspectiva acerca de la flexibilidad del aptámero al estar enlazado a los diferentes nanotubos de carbono, observando una tendencia del mismo a disminuir su flexibilidad.

Las diferentes simulaciones de los complejos mostraron que el nanotubo de carbono prístino es el mejor candidato para inmovilizar el aptámero y diseñar un nanobiosensor.

Finalmente, esta investigación estableció las bases para dar seguimiento a futuros estudios *in silico* para el diseño de un biosensor para el virus del papiloma humano basado en los cambios conformacionales del aptámero conjugado con nanotubos de carbono.

Capítulo 5. Perspectivas

- Realizar simulaciones de dinámica molecular más extensas y/o replicas.
- Estudiar el rol del conector.
- Estudiar los cambios conformacionales del aptámero en la interacción con nanotubos de carbono funcionalizados con grupos catiónicos.
- Simular los conjugados aptámero–CNT con la proteína E7 de virus del papiloma humano.
- Diseñar un experimento *in vitro* para contrastar los resultados.

Literatura citada

- Alexiadis, A. y Kassinos, S. 2008. Molecular dynamic simulations of carbon nanotubes in CO₂ atmosphere. *Chemical Physics Letters*, North-Holland, 460(4–6), pp. 512–516. doi:10.1016/J.CPLETT.2008.06.050
- Augustine, S., Singh, J., Srivastava, M., Sharma, M., Das, A. y Malhotra, B. D. 2017. Recent advances in carbon based nanosystems for cancer theranostics. *Biomaterials Science*. Royal Society of Chemistry, Vol. 5. Número 5. pp. 901–952 . doi:10.1039/c7bm00008a
- Autoionize Plugin, Version 1.5. s/f. Consultado el 16 de noviembre de 2021, de <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/autoionize/>
- Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper, S. A. y Spivak, D. A. 2008a. Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Springer, 390(4), pp. 1009–1021. doi:10.1007/S00216-007-1587-2/FIGURES/3
- Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper, S. A. y Spivak, D. A. 2008b. Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Springer, 390(4), pp. 1009–1021. doi:10.1007/S00216-007-1587-2/FIGURES/3
- Barbosa, N. S. V., Lima, E. R. de A. y Tavares, F. W. 2017. *Molecular Modeling in Chemical Engineering. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.13915-0
- Bayly, C. I., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Cornell, W. D., Fox, T., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., Cieplak, P., Gould, I. R. y Spellmeyer, D. C. 2002. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, American Chemical Society, 117(19), pp. 5179–5197. doi:10.1021/JA00124A002
- Bodily, J. y Laimins, L. A. 2011. Persistence of human papillomavirus infection: Keys to malignant progression. *Trends in Microbiology*. *Trends Microbiol*, Vol. 19. Número 1. pp. 33–39 . doi:10.1016/j.tim.2010.10.002
- Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. y Karplus, M. 1983. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 4(2), pp. 187–217. doi:10.1002/JCC.540040211
- Chazot, C. A. C. y Hart, A. J. 2019. Understanding and control of interactions between carbon nanotubes and polymers for manufacturing of high-performance composite materials. *Composites Science and Technology*, Elsevier, 183, p. 107795. doi:10.1016/J.COMPSCITECH.2019.107795
- Chen, T., Li, M. y Liu, J. 2018. π - π Stacking Interaction: A Nondestructive and Facile Means in Material Engineering for Bioapplications. *Crystal Growth and Design*, American Chemical Society, 18(5), pp. 2765–2783. doi:10.1021/ACS.CGD.7B01503/ASSET/IMAGES/LARGE/CG-2017-01503A_0004.JPEG
- Choi, Y. J. y Park, J. S. 2016. Clinical significance of human papillomavirus genotyping. *Journal of Gynecologic Oncology*. *Korean Society of Gynecologic Oncology and Colposcopy*, Vol. 27. Número 2 . doi:10.3802/jgo.2016.27.e21
- Choi, Y. K., Kern, N. R., Kim, S., Kanhaiya, K., Afshar, Y., Jeon, S. H., Jo, S., Brooks, B. R., Lee, J., Tadmor, E.

- B., Heinz, H. y Im, W. 2022. CHARMM-GUI Nanomaterial Modeler for Modeling and Simulation of Nanomaterial Systems. *Journal of Chemical Theory and Computation*, American Chemical Society, 18(1), pp. 479–493. doi:10.1021/ACS.JCTC.1C00996/SUPPL_FILE/CT1C00996_SI_001.PDF
- Chouhy, D., Bolatti, E. M., Pérez, G. R. y Giri, A. A. 2013. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. *Journal of General Virology*, J Gen Virol, 94(PART 11), pp. 2480–2488. doi:10.1099/vir.0.055137-0
- Christen, M., Hünenberger, P. H., Bakowies, D., Baron, R., Bürgi, R., Geerke, D. P., Heinz, T. N., Kastenholz, M. A., Krätler, V., Oostenbrink, C., Peter, C., Trzesniak, D. y Van Gunsteren, W. F. 2005. The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *Journal of computational chemistry*, J Comput Chem, 26(16), pp. 1719–1751. doi:10.1002/JCC.20303
- Cohen, N. C., Blaney, J. M., Humblet, C., Gund, P. y Barry, D. C. 2002. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, American Chemical Society, 33(3), pp. 883–894. doi:10.1021/JM00165A001
- Dai, H. 2002. Carbon nanotubes: opportunities and challenges. *Surface Science*, North-Holland, 500(1–3), pp. 218–241. doi:10.1016/S0039-6028(01)01558-8
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R. y Stanley, M. A. 2012. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. Elsevier Ltd, Vol. 30. Número SUPPL.5. pp. F55–F70 . doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083
- Durrant, J. D. y McCammon, J. A. 2011. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology*, BioMed Central, 9(1), pp. 1–9. doi:10.1186/1741-7007-9-71/FIGURES/4
- Fogolari, F., Corazza, A., Toppo, S., Tosatto, S. C. E., Viglino, P., Ursini, F. y Esposito, G. 2012. Studying interactions by molecular dynamics simulations at high concentration. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. doi:10.1155/2012/303190
- Friend Tambunan, U. S. y Aditya, A. 2012. HPV Bioinformatics: In Silico Detection, Drug Design and Prevention Agent Development. *Topics on Cervical Cancer With an Advocacy for Prevention*. InTech. doi:10.5772/27456
- Gowtham, S., Scheicher, R. H., Ahuja, R., Pandey, R. y Karna, S. P. 2007. Physisorption of nucleobases on graphene: Density-functional calculations. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*, American Physical Society, 76(3), p. 033401. doi:10.1103/PHYSREVB.76.033401/FIGURES/3/MEDIUM
- Graham, J. C. y Zarbl, H. 2012. Use of cell-SELEX to generate DNA aptamers as molecular probes of HPV-associated cervical cancer cells. *PLoS ONE*, PLoS One, 7(4). doi:10.1371/journal.pone.0036103
- Grant, B. J., Rodrigues, A. P. C., ElSawy, K. M., McCammon, J. A. y Caves, L. S. D. 2006. Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics (Oxford, England)*, Bioinformatics, 22(21), pp. 2695–2696. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTL461
- Groff, K., Brown, J. y Clippinger, A. J. 2015. Modern affinity reagents: Recombinant antibodies and aptamers. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., Vol. 33. Número 8. pp. 1787–1798 . doi:10.1016/j.biotechadv.2015.10.004

- Harik, V. 2018. Nanotechnology of Carbon Nanotubes. *Mechanics of Carbon Nanotubes*, Elsevier, pp. 1–24. doi:10.1016/B978-0-12-811071-3.00001-9
- HBonds Plugin, Version 1.2. s/f. Consultado el 8 de agosto de 2022, de <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/hbonds/>
- Hoja de datos sobre cáncer de cuello uterino. s/f. Consultado el 1 de junio de 2021, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/487307/Hoja_de_Datos_2019_CACU.pdf
- Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. s/f. Consultado el 1 de junio de 2021, de [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)
- Humphrey, W., Dalke, A. y Schulten, K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics, J Mol Graph*, 14(1), pp. 33–38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5
- James, W. 2007. Aptamers in the virologists' toolkit. *Journal of General Virology. J Gen Virol*, Vol. 88. Número 2. pp. 351–364 . doi:10.1099/vir.0.82442-0
- Johnson, R. R., Johnson, A. T. C. y Klein, M. L. 2008. Probing the structure of DNA-carbon nanotube hybrids with molecular dynamics. *Nano Letters, American Chemical Society* , 8(1), pp. 69–75. doi:10.1021/NL071909J/SUPPL_FILE/NL071909JSI20070803_122343.PDF
- Karplus, M. y Petsko, G. A. 1990. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* 1990 347:6294, Nature Publishing Group, 347(6294), pp. 631–639. doi:10.1038/347631a0
- Khanduri, G., Panwar, B., Chang, K.-M., Tsai, J.-Y., Gowtham, S., Scheicher, R. H., Pandey, R., Karna, S. P. y Ahuja, R. 2008. First-principles study of physisorption of nucleic acid bases on small-diameter carbonnanotubes. *Nanotechnology, IOP Publishing*, 19(12), p. 125701. doi:10.1088/0957-4484/19/12/125701
- Kudłak, B. y Wiczerzak, M. 2020. Aptamer based tools for environmental and therapeutic monitoring: A review of developments, applications, future perspectives. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology, Taylor and Francis Inc.*, 50(8), pp. 816–867. doi:10.1080/10643389.2019.1634457
- Kukol, A. 2014. *Molecular modeling of proteins: Second edition. Molecular Modeling of Proteins: Second Edition*, Springer Fachmedien, pp. 1–474. doi:10.1007/978-1-4939-1465-4
- Lawal, A. T. 2016. Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors. *Materials Research Bulletin, Pergamon*, 73, pp. 308–350. doi:10.1016/J.MATERRESBULL.2015.08.037
- Liu, Z., Wang, G., Li, Z. y Wang, R. 2008. Geometrical preferences of the hydrogen bonds on protein ligand binding interface derived from statistical surveys and quantum mechanics calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation, American Chemical Society*, 4(11), pp. 1959–1973. doi:10.1021/CT800267X/SUPPL_FILE/CT800267X_SI_003.PDF
- Lu, C., Chung, Y. L. y Chang, K. F. 2006. Adsorption thermodynamic and kinetic studies of trihalomethanes on multiwalled carbon nanotubes. *Journal of hazardous materials, J Hazard Mater*, 138(2), pp. 304–310. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2006.05.076
- Magnus, M., Boniecki, M. L. J., Dawson, W. y Bujnicki, J. M. 2016. SimRNAweb: a web server for RNA 3D

- structure modeling with optional restraints. *Nucleic Acids Research*, Oxford Academic, 44(W1), pp. W315–W319. doi:10.1093/NAR/GKW279
- Martin, T. W. y Derewenda, Z. S. 1999. The name is bond — H bond. *Nature Structural Biology* 1999 6:5, Nature Publishing Group, 6(5), pp. 403–406. doi:10.1038/8195
- Maruyama, T. 2021. Carbon nanotubes. *Handbook of Carbon-Based Nanomaterials*, Elsevier, pp. 299–319. doi:10.1016/B978-0-12-821996-6.00009-9
- Mehra, N. K., Mishra, V. y Jain, N. K. 2014. A review of ligand tethered surface engineered carbon nanotubes. *Biomaterials*, Biomaterials, 35(4), pp. 1267–1283. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.10.032
- MergeStructs Plugin, Version 1.1. s/f. Consultado el 15 de noviembre de 2021, de <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/mergestructs/>
- Molefactory Plugin, Version 2.0. s/f. Consultado el 16 de noviembre de 2021, de <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/molefactory/>
- Moody, C. A. y Laimins, L. A. 2010. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, Vol. 10. Número 8. pp. 550–560 . doi:10.1038/nrc2886
- Nicol, C., Cesur, Ö., Forrest, S., Belyaeva, T. A., Bunka, D. H. J., Blair, G. E. y Stonehouse, N. J. 2013. An RNA Aptamer Provides a Novel Approach for the Induction of Apoptosis by Targeting the HPV16 E7 Oncoprotein. *PLoS ONE*, PLoS One, 8(5). doi:10.1371/journal.pone.0064781
- Ochoa-Carrillo, F. J. 2014. Virus del papiloma humano. Desde su descubrimiento hasta el desarrollo de una vacuna. Parte I/III | *Gaceta Mexicana de Oncología*. elsevier, 13(5), pp. 308–315. <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-virus-del-papiloma-humano-desde-X1665920114805966>
- Pan, B. y Xing, B. 2008. Adsorption mechanisms of organic chemicals on carbon nanotubes. *Environmental Science and Technology*, American Chemical Society, 42(24), pp. 9005–9013. doi:10.1021/ES801777N/SUPPL_FILE/ES801777N_SI_001.PDF
- Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., Buch, R., Fiorin, G., Hénin, J., Jiang, W., McGreevy, R., Melo, M. C. R., Radak, B. K., Skeel, R. D., Singharoy, A., Wang, Y., Roux, B., Aksimentiev, A., Luthey-Schulten, Z., ... Tajkhorshid, E. 2020. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *The Journal of Chemical Physics*, AIP Publishing LLC AIP Publishing , 153(4), p. 044130. doi:10.1063/5.0014475
- Phillips, J. L., Colvin, M. E. y Newsam, S. 2011. Validating clustering of molecular dynamics simulations using polymer models. *BMC Bioinformatics*, BioMed Central, 12(1), pp. 1–23. doi:10.1186/1471-2105-12-445/FIGURES/12
- Roe, D. R. y Cheatham, T. E. 2013. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of Chemical Theory and Computation*, American Chemical Society, 9(7), pp. 3084–3095. doi:10.1021/CT400341P/SUPPL_FILE/CT400341P_SI_001.PDF
- Sanginario, A., Miccoli, B. y Demarchi, D. 2017. Carbon Nanotubes as an Effective Opportunity for Cancer

Diagnosis and Treatment. *Biosensors* 2017, Vol. 7, Page 9, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 7(1), p. 9. doi:10.3390/BIOS7010009

Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C. y Wacholder, S. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. Elsevier B.V., Vol. 370. Número 9590. pp. 890–907 . doi:10.1016/S0140-6736(07)61416-0

Schlick, T. 2002. *Molecular Modeling and Simulation*. New York, NY, Springer New York, 21. doi:10.1007/978-0-387-22464-0

Schlick, T. 2010. *Biomolecular Structure and Modeling: Historical Perspective*. *Interdisciplinary Applied Mathematics*, Springer Nature, 21, pp. 1–40. doi:10.1007/978-1-4419-6351-2_1/FIGURES/5

Shao, J., Tanner, S. W., Thompson, N. y Cheatham, T. E. 2007. Clustering molecular dynamics trajectories: 1. Characterizing the performance of different clustering algorithms. *Journal of Chemical Theory and Computation*, American Chemical Society , 3(6), pp. 2312–2334. doi:10.1021/CT700119M/SUPPL_FILE/CT700119M-FILE002.PDF

Simon, J., Flahaut, E. y Golzio, M. 2019. Overview of Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. *Materials* 2019, Vol. 12, Page 624, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 12(4), p. 624. doi:10.3390/MA12040624

Sinha, N. y Yeow, J. T. W. 2005. Carbon nanotubes for biomedical applications. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 4(2), pp. 180–195. doi:10.1109/TNB.2005.850478

Sneha, P. y Priya Doss, C. G. 2016. *Molecular Dynamics: New Frontier in Personalized Medicine*. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Academic Press, 102, pp. 181–224. doi:10.1016/BS.APCSB.2015.09.004

So, H. M., Won, K., Kim, Y. H., Kim, B. K., Ryu, B. H., Na, P. S., Kim, H. y Lee, J. O. 2005. Single-walled carbon nanotube biosensors using aptamers as molecular recognition elements. *Journal of the American Chemical Society*, American Chemical Society , 127(34), pp. 11906–11907. doi:10.1021/JA053094R/SUPPL_FILE/JA053094RSI20050722_064202.PDF

Solvate Plugin, Version 1.5. s/f. Consultado el 16 de noviembre de 2021, de <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/solvate/>

Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C. y Zhao, J. 2008. Aptamer-based biosensors. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, Elsevier, 27(2), pp. 108–117. doi:10.1016/j.trac.2007.12.004

The rise of molecular modelling | Feature | RSC Education. s/f. Consultado el 20 de mayo de 2021, de <https://edu.rsc.org/feature/the-rise-of-molecular-modelling/3007610.article>

TopoTools Plugin, Version 1.8. s/f. Consultado el 16 de noviembre de 2021, de <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/topotools/>

Toscano-Garibay, J. D., Benítez-Hess, M. L. y Alvarez-Salas, L. M. 2011. Isolation and Characterization of an RNA Aptamer for the HPV-16 E7 Oncoprotein. *Archives of Medical Research, Arch Med Res*, 42(2), pp. 88–96. doi:10.1016/j.arcmed.2011.02.005

Vaseashta, A. 2006. Carbon nanotubes based devices and sensors. *Materials and Manufacturing Processes*, Taylor & Francis Group , 21(7), pp. 710–716. doi:10.1080/10426910600613595

- VPH y el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer. s/f. Consultado el 16 de mayo de 2021, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/germenes-infecciosos/vph-y-cancer>
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. y Case, D. A. 2004. Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry*, *J Comput Chem*, 25(9), pp. 1157–1174. doi:10.1002/JCC.20035
- Wang, Z., Yu, J., Gui, R., Jin, H. y Xia, Y. 2016. Carbon nanomaterials-based electrochemical aptasensors. *Biosensors & bioelectronics*, *Biosens Bioelectron*, 79, pp. 136–149. doi:10.1016/J.BIOS.2015.11.093
- Yang, N., Chen, X., Ren, T., Zhang, P. y Yang, D. 2015. Carbon nanotube based biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier, 207(PartA), pp. 690–715. doi:10.1016/J.SNB.2014.10.040
- Yang, Y., Yang, X., Yang, Y. y Yuan, Q. 2018a. Aptamer-functionalized carbon nanomaterials electrochemical sensors for detecting cancer relevant biomolecules. *Carbon*, Elsevier Ltd, 129, pp. 380–395. doi:10.1016/J.CARBON.2017.12.013
- Yang, Y., Yang, X., Yang, Y. y Yuan, Q. 2018b. Aptamer-functionalized carbon nanomaterials electrochemical sensors for detecting cancer relevant biomolecules. *Carbon*. Elsevier Ltd, Vol. 129. pp. 380–395 . doi:10.1016/j.carbon.2017.12.013
- Zhou, W., Jimmy Huang, P. J., Ding, J. y Liu, J. 2014. Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *Analyst*. The Royal Society of Chemistry, Vol. 139. Número 11. pp. 2627–2640 . doi:10.1039/c4an00132j
- Zhu, X., Lopes, P. E. M. y Mackerell, A. D. 2012. Recent developments and applications of the CHARMM force fields. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, John Wiley & Sons, Ltd, 2(1), pp. 167–185. doi:10.1002/WCMS.74
- Zhuang, W. R., Wang, Y., Cui, P. F., Xing, L., Lee, J., Kim, D., Jiang, H. L. y Oh, Y. K. 2019. Applications of π - π stacking interactions in the design of drug-delivery systems. *Journal of Controlled Release*, Elsevier, 294, pp. 311–326. doi:10.1016/J.JCONREL.2018.12.014

Anexos

Anexo A. Cálculos estructurales para todos los sistemas

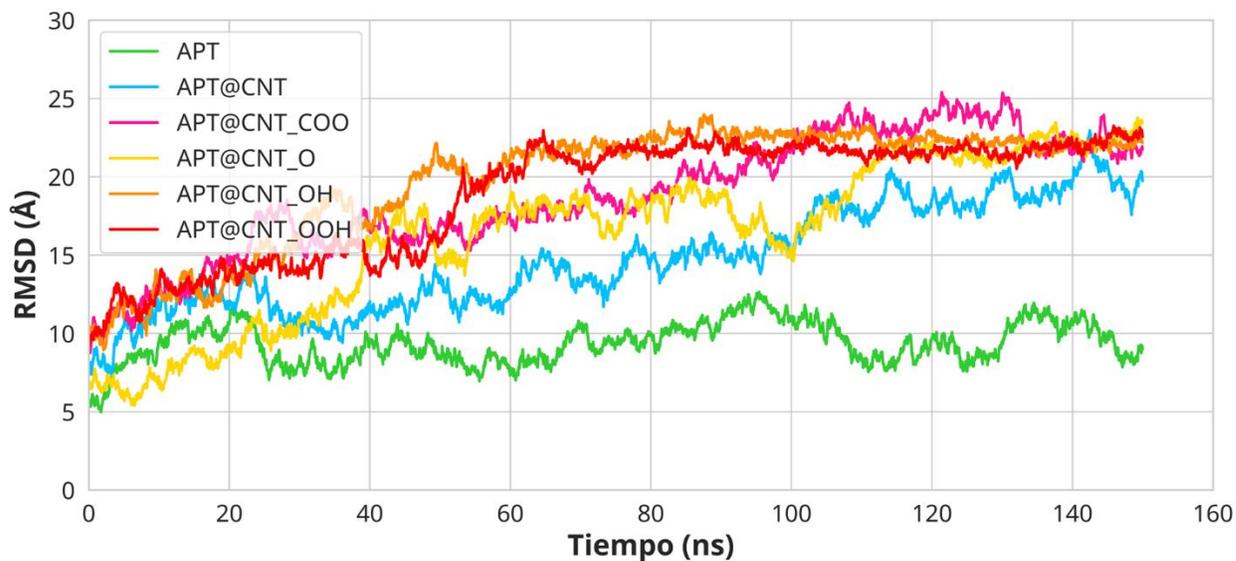


Figura 24. Gráfico que consensa los resultados del cálculo RMSD para todos los sistemas.

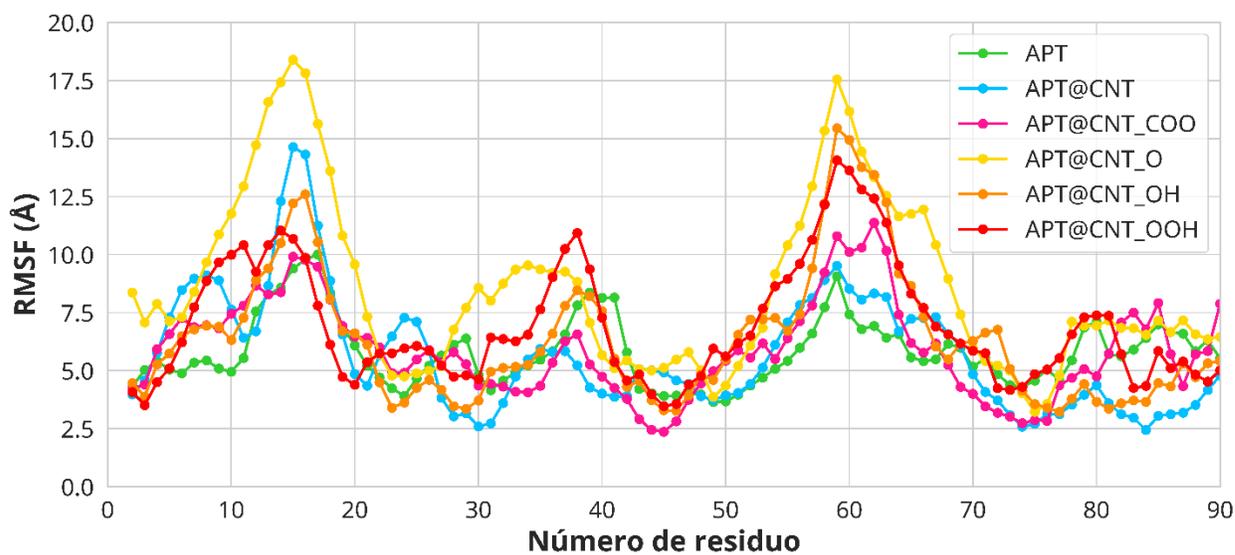


Figura 25. Gráfico que condensa los resultados del cálculo RMSF para todos los sistemas.

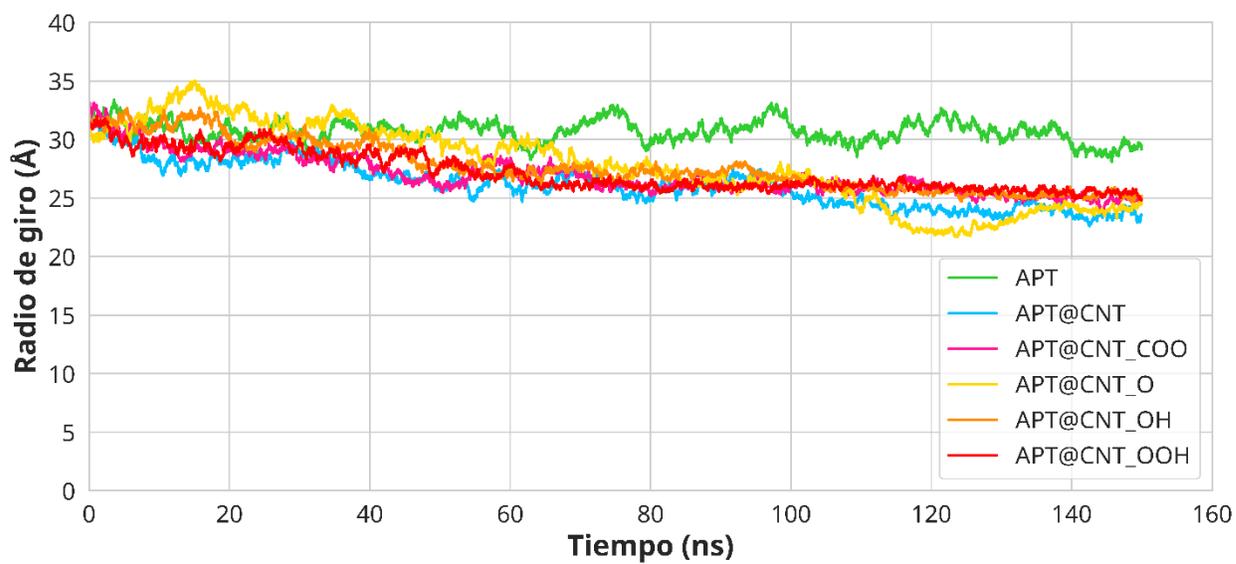


Figura 26. Gráfico que condensa los resultados del cálculo de Radio de Giro para todos los sistemas.

