

Nanotecnología para el diagnóstico del virus del papiloma humano

Nanotechnology for the diagnosis of human papilloma virus

Juan Pablo Martínez-Montero¹, Alfredo Rafael Vilchis-Néstor^{2*}, Rodolfo Daniel Ávila-Avilés^{3*}

Fecha de recepción: 23 de enero de 2024

Fecha de aceptación: 26 de abril de 2024

Resumen - El virus de papiloma humano (VPH) es causante de una de las infecciones de transmisión sexual más prevalentes en la población sexualmente activa, cuando la infección se vuelve persistente y crónica producirá problemas clínicos, como algunos tipos de cáncer si la infección se da por VPH de alto riesgo. El siglo XXI trajo un creciente avance en la nanotecnología y, combinado con una mejor comprensión de los sistemas biológicos, se han podido aplicar herramientas nanotecnológicas para combatir problemas de salud. La comunidad científica tiene interés en aplicar nanomedicina para crear herramientas con las que puedan combatir al virus. Esta revisión se centra en ofrecer un panorama actual sobre lo que es el VPH y da una perspectiva de

Abstract - The human papillomavirus (HPV) is the cause of one of the most prevalent sexually transmitted infections in the sexually active population. When the infection becomes persistent and chronic, it will produce clinical problems such as some types of cancer when the infection occurs, for high-risk HPV. The 21st century brought increasing progress in nanotechnology and combined with a better understanding of biological systems, nanotechnological tools have been able to be applied to combat health problems. The scientific community is interested in applying nanomedicine to create tools with which they can combat the virus. This review focuses on offering a current overview of what HPV is and gives a perspective

1 Universidad Autónoma del Estado de México - Facultad de Ciencias • Carretera Toluca-Atlacomulco km 14.5, San Cayetano, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México • jmartinezm047@alumno.uaemex.mx

2 UAEM-UNAM - Centro Conjunto de Investigación Química Sustentable (CCIQS) • Carretera Toluca-Atlacomulco km. 14.5, San Cayetano, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México • *Autor de correspondencia: arvilchisn@uaemex.mx • ORCID: 0000-0001-8490-0900.

3 Universidad Autónoma del Estado de México - Facultad de Química - Programa de Doctorado en Ciencia de Materiales • Paseo Colón esq. Paseo Tollocan s/n, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México • *Autor de correspondencia: ravilaa@uaemex.mx • ORCID: 0000-0002-0683-073X.

cómo puede aplicarse la nanotecnología para nuevos métodos de diagnóstico con base en nanomateriales.

Palabras claves: VPH; nanotecnología; nanomateriales; biosensores.

on how nanotechnology can be applied for new diagnostic methods based on nanomaterials.

Keywords: HPV; nanotechnology; nanomaterials; biosensors.

INTRODUCCIÓN

La palabra *nano* proviene del latín *nanus* que significa "enano". La Real Academia Española define *nano* como una *milmillonésima parte*. La nanotecnología se define como la interdisciplina aplicada de la física fundamental, la química, la biología y la tecnología de objetos a escala menor a 100 nm, esto es, se encarga del diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales, dispositivos y sistemas con dimensiones entre 1 y 100 nm (Leon *et al.*, 2020).

En este sentido, cabe recordar a Richard Feynman, a quien se le considera el padre de la nanotecnología moderna, quien en 1959 presentó una conferencia titulada *There's plenty of room at the bottom*—Hay mucho espacio en el fondo— donde habló del concepto de manipular materia a nivel atómico, esta idea novedosa introdujo nuevas líneas de investigación que sentaron las bases de la nanotecnología (Hulla *et al.*, 2015).

Los avances de bioinformática y biología de sistemas han traído grandes beneficios a la comprensión de los sistemas biológicos. Por otra parte, la nanotecnología ha generado nuevas herramientas para la administración de fármacos, terapia de enfermedades y diagnóstico (Kumar *et al.*, 2023 & McNeil *et al.*, 2005).

De la nanotecnología se ha derivado la llamada *nanomedicina*, que se define como un campo interdisciplinario integrado por la química, biología, medicina e ingeniería, que busca desarrollar herramientas más eficaces para resolver problemas médicos (Sahu *et al.*, 2021). Su objetivo principal es controlar, reparar, construir y defender sistemas biológicos desde una perspectiva a nivel molecular (Bodunde *et al.*, 2021).

En este sentido, uno de los campos que más ha llamado la atención de la nanomedicina es el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades ocasionadas por los virus; de entre las que resalta las mediadas por el virus de papiloma humano (VPH).

El VPH es uno de los virus de transmisión sexual más prevalente dentro de la población sexualmente activa, se caracteriza por causar lesiones premalignas y malignas en cuello uterino, ano y faringe. Su importancia es tal, que cada año 14 millones de personas se infectan por VPH, elevando el riesgo de infectarse a lo largo de la vida a un 80% (Gohar *et al.*, 2022 & Harper *et al.*, 2017).

Actualmente existen pocos protocolos para el diagnóstico y tratamiento de VPH. Por un lado, los métodos de diagnóstico han sido eficaces para diagnosticar el VPH, sin embargo, tienen limitaciones, como la necesidad de personal capacitado con buenas técnicas y habilidades para distinguir células malignas, el requerimiento de materiales y condiciones específicas y los altos costos; por lo que, la nanomedicina, tiene un gran potencial para brindar herramientas novedosas para detectar el VPH, mediante la aplicación de nanomateriales en biosensores que presenten propiedades específicas, aportando alternativas y llevando a la variabilidad en los métodos de diagnóstico.

GENERALIDADES DEL VIRUS DEL VPH

Empecemos hablando del VPH. El VPH considera en un gran grupo de virus de la familia *Papillomaviridae*, que se caracterizan por ser virus de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena sin envoltura (van Doorslaer *et al.*, 2013).

Tiene la característica de que su genoma se divide en tres regiones (véase fig. 1):

(E) Región “temprana”, incluye todos los genes “E” asociados con los procesos de replicación viral.

(L) Región “tardía”, codifican proteínas estructurales, como la cápside mayor “L1” y menor “L2”.

(NCR) Región “no codificante”, involucrada en regular los procesos de transcripción y replicación de ADN viral (Araldi *et al.*, 2018; Tlučková *et al.*, 2013 & Tommasino *et al.*, 2014).

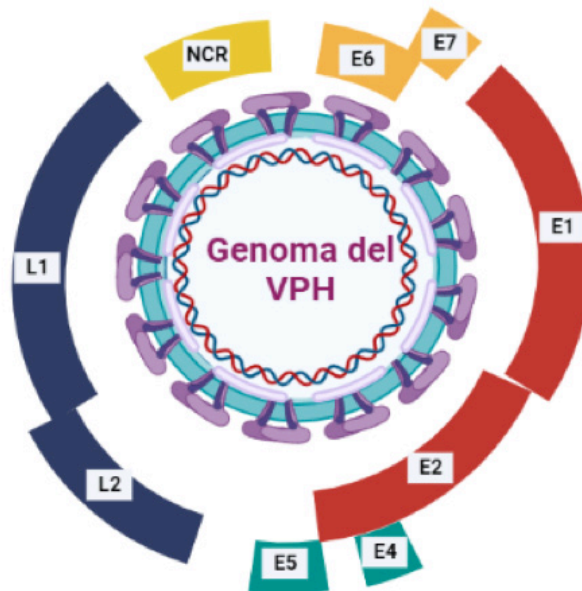


Figura 1. Genoma del virus de papiloma humano: En la región “temprana” (E) podemos encontrar las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7, estas proteínas se han relacionado con actividad que propicia el avance de lesiones a cánceres. Por otro lado, la región “tardía” codifica las proteínas L1 y L2 que están relacionadas con el anclaje del virus con el receptor de la célula y la región “no codificante” involucrada en la regulación de la transcripción y replicación.

La transmisión del VPH es a través del contacto piel a piel de la mucosa genital y oral. El virus se une a la célula mediante la proteína de su cápside “L1”, reconociendo en la célula blanco la presencia de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) ubicados en la membrana de las células epiteliales, tras reconocer y unirse a la célula, éste se introduce en ella mediante un proceso llamado endocitosis, (Raff *et al.*, 2013). Para infectar, el virus es afín a queratinocitos basales –las células de la piel o epitelio más interno–, por lo que, para que el virus ingrese a ellas, se necesita de lesiones que permitan el acceso (Araldi *et al.*, 2018).

La infección suele ser asintomática y puede ser combatida por el sistema inmunológico llegando hasta eliminar la infección; sin embargo, cuando la infección se vuelve persistente, es un factor de riesgo para desarrollar cáncer, en específico el llamado carcinoma de células escamosas (Wierzbicka *et al.*, 2021).

Así, el VPH puede producir tumores malignos y benignos, dependiendo del tipo de genotipo que infecte de los más de 100 antes mencionados. Los podemos clasificar dependiendo de su riesgo, los VPH’s que producen verrugas

se clasifican como virus de bajo riesgo y los que producen lesiones que alteran la arquitectura del epitelio y que pueden avanzar a cáncer se clasifican como de alto riesgo (Pinatti *et al.*, 2018). VPH16/18 son los genotipos más comunes asociados con el carcinoma de células escamosas de cuello uterino, mientras que VPH18/45 se asocian más comúnmente con adenocarcinoma de cuello uterino (Bhatla *et al.*, 2020).

GENERALIDADES DE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA VPH

La prueba de Papanicolaou es la prueba rutinaria para detectar cáncer de cuello uterino, fue diseñada por el Dr. George Nicholas Papanicolaou en 1917, quien, tras varias investigaciones, en 1943 publicó su monografía *Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear*—Diagnóstico de cáncer de útero por frotis vaginal— donde habló de una técnica de diagnóstico con métodos de toma de muestra, fijación en fresco, tinción y nomenclatura de diferentes tipos de alteraciones citológicas relacionadas con el cáncer cervicouterino—Citología tipo I, II, III, IV y V— (Romero *et al.*, 2001). Esta prueba se basa en comparar células normales que tienen un núcleo liso y de forma ovalada, con aquellas células malignas que son las que presentan núcleos deformados a menudo agrandados, irregulares, multilobulares y que contienen micronúcleos (Smith *et al.*, 2018 & Zink *et al.*, 2004).

Por otro lado, con el avance científico, se ha llegado al diseño pruebas que se basan en biología molecular. Actualmente hay cinco pruebas aprobadas por la *Federal Drug Administration* (FDA) de E.E.U.U. para la detección de VPH de alto riesgo; el ensayo HC2—Qiagen, Germantown, MD— utiliza anticuerpos para unirse a híbridos de ADN-ARN, la prueba cervista VPH VPH16/18—Hologic, Marlborough, MA— que requiere amplificación para detectar ácidos nucleicos, las pruebas CobasVPH—Roche, Indianapolis, IN— y Aptima—Hologic, Marlborough, MA— utilizan una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y amplificación mediada por transcripción, respectivamente. (Zamani *et al.*, 2021). El rendimiento de una prueba molecular de VPH depende de una gran cantidad de factores incluyendo el procedimiento de recolección de muestras, la metodología de extracción de ácidos nucleicos, los cebadores y el uso de controles internos. En la actualidad existen una necesidad por métodos simples, rápidos y confiables para el diagnóstico molecular de VPH (Mao *et al.*, 2017).

NUEVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS UTILIZANDO NANOTECNOLOGÍA

Como ya hemos revisado, existe pocos métodos disponibles para el diagnóstico del VPH, pese a que han sido de gran ayuda para combatir al virus, tienen algunas desventajas. Por un lado, la prueba de Papanicolaou está limitada por el ojo humano que tiene que examinar cientos de miles de células por muestra; por el otro, las pruebas moleculares están limitadas por una gran variedad de factores, como la técnica del laboratorista, infraestructura, calidad de los reactivos y que suelen ser costosos.

Una alternativa a estas pruebas puede ser los biosensores diseñados con nanomateriales. Un biosensor es un dispositivo analítico (véase figura 2) que puede convertir información biológica en señales detectables—señales ópticas, eléctricas, electroquímicas, magnéticas o térmicas—, compuesto usualmente por dos partes, la parte de reconocimiento biológico, encargada de interactuar con la parte biológica de la muestra—pueden ser anticuerpos, proteínas o ADN— y la parte de traducción, que recibe señales producidas por el efecto SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*), colorimétricos o fluorescentes en el caso de las señales ópticas, que las traduce en señales medibles (Deng *et al.*, 2021).

El objetivo de usar nanomateriales en el diseño de biosensores es producir sensores de alta sensibilidad, de respuesta rápida, funcionalidad múltiple, de fácil uso y económicos (Pandey *et al.*, 2022). Las diferentes propiedades de los nanomateriales se pueden sintonizar variando las formas y tamaños, así como su composición química, además se pueden obtener materiales sólidos o huecos, esto puede adicionar propiedades terapéuticas a las de sentido (Bodunde *et al.*, 2021).

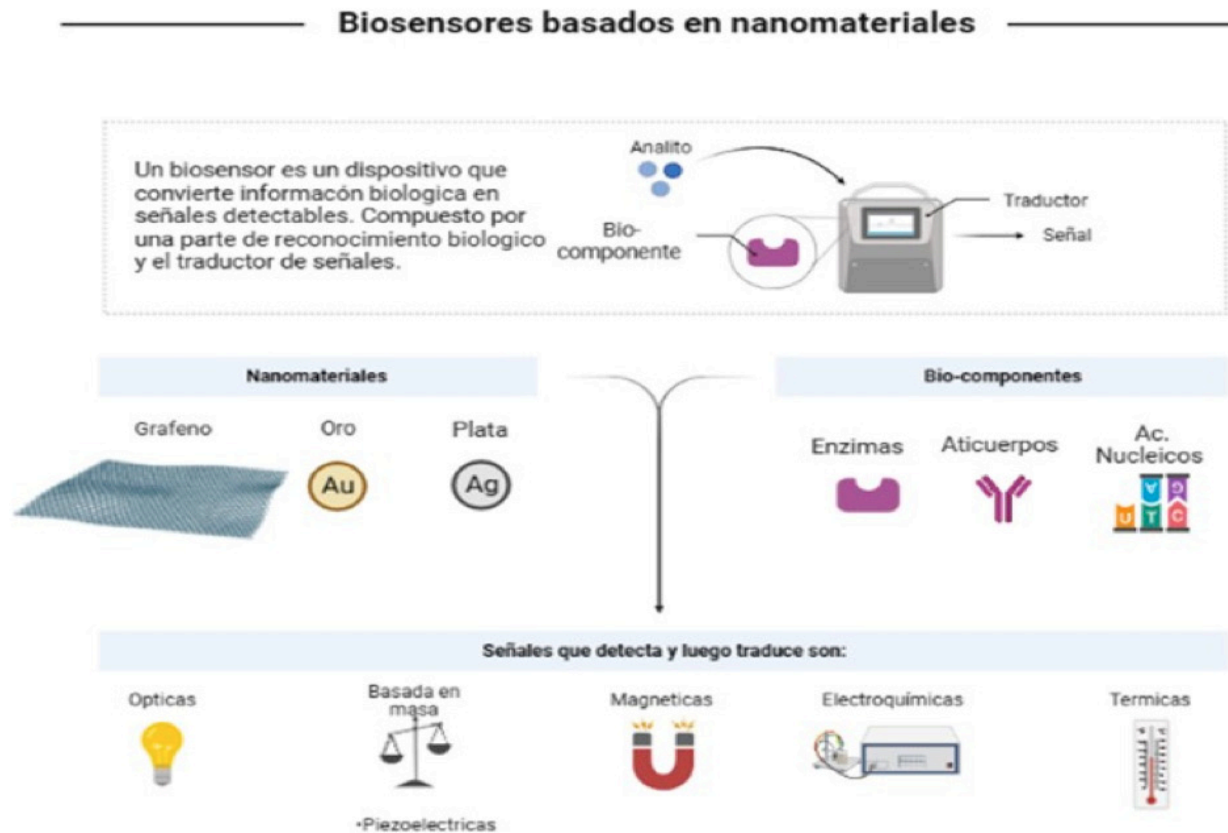


Figura 2. Esquema que representa las partes básicas de un biosensor basado en nanomateriales: Los biosensores están compuestos por un componente biológico —enzimas, aptámeros, anticuerpos, proteínas o ADN— y un componente que traduce señales — ópticas, eléctricas, electroquímicas, magnéticas o térmicas—. Cuando se utilizan nanomateriales en esta parte se mejora el rendimiento para obtener estas señales.

Mao y colaboradores informan de un método colorimétrico sin uso de etiquetas para detectar VPH-16 y 18, usando nanopartículas de oro (NPAu). El ensayo se realiza con base en la detección de genes por la modulación de interacciones entre ADN de doble cadena (dsADN), Sso7d y NPAu. Para la detección de VPH se basa bajo el principio de fragmentación de genes diana. Para lograr la interacción entre proteínas de ADN y las NPAu se usó el complejo Cys-Sso7d. Sso7d es una proteína cromosómica de alta estabilidad térmica, ácida y química. El complejo Sso7d-NPAu no presentó buena integración, por lo que se le agregó cisteína (Cys) en el extremo N terminal para que las NPAu tengan mejor adherencia.

La sonda utiliza la región L1 amplificada por cebadores y el gen E1 incubado en Cys-Sso7d funcionando como genes diana. Los autores utilizaron muestras clínicas (n=52) para medir la eficacia de detección del VPH de alto riesgo obteniendo un rendimiento del 92.3% para la detección de VPH-16 y del 88.3% para VPH-18.

Pareek (2021) reporta el desarrollo de un genosensor electroquímico impedimétrico basado en ADN ultrasensible, selectivo y sin etiquetas para detectar VPH-18. Para ello, inmovilizó una sonda de ADN de 25 nucleótidos de cadena sencilla en un electrodo ITO modificado con nano-puntos de carbono dopado con nitrógeno (N-CD). La sonda, consiste en una secuencia conservada del serotipo VPH-18 buscando el gen E6 que al usar N-CD proporciona una mejor plataforma para detectarlo debido a su carga positiva, permitiendo la interacción entre el DNA y los nanopuntos de carbono.

Aspermair y colaboradores construyeron un dispositivo de detección de VPH-16 donde el blanco es la proteína E7. El dispositivo está construido con óxido de grafeno reducido (rGO) anclado a microelectrodos fusionados con aptámeros de ARN Sc5-c3. El dispositivo se basa en el monitorear la unión de la proteína E7 al aptámero formando el complejo aptámero-VPH-16 E7; la medición se hace en tiempo real obteniendo un 95% de nivel de confianza. La ventaja de este método para aplicaciones clínicas es que detecta la proteína VPH-16 E7 en saliva. Este método es de vital importancia dado que actualmente los métodos para detectar VPH oral no están aún bien establecidos, se pueden realizar PCR, sin embargo, los protocolos son pocos y la tasa de nivel de confianza son desconocidos, por lo que este método aporta mucho al campo clínico.

Espinosa, por su parte, diseñó un prototipo de un biosensor electroquímico para detectar VPH-16 basado en el método de "ultra relajación". Este método utiliza propiedades conformacionales de los bioelectrodos para obtener un cambio de la resistencia de transferencia de carga por reacciones redox producida por la hibridación del ADN, inmovilizado en electrones serigrafiados (SPE) y el ADN del VPH-16. La medición electroquímica se realiza utilizando un SPE con un disco de Au anclado con una capa de sonda de oligonucleótidos blanco al VPH-16, los oligonucleótidos fueron diseñados para detectar el gen L1 del VPH-16.

Otro ejemplo de biosensor electroquímico que utiliza rGO es el de Mahmoodi, donde utiliza rGO y nanotubos de carbono soportados en un electrodo de carbono serigrafiado (ECS) a esto se le agrega AuNP que son utilizadas para inmovilizar la sonda de ADN monocatenario con el objetivo de identificar DNA de VPH-18.

Shariati creó un biosensor impedimétrico de VPH-16 basado en nanotubos de oro (AuNTs) en detección libre de etiquetas. Utiliza una plantilla de policarbonato nanoporoso y los AuNTs (AuNTs-PC) como electrodo del biosensor, la sonda de ADN monocatenario de VPH-16 se inmovilizó en el electrodo AuNTs-PC. Los biosensores electroquímicos han demostrado que tiene gran versatilidad utilizando diferentes sistemas como los ya mencionados antes.

CONCLUSIONES

En conclusión, la nanotecnología ha emergido como una herramienta poderosa en el campo de la detección del virus del papiloma humano (VPH), un patógeno que representa una seria amenaza para la salud pública debido a su alta prevalencia y su asociación con el desarrollo de cáncer. A pesar de la existencia de métodos de diagnóstico convencionales, como el Papanicolau y pruebas moleculares, éstos enfrentan limitaciones significativas en términos de costo, complejidad y precisión.

La aplicación de nanomateriales en la construcción de biosensores ha abierto nuevas perspectivas para la detección del VPH. Estos biosensores exhiben características deseables, como alta sensibilidad, respuesta rápida y capacidad de funcionar sin etiquetas costosas.

Los resultados obtenidos con estos biosensores son prometedores, con altas tasas de detección de los genotipos de alto riesgo del VPH, como el VPH-16 y el VPH-18. Además, algunos de estos dispositivos permiten la detección en muestras clínicas, como saliva, lo que representa un avance significativo en el diagnóstico del VPH en entornos clínicos y comunitarios.

La nanotecnología ofrece la posibilidad de superar las limitaciones de los métodos de diagnóstico tradicionales, mejorando la precisión y la accesibilidad de las pruebas para el VPH. Estos avances no sólo son cruciales para la detección temprana y el tratamiento de las infecciones por VPH, sino que también pueden tener un impacto positivo en la prevención del cáncer cervical y otras afecciones relacionadas con este virus.

En resumen, la convergencia de la nanotecnología y la medicina está abriendo nuevas fronteras en la detección y el tratamiento de enfermedades virales; a su vez, la aplicación de biosensores basados en nanomateriales representa un paso significativo hacia la mejora de la salud pública y el bienestar de la población. A medida que la investigación en este campo continúa avanzando, es probable que veamos un mayor desarrollo y refinamiento de estas tecnologías, lo que podría revolucionar la forma en que abordamos la detección y el diagnóstico del VPH y otras enfermedades infecciosas.

REFERENCIAS

1. Araldi RP, Sant'Ana TA, Módolo DG, de Melo TC, Spadacci-Morena DD, de Cassia Stocco R, Cerutti JM, de Souza EB. (2018) The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomed Pharmacother.* Vol (106). doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.149>
2. Aspermaier, P., Mishyn, V., Binting, J., Happy, H., Bagga, K., Subramanian, P., Knoll, W., Boukherroub, R., & Szunerits, S. (2020). Reduced graphene oxide-based field effect transistors for the detection of E7 protein of human papillomavirus in saliva. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol 413(3), 779-787. <https://doi.org/10.1007/S00216-020-02879-Z/FIGURES/5>
3. Bhatla, N., & Singhal, S. (2020). Primary HPV screening for cervical cancer. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* (Vol. 65). <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.02.008>
4. Bodunde, O. P., Ikumapayi, O. M., Akinlabi, E. T., Oladapo, B. I., Adeoye, A. O. M., & Fatoba, S. O. (2021). A futuristic insight into a "nano-doctor": A clinical review on medical diagnosis and devices using nanotechnology. *Materials Today: Proceedings*, 44, 1144-1153. <https://doi.org/10.1016/j.MATPR.2020.11.232>
5. Deng, J., Zhao, S., Liu, Y., Liu, C., & Sun, J. (2021). Nanosensors for Diagnosis of Infectious Diseases. *ACS Applied Bio Materials*, 4(5), 3863-3879. https://doi.org/10.1021/ACSABM.0C01247/ASSET/IMAGES/LARGE/MTOC01247_0006.JPEG

6. Espinosa, J. R., Galván, M., Quiñones, A. S., Ayala, J. L., Ávila, V., & Durón, S. M. (2021). Electrochemical Resistive DNA Biosensor for the Detection of HPV Type 16. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 3436, 26(11), 3436. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26113436>
7. Gohar, A., Ali, A. A., Elkhatib, W. F., El-Sayyad, G. S., Elfadil, D., & Noreddin, A. M. (2022). Combination therapy between prophylactic and therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines with special emphasis on implementation of nanotechnology. *Microbial Pathogenesis*, 171, 105747. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2022.105747>
8. Harper, D. M., DeMars, L. R. (2017). HPV vaccines - A review of the first decade. *Gynecologic Oncology*, 146(1), 196-204. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2017.04.004>
9. Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology. *Http://Dx.Doi.Org/10.1177/0960327115603588*, 34(12), 1318-1321. <https://doi.org/10.1177/0960327115603588>
10. Kumar, R., Kumar, M., & Luthra, G. (2023). Fundamental approaches and applications of nanotechnology: A mini review. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2022.12.172>
11. Leon, L., Chung, E. J., & Rinaldi, C. (2020). A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications. *Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications*, 1-4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00001-1>
12. Mahmoodi, P., Rezayi, M., Rasouli, E., Avan, A., Gholami, M., Ghayour Mobarhan, M., Karimi, E., & Alias, Y. (2020). Early-stage cervical cancer diagnosis based on an ultra-sensitive electrochemical DNA nanobiosensor for HPV-18 detection in real samples. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/S12951-020-0577-9/TABLES/4>
13. Mao, J. Y., Li, H. W., Wei, S. C., Harroun, S. G., Lee, M. Y., Lin, H. Y., Chung, C. Y., Hsu, C. H., Chen, Y. R., Lin, H. J., & Huang, C. C. (2017). DNA Modulates the Interaction of Genetically Engineered DNA-Binding Proteins and Gold Nanoparticles: Diagnosis of McNeil, S. E. (2005). *Nanotechnology for the biologist. Journal of Leukocyte Biology*, 78(3), 585-594. <https://doi.org/10.1189/JLB.0205074>
14. Pandey, S. (2022). Advance Nanomaterials for Biosensors. *Biosensors*, 12(4), 2.19. <https://doi.org/10.3390/BIOS12040219>
15. Pareek, S., Rout, V., Jain, U., Bharadwaj, M., & Chauhan, N. (2021). Nitrogen-Doped Carbon Dots for Selective and Rapid Gene Detection of Human Papillomavirus Causing Cervical Cancer. *ACS Omega*, 6(46), 31037-31045. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.1C03919/ASSET/IMAGES/MEDIUM/A01C03919_M006.GIF
16. Pinatti LM, Walline HM, Carey TE.(2018) Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer. *J Dent Res*. Vol (6):691-700. doi: <https://doi.org/10.1177/0022034517744213>
17. Raff AB, Woodham AW, Raff LM, Skeate JG, Yan L, Da Silva DM, Schelhaas M, Kast WM. (2013) The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol*. Vol (11):6062-72. doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00330-13>

18. Romero, N., (2001). Reseña histórica de la citopatología y los orígenes del Papanicolaou. *Anales de la Facultad de Medicina* , 62 (4), 342-346.
19. Sahu, T., Ratre, Y. K., Chauhan, S., Bhaskar, L. V. K. S., Nair, M. P., & Verma, H. K. (2021). Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*,63, 102487. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102487>
20. Shariati, M., Ghorbani, M., Sasanpour, P., & Karimizefreh, A. (2019). An ultrasensitive label free human papilloma virus DNA biosensor using gold nanotubes based on nanoporous polycarbonate in electrical alignment. *Analytica Chimica Acta*, 1048, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.062>
21. Smith ER, George SH, Kobetz E, Xu XX. (2018) New biological research and understanding of Papanicolaou's test. *Diagn Cytopathol*. Vol 46(6):507-515. doi: <https://doi.org/10.1002/dc.23941>
22. Tlučková, K., Marušič, M., Tóthová, P., Bauer, L., Šket, P., Plavec, J., Viglasky, V. (2013). Human papillomavirus G-quadruplexes. *Biochemistry*, 52(41), 7207-7216. <https://doi.org/10.1021/BI400897G>
23. Tommasino, M. (2014). The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*,26, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.11.002r>
24. Van Doorslaer, K. (2013). Evolution of the Papillomaviridae. *Virology*, 445(1-2), 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.012>
25. Wierzbicka, M., Klusmann, J. P., San Giorgi, M. R., Wuerdemann, N., & Dikkers, F. G. (2021). Oral and laryngeal HPV infection: Incidence, prevalence and risk factors, with special regard to concurrent infection in head, neck and genitals. *Vaccine*, 39(17), 2344-2350. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.047>
26. Zamani, M., Robson, J. M., Fan, A., Bono, M. S., Furst, A. L., & Klapperich, C. M. (2021). Electrochemical Strategy for Low-Cost Viral Detection. *ACS Central Science*,(6),963-972. Doi: https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00186/ASSET/IMAGES/LARGE/OC1C00186_0005
27. Zink D, Fischer AH, Nickerson JA.(2004) Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. Vol 4(9):677-87. doi: <https://doi.org/10.1038/nrc1430>