



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Sistema de detección múltiple para la identificación de secuencias de la familia $\alpha 7$ del virus del papiloma humano

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:
DENISE LEXY ALANIZ BARRAZA

ASESOR: Dr. Mauricio Salcedo Vargas
COASESOR: M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO. 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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 titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Sistema de detección múltiple para la identificación de secuencias de la familia $\alpha 7$ del virus del papiloma humano.

Que presenta la pasante: **Denise Lexy Alaniz Barraza**

Con número de cuenta: **414017876** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de Mayo de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
VOCAL	QFB. Nydia Berenice González Angeles	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Alma Barraza, por ser el apoyo en todo lo que me propongo, por jamás dudar de mí y por interesarse siempre en mis locas pasiones. Gracias por nunca soltarme manita.

A mi padre por ser bondad pura, por tu paciencia, amor y sonrisa eterna. Gracias papá por sembrar en mí el interés en la ciencia incluso antes de que pudiera darme cuenta, sin ti no sería este mi camino.

A la Profesora Ana Laura, por ofrecerme su ayuda para encontrar rumbo dentro de esta área que me resulto tan fascinante, por el tiempo y la confianza depositada en mí.

Al Dr. Mauricio Salcedo por aceptarme como parte de su grupo de investigación, por todos los consejos, enseñanzas, por todo su tiempo y especialmente por el gran apoyo que me brindó con aquel tema. Le agradezco tanto la confianza puesta en mí y la gran oportunidad de realizar este trabajo que me ha dado un camino en la vida.

A mis compañeros del laboratorio por la paciencia y las enseñanzas, Vic, Mri, Isma, Consuelo, Guapo y especialmente a Keiko por toda la ayuda y orientación para hacer esto posible.

A Ximena, siempre he de decir que ella es lo más bonito que el VPH dejó en mi vida, sobra decir lo feliz que me hace haberla conocido y haber compartido tanto a raíz del laboratorio.

A Gustavo, por ser tan buen amigo, el tipo de amigo que te hace sentir paz en momentos muy difíciles.

A mis bioquímicos favoritos Adrián, Jacqueline y Josué, mis incondicionales. En mis mejores historias siempre están presentes. Ustedes me han mostrado siempre el lado más sincero de la amistad.

Agradezco a mi familia también, a mi Guillita por siempre preocuparse por mí, tía Soni por acompañarme siempre y ser una segunda madre. Mamí Gelos, por ponerme en tus oraciones diarias y enseñarme el lado más dulce de la vida. Y a mi abuelo, porque sé el gran gusto que esto le hubiera dado, pero igual ahora mismo está feliz y en paz.. yo también te extraño.

A mis Wádiz por ese amor tan bonito del que cada año me siento más orgullosa. En especial a mi Emi, por compartir este proceso de manera tan íntima y ser un apoyo constante, por ayudarme a fortalecer mi alma y mi paciencia.

Y a ese último empujoncito que me hacía falta y que me llegó desde muy muy lejos, fuiste eso POCUITO que me hacía falta para concluir con algo importante. Dhan'yabāda.

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo, con mucho amor y como manifestación de fuerza, a todas las mujeres que han cursado un diagnóstico positivo para VPH y sus complicaciones, dedicado a ellas porque no quiero que se sientan solas nunca más, que el silencio no les dañe, porque sé que son almas bellas y que a veces sólo hace falta poder aceptar que un virus de estos no define quién eres. Ustedes mujeres que están en la lucha, son fuerza, son amor y son perfectas. De todo corazón, un abrazo. Que nunca nadie les haga dudar cuan valiosas son.

Y una dedicación más a mi mejor amiga, la mujer más bella, dulce y valiosa, Steffy. Porque crecer contigo es el mejor regalo que me dio la vida. Eres bondad, determinación y convicción. Juntas seguiremos creciendo. Por los 18 años que llevas siendo la mejor persona para mí no me bastaba un agradecimiento, para ti hermana es este trabajo.

Este proyecto se desarrolló en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, UIMEO, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS



Índice

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Cáncer.....	9
Cáncer cervicouterino.....	9
Cérvix.....	9
Incidencia mundial y en México.....	11
Relación del CaCU con VPH.....	11
Etiología del CaCU (Integración del virus).....	13
Patogenia.....	15
Lesiones causadas por VPH.....	15
Estructura y Taxonomía de los papillomavirus.....	16
Grupos de alto y bajo riesgo.....	19
Importancia de los <i>Alphapapillomavirus</i>	20
Familia $\alpha 7$ del VPH.....	21
Factores de riesgo.....	22
Vacunas.....	23
Métodos de detección.....	24
Oligonucleótidos y PCR.....	28
JUSTIFICACIÓN.....	34
OBJETIVOS.....	34
Objetivo general.....	34
Objetivos particulares.....	34
HIPÓTESIS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Diseño del par de oligonucleótidos.....	35
Obtención de secuencias.....	35
Alineamiento.....	36
Diseño de oligonucleótidos.....	36
Procesamiento de muestras.....	36
Extracción de ADN.....	36
Cuantificación.....	37
Electroforesis.....	37
Tipificación de las muestras.....	37
Estandarización de oligonucleótidos.....	38
Electroforesis de los productos de reacción.....	39
Purificación de bandas.....	39
Análisis de resultados de secuenciación.....	40
RESULTADOS.....	40
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS.....	52
ANEXOS.....	56

Índice de tablas

Tabla 1. Géneros de virus de papiloma y organismos hospederos	17
Tabla 2. Proteínas del virus y funciones asociadas	19
Tabla 3. Clasificación de los tipos de VPH asociados a lesiones	20
Tabla 4. Clasificación de las familias del género Alphapapillomavirus	21
Tabla 5. Vacunas contra preventivas contra VPH	23
Tabla 6. Métodos comerciales para identificación y tipificación moleculares del VPH	25
Tabla 7. Reactivos	35
Tabla 8. Criterios de selección para el par de oligonucleótidos	36
Tabla 9. Tipificación de muestras con <i>Linear Array</i> e <i>INNO LiPA</i>	37
Tabla 10. Tipo viral de las líneas celulares empleadas	39
Tabla 11. Oligonucleótidos diseñados para detección del gen L1	41
Tabla 12. Alineamiento global del par de iniciadores A7F/R usando " <i>Primer BLAST</i> "	42
Tabla 13. Cuantificación de ADN de las bandas recuperadas	45
Tabla 14. Resultados de hibridación de las bandas secuenciadas	48

Índice de figuras

Figura 1. Mortalidad por CaCU en Latinoamérica	9
Figura 2. Anatomía del útero	10
Figura 3. Número estimado de muertes en mujeres mexicanas desde los 0 a 74 años	11
Figura 4. Casos internacionales de cáncer en mujeres asociados a agentes infecciosos	12
Figura 5. Porcentaje de cánceres en mujeres, por región, atribuidos a infecciones	12
Figura 6. Progresión de la infección por VPH a CaCU asociada a la integración viral	14
Figura 7. Progresión de lesiones intraepiteliales	16
Figura 8. Organización del genoma de VPH	18
Figura 9. Prevalencia de diferentes tipos de VPH AR en 10058 casos internacionales de CaCU según tipo histológico	22
Figura 10. Pasos principales de la PCR	29
Figura 11. Reacciones en líneas celulares efectuadas a 55 y 58°C	43
Figura 12. Resultado de reacción de PCR efectuada a 62°C utilizando líneas celulares	44
Figura 13. Reacción de PCR efectuada en muestra clínica a 60 y 62°C	44
Figura 14. Reacción de PCR efectuada en muestra clínica a 62°C	45
Figura 15. Cromatograma de secuenciación de la banda 1 (B1) a partir del oligo " <i>Forward</i> " (A7FB1). Imagen de <i>SnapGene</i>	46
Figura 16. Cromatograma de secuenciación de la banda 1 (B1) a partir del oligo " <i>Reverse</i> " (A7RB1). Imagen de <i>SnapGene</i>	46
Figura 17. Cromatograma de secuenciación de la banda 2 (B2) a partir del oligo " <i>Forward</i> " (A7FB2). Imagen de <i>SnapGene</i>	47
Figura 18. Cromatograma de secuenciación de la banda 2 (B2) a partir del oligo " <i>Reverse</i> " (A7RB2). Imagen de <i>SnapGene</i>	47
Figura 19. Cromatograma de secuenciación de la banda 3 (B3) a partir del oligo " <i>Forward</i> " (A7FB3). Imagen de <i>SnapGene</i>	47
Figura 20. Cromatograma de secuenciación de la banda 3 (B3) a partir del oligo " <i>Reverse</i> " (A7RB3). Imagen de <i>SnapGene</i>	48

ABREVIATURAS

A7	Alpha 7
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Alto riesgo
ASCUS	Células escamosas atípicas de significado indeterminado (por sus siglas en inglés: <i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>)
BR	Bajo riesgo
CaCU	Cáncer Cervicouterino
CFSs	Sitios frágiles comunes (por sus siglas en inglés: <i>Common Fragile Sites</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos (por sus siglas en inglés: <i>Food and Drug Administration</i>)
HSG-1	Virus del Herpes Simple Genital tipo 1
HSG-2	Herpes Simple Genital tipo 2
HSIL	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (por sus siglas en inglés: <i>High grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>)
HTLV	Virus inotrópico de células T humanas (por sus siglas en inglés: <i>The human T-lymphotropic virus</i>)
ITS	Infección de transmisión sexual
LCR	Región larga de control (por sus siglas en inglés: <i>Long Control Region</i>)
LSIL	Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (por sus siglas en inglés: <i>Low grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>)
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
PaVe	<i>Papillomavirus Episteme</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PV	Papiloma virus
Ta	Temperatura de alineamiento
Tm	Temperatura de fusión
VIH	Virus de inmunodeficiencia humano
VPH	Virus del papiloma humano

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCU) es un problema de salud de gran importancia tanto a nivel internacional como nacional, reconociéndose como la cuarta causa de muerte por neoplasia en mujeres a nivel mundial. Este tipo de cáncer está estrechamente relacionado a la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) ya que se ha encontrado en el 99.8% de los casos. En la actualidad se considera que el CaCU es una de las neoplasias potencialmente curables. La posibilidad de detectar en forma temprana esta neoplasia hace factible reducir la mortalidad secundaria al padecimiento.

El CaCU normalmente está precedido por lesiones precursoras, incluso hasta por más de 10 años antes. Sin embargo, los análisis citológicos para detección del VPH en ocasiones no identifican a un gran grupo de mujeres ya que no presentan anomalías citológicas, aunque alberguen tipos de VPH con un potencial progresivo. Por lo tanto, las pruebas moleculares para sólo un subconjunto de tipos de alto riesgo representan un beneficio costo-efectividad. Se estima que de los más de 150 tipos de VPH identificados, alrededor de 60 están asociados a lesiones anogenitales, intraepiteliales e invasoras y pertenecen al género Alphapapillomavirus. Los VPH tipo 18 y 45 de la familia Alpha 7, perteneciente a dicho género, en conjunto representan aproximadamente el 20% de incidencia en todos los casos de CaCU, destacando además que el VPH 18 se posiciona como predominante para los casos de adenocarcinoma con un porcentaje global de 37.7% considerándose así, como un grupo de gran importancia en la progresión de carcinomas.

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un método de detección para los tipos virales 18 y 45 de alto riesgo y mayor incidencia pertenecientes a la familia Alpha 7, mediante la creación de un par de oligonucleótidos para PCR punto final a partir del gen L1. Para llevar a cabo este trabajo se realizó el diseño del par de oligonucleótidos para la identificación de ambos tipos de VPH, posteriormente se realizó la técnica de PCR punto final para la amplificación de los fragmentos del gen L1 y se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa. Los oligonucleótidos fueron evaluados tanto en líneas celulares con CaCU como en muestras clínicas.

A partir de los resultados de amplificación en líneas celulares con CaCU, se obtuvieron datos sobre sitios de integración del VPH que reiteran la capacidad de este virus para integrarse en diferentes puntos del genoma humano, poniendo de nueva cuenta en consideración que las posibilidades de inserción del VPH en el genoma del hospedero comprenden más puntos que los ya conocidos "*hotspots*", así mismo los resultados aportan datos sobre la tendencia de integración viral en sitios frágiles.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es una enfermedad en la cual se desarrolla un crecimiento anormal y diseminado de células que al avanzar entre los tejidos normales provocan su destrucción alterando por tanto su funcionamiento e inicia de manera localizada. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo (WHO, 2018).

Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCU) es un problema de salud de gran importancia tanto a nivel nacional como internacional, reconociéndose actualmente como la cuarta causa de muerte por neoplasia en mujeres a nivel mundial y ocupando una posición más alarmante en Latinoamérica ya que representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres (Globocan, 2018). Este tipo de cáncer está estrechamente relacionado a la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) ya que se ha encontrado en el 99.8% de los casos (López y Lizano, 2006; Zhang, 2015).

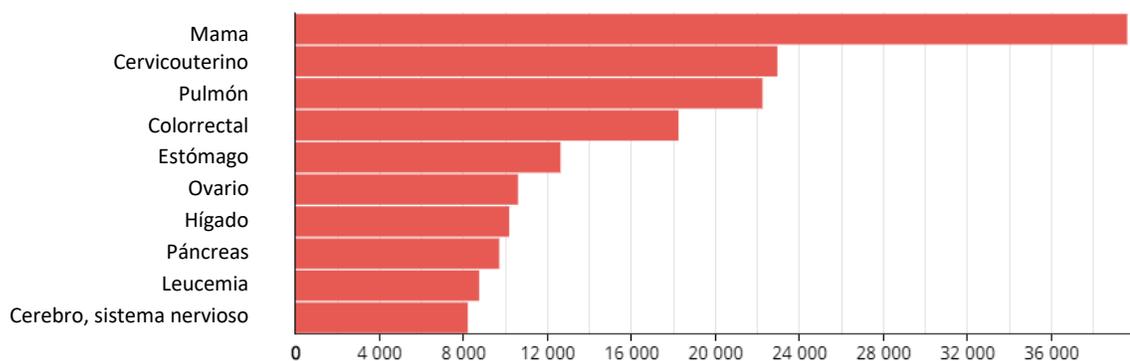


Figura 1. Mortalidad por CaCU en Latinoamérica hasta 2012. (GLOBOCAN, 2018).

En el cérvix se reconocen dos tipos histológicos de carcinomas: el de células escamosas, y el adenocarcinoma. El primero se origina en el epitelio plano estratificado que recubre el exocérnix (o ectocérnix) y el segundo en el epitelio cilíndrico que tapiza el canal endocervical.

Cérnix

El cuello uterino, o cérvix, constituye la porción inferior del útero. Está constituido por una parte interna o endocérnix, en contacto con el cuerpo uterino, y otra externa o exocérnix, que asoma a la vagina.

→ **Endocérvix**

Revestido por un epitelio cilíndrico simple, con células epiteliales mucosas y algunas ciliadas interpuestas en la parte superior del cérvix. Este epitelio cubre la superficie de la mucosa y reviste sus pliegues, hendiduras y túbulos. Los núcleos son pequeños y se localizan en el polo basal durante la fase proliferativa precoz.

Las células de reserva del epitelio endocervical, además de presentar rasgos citológicos propios de las células de reserva (pequeñas, con poco citoplasma y sin signos de diferenciación), tienen un citoesqueleto diferente del de las células cilíndricas mucosas.

→ **Exocérvix**

Va desde el orificio cervical externo y asoma hacia la vagina. Está revestido por un epitelio plano estratificado no queratinizado que se continúa con el de la vagina. La zona de transición entre el epitelio mucoso endocervical y el escamoso exocervical es brusca.

Las distintas capas celulares del exocérvix son positivas para citoqueratinas propias de las células de los epitelios escamosos.

La diferente composición en citoqueratinas de las células de reserva y sus capacidades bipotenciales para diferenciarse pueden explicar por qué y cómo ambos epitelios en la unión escamosa-columnar responden a las influencias regeneradoras y reparativas iniciadas por la eversión del endocérvix y la especial sensibilidad de la zona de transformación (el 95% de los cánceres se originan en la zona de transformación) (Buy y Ghossain, 2013).

La gran importancia médica de esta zona de transformación radica en su sensibilidad a infectarse por determinados tipos de virus (como el VPH). La zona de transformación, que se localiza entre el restante epitelio mucoso endocervical y el primitivo epitelio escamoso exocervical.

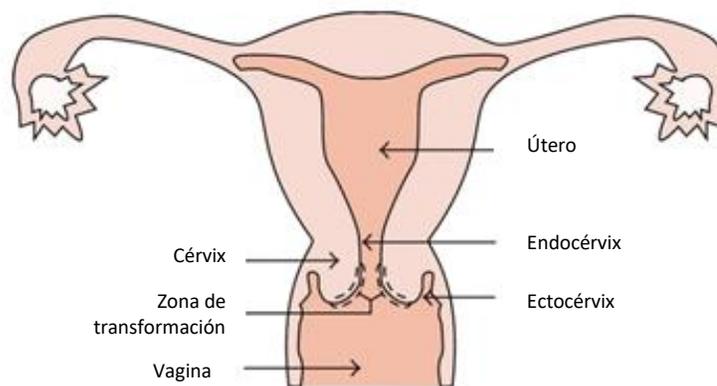


Figura 2. Anatomía del útero (Modificado de Bengtsson y Malm, 2014).

En la actualidad se considera que el CaCU es una de las neoplasias potencialmente curables. La posibilidad de detectar en forma temprana esta neoplasia hace factible reducir la mortalidad secundaria al padecimiento.

Incidencia mundial y en México

Como ya se mencionó anteriormente el CaCU es la cuarta causa de muerte por neoplasia en mujeres alrededor del mundo. Sin embargo, en México representa la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres de más de 25 años (GLOBOCAN, 2018).

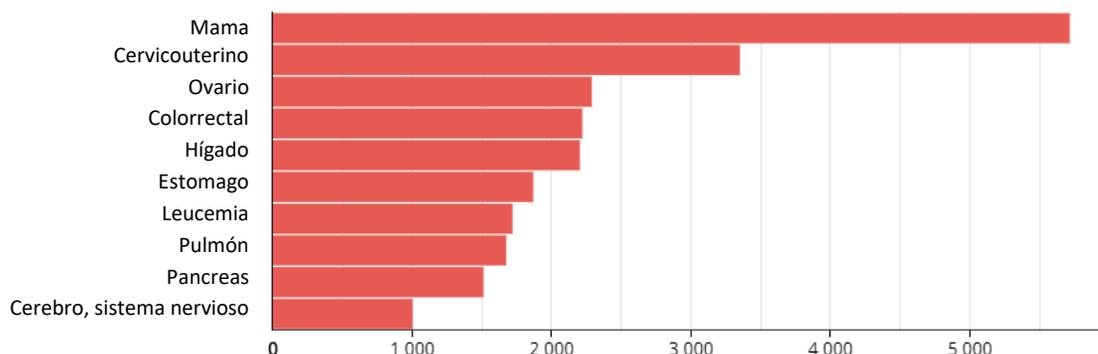


Figura 3. Número estimado de muertes en mujeres mexicanas desde los 0 a 74 años hasta 2012. (GLOBOCAN, 2018).

Gracias al boletín epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica se sabe también que en 2019 hasta la semana 29 de vigilancia epidemiológica los tres estados que reportan más casos son: Ciudad de México en primer lugar seguida por Jalisco e Hidalgo.

Relación del CaCU con VPH

En 1977 Zur Hausen sugirió que podía existir asociación entre VPH y cáncer cervical. Desde entonces numerosos estudios epidemiológicos han establecido la relación causal entre la infección viral y el desarrollo de neoplasias de cuello uterino. Aunque se ha encontrado secuencias virales del VPH en 99.8% de los casos de CaCU se cree es una causa necesaria pero insuficiente para el desarrollo de carcinomas invasivos en dicha zona.

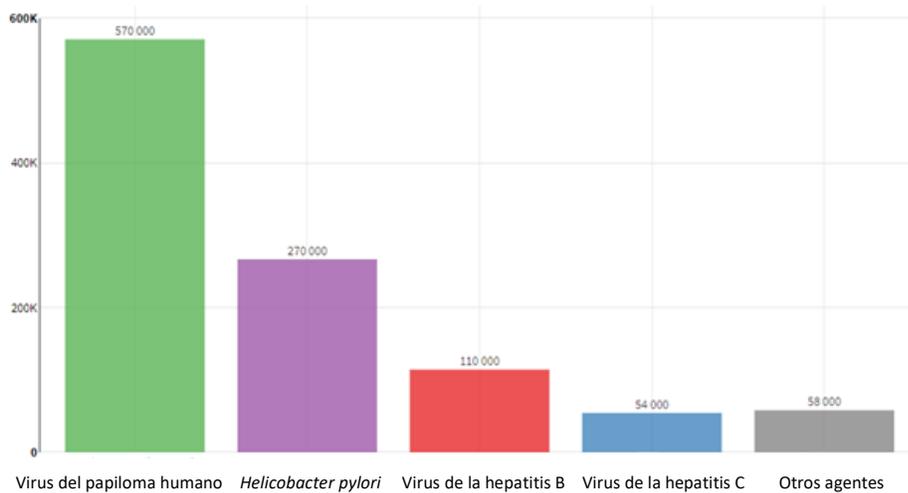


Figura 4. Casos internacionales de cáncer en mujeres asociados a agentes infecciosos hasta 2012 (GLOBOCAN, 2018).

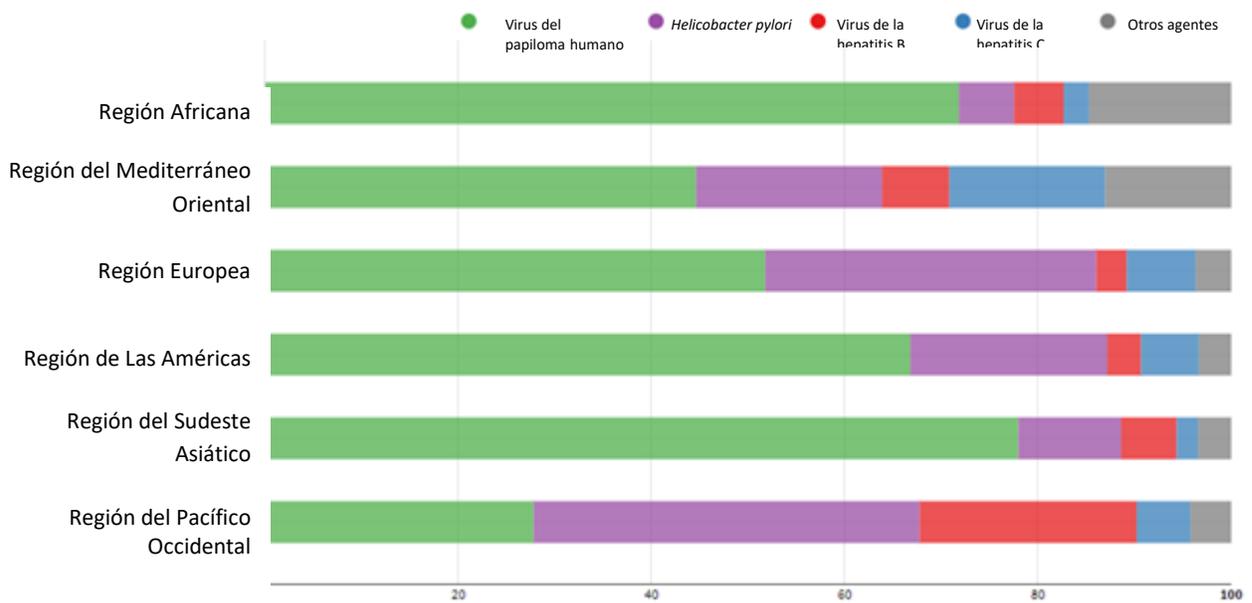


Figura 5. Porcentaje de cánceres en mujeres, por región, atribuidos a infecciones hasta 2012 (GLOBOCAN, 2018).

Como se puede observar en las gráficas, el VPH es el agente infeccioso que lidera los casos de cáncer en mujeres en todo el mundo; sin embargo, no todas las personas que adquieren la infección progresan hasta CaCU. Uno de los procesos que parece estar más involucrado en el origen de las células malignas es el evento de integración del virus al genoma del hospedero a partir de lo cual hay una alteración genética importante que caracteriza las lesiones malignas y que se relaciona con la pérdida o inactivación de genes que pueden desarrollar la enfermedad a largo plazo (López y Ancízar, 2006).

Hasta la fecha se han identificado más de 100 tipos de VPH de los cuales aproximadamente 40 infectan el tracto genital, siendo ésta una infección de transmisión sexual (ITS) presente en un

80% de la población mundial con vida sexual activa. Al ser tan alta su incidencia se considera que la mayoría de las mujeres la contraen casi inmediatamente después de haber iniciado su vida sexual, con la más alta prevalencia en jóvenes con menos de 25 años, aunque más estudios han encontrado también otro pico de infección en aquellas mayores que están cercanas a la edad en la cual aumenta la incidencia de cáncer (Woodman, 2007).

Etiología del CaCU (Integración del virus)

El VPH es principal agente etiológico del CaCU ya que éste es el resultado de una infección previa, son pocas las excepciones en las que la neoplasia no está asociada al virus (Arévalo *et al*, 2017). Dentro de una célula infectada el ADN viral puede encontrarse tres maneras:

- integrado al genoma celular (forma integrada)
- libre en el núcleo celular (forma episomal)
- compartiendo las formas integrada y episomal (forma mixta) (López y Ancízar, 2006).

El primer paso en una infección es la adhesión de viriones intactos a células de un epitelio escamoso a partir de lo cual pueden ocurrir dos tipos de infecciones: productivas o latentes.

En la infección de tipo latente, la infección ocurre predominantemente en células inmaduras (células basales o células metaplásicas) del epitelio escamoso. El ADN viral permanece dentro de la célula en forma circular libre (forma episomal) sin replicarse. No hay cambios morfológicos identificables en la citología, por lo que la detección viral en este tipo de infecciones solo puede hacerse por métodos moleculares.

En las infecciones productivas o activas, el virus se integra al genoma del hospedero y la replicación viral se lleva a cabo principalmente en células escamosas ya diferenciadas, esto es, en las capas intermedia y superficial del epitelio escamoso, en donde ocurre una intensa actividad de replicación del ADN viral, con producción de proteínas de la cápside y ensamblaje de nuevos viriones, los cuales producen cambios celulares característicos sobre las células infectadas. El efecto citopático que se ha observado incluye vacuolización citoplásmica prominente, atipia nuclear y binucleación (De la Fuente *et al*, 2010). En el evento de integración mantiene una estrecha relación con el aumento en la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 (López y Ancízar, 2006).

La oncoproteína E6 del VPH se une a p53 y esta unión produce la degradación de la proteína p53, proteína que es un importante represor o controlador del crecimiento y diferenciación celular en parte por estimulación de las proteínas p21 y p16. Así mismo la proteína E7 parece impedir la regulación del crecimiento celular mediante una unión competitiva con la ciclina A1, la proteína p107 y con la proteína del retinoblastoma (pRb), que regulan la progresión de las

células desde la fase G1 a la fase S. Esto causa una importante pérdida del control de la proliferación celular y da como resultado una proliferación no controlada (De la Fuente *et al*, 2010). La expresión de estas proteínas se ha visto asociada a la disrupción del gen E2 como parte de la integración viral.

En el proceso de integración, la linearización del genoma circular es una etapa necesaria que involucra el rompimiento de la doble cadena viral. Adicional al rompimiento en la mayoría de casos se presentan deleciones de fragmentos virales. En VPH 16 se han identificado diferentes patrones de ruptura de acuerdo a la secuencia viral afectada. Es posible que, así como la dinámica de integración varíe con la población de estudio, ocurra lo mismo con los sitios específicos de corte viral. Con relación a las deleciones, en VPH 16 se han registrado pérdidas en la región E1 y E2, deleciones totales en E4 y E5; y parciales en L1 y L2. En VPH 18 aproximadamente la mitad del genoma viral se pierde en la integración comprometiendo total o parcialmente los genes E2, E4, E5, L1 y L2 (López y Ancízar, 2006).

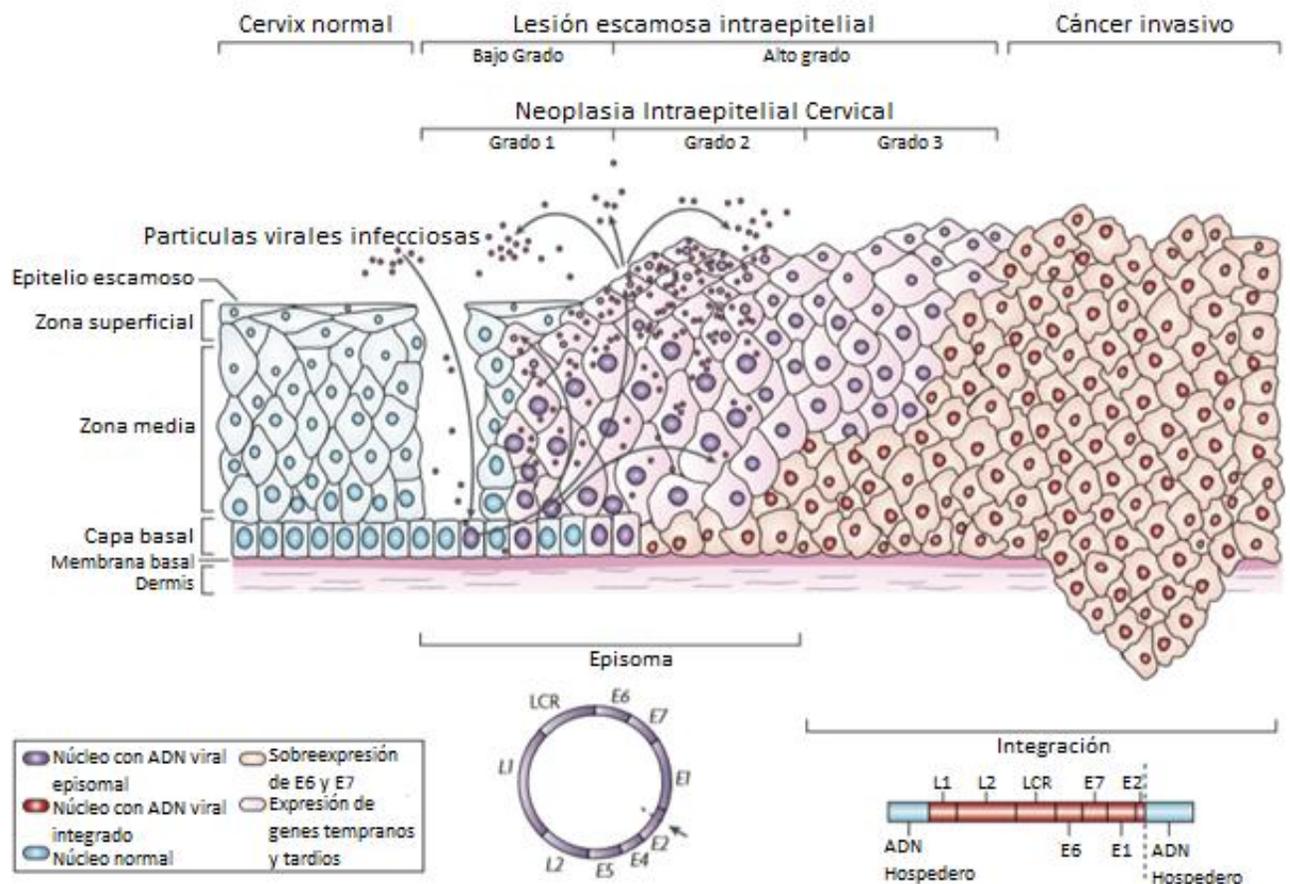


Figura 6. Progresión de la infección por VPH a CaCU asociada a la integración viral (Modificado de Woodman, 2007).

Patogenia

El VPH penetra al hospedero principalmente por abrasiones en el epitelio donde inicia su ciclo infectando a las células poco diferenciadas del epitelio, y allí comienza la transcripción de sus genes. La replicación viral se puede dar en dos ciclos, uno es la infección lítica en la que el virus llega a las células parabasales con gran capacidad de replicación, se introduce, primero en el citoplasma y posteriormente en el núcleo, este ciclo lo presenta el VPH de alto riesgo 16; el otro ciclo en que puede presentarse es la infección lisogénica donde se ve afectado directamente el genoma celular, tal es el caso del VPH de alto riesgo 18. Al alcanzar el núcleo celular el virus se integra al genoma de la célula hospedera, principalmente por la interacción de las proteínas E6 y E7 con p53 y pRB, consideradas como proteínas supresoras de tumores (Vasquez *et al*, 2017).

La sobreexpresión de oncogenes E6 y E7 es el principal factor viral en la patogénesis de displasias de cuello uterino. Actualmente se reconoce que la expresión de los genes E6 y E7 en células epiteliales conduce al desarrollo de inestabilidades cromosomales e induce aneuploidía, así mismo la pérdida de la estabilidad genética del huésped favorece el evento de integración. Las regiones cromosomales donde se presenta mayor incidencia de imbalances así como un alto número de amplificaciones, coinciden con sitios frágiles comunes (CFSs por sus siglas en inglés: *Common Fragile Sites*) y otros locis celulares descritos como sitios de integración celular.

El proceso de inserción viral no sólo afecta la estructura del genoma viral sino también los genes celulares del hospedero interrumpidos durante la integración. Por ahora han identificado más de 230 sitios de integración celular. Aunque actualmente es aceptada la hipótesis en donde se plantea que el evento de integración viral ocurre aleatoriamente a lo largo del genoma, un alto porcentaje de los sitios celulares de integración corresponden a CFSs (López y Ancízar, 2006).

Lesiones causadas por VPH

En 1988 se implementó el Sistema Bethesda, el cual se utiliza para clasificar las diversas características reportadas en la citología del cérvix uterino. Esta clasificación ubica las lesiones intraepiteliales del cérvix uterino: lesiones de bajo grado (LSIL por sus siglas en inglés: *Low grade Squamous Intraepithelial Lesion*) que incluyen las NIC 1 y de alto grado (HSIL por sus siglas en inglés: *High grade Squamous Intraepithelial Lesion*) correspondientes a las NIC 2 y 3, según su riesgo para el desarrollo de carcinoma invasor del cérvix (Figura 7). La importancia de este sistema radica en identificar las lesiones mediante los criterios establecidos, como bajo grado (displasia leve y condiloma), y alto grado (displasia moderada y severa) (De la Fuente *et al*, 2010).

El proceso de la integración y expresión de los oncogenes virales puede darse también en forma incompleta, entonces las células provenientes de la superficie tendrían un crecimiento nuclear menos importante y que pueden ser el equivalente de las células escamosas atípicas de significado no determinado, denominadas como ASCUS por sus siglas en inglés *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*. Por lo contrario, si el proceso se desarrolla en forma completa, las células del epitelio escamoso son identificadas morfológicamente como LSIL, las cuales promueven una replicación productiva del virus (Woodman, 2007) pueden establecerse al inicio y progresar a HSIL con el paso del tiempo, o establecerse al mismo tiempo o en ausencia de HSIL (López y Lizano, 2006).

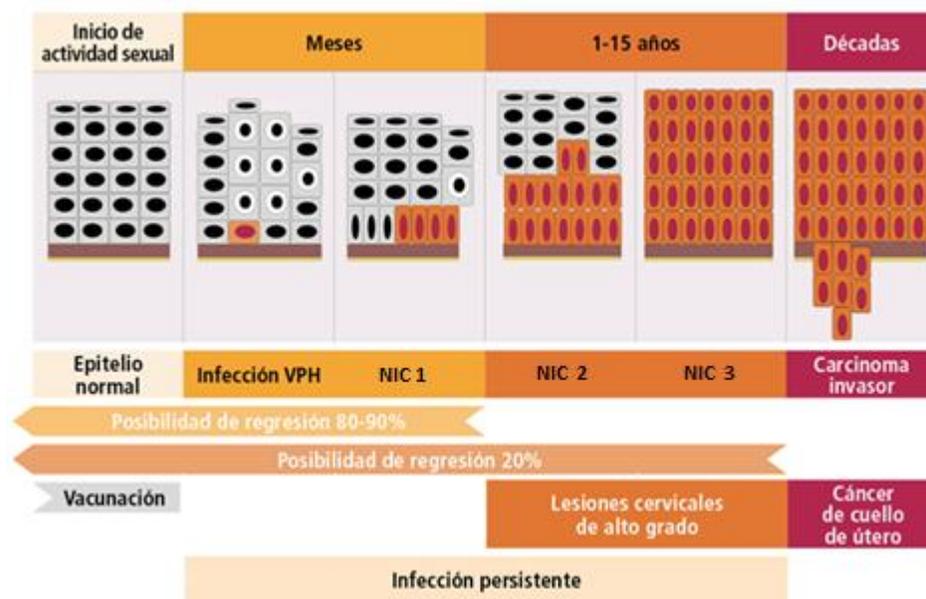


Figura 7. Progresión de lesiones intraepiteliales. Las células coloreadas en naranja representan a aquellas que han sufrido alteración debido la infección por VPH (Modificado de AEPCC, 2018).

El CaCU normalmente está precedido por lesiones de bajo y alto grado, incluso hasta por más de 10 años antes (Sanabria *et al*, 2011). Sin embargo, los análisis citológicos para detección del VPH en ocasiones no identifican a un gran grupo de mujeres ya que no presentan anomalías citológicas, aunque alberguen tipos de VPH con un potencial progresivo muy diferente debido a las ya mencionadas infecciones latentes. Por lo tanto, las pruebas moleculares para solo un subconjunto de tipos de alto riesgo podrían mejorar en pro de un beneficio costo-efectividad (Clifford *et al*, 2005).

Estructura y taxonomía de los papilomavirus

Anteriormente, los papilomavirus pertenecían, junto con los poliomavirus, a la familia *Papovaviridae*; sin embargo, con la posterior secuenciación de genomas se observó que aunque tienen una organización genética semejante, su transcripción es diferente: unidireccional en los

papilomavirus y bidireccional en los poliomavirus, por lo que el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus decidió que los papilomavirus fueran una familia diferente, denominada *Papillomaviridae*. Esta familia infecta los epitelios de mamíferos y otras especies vertebradas. El VPH pertenece a cinco de 16 géneros (Tabla 1) de la familia *Papillomaviridae*: alfa, beta, gamma, mu y nu.

Actualmente, la clasificación de los diferentes tipos virales se realiza por comparación de la secuencia nucleotídica del gen L1, una de las regiones más conservadas dentro del genoma viral. Un nuevo tipo viral se define cuando se identifica un nivel de variación mayor al 10% en la secuencia de L1 respecto a la secuencia de los tipos previamente clasificados, un subtipo entre el 10 y 2% y una variante menos del 2%. De la misma manera, miembros de diferentes géneros comparten menos del 60% de homología en el marco abierto de lectura L1; especies de un mismo género, entre el 60-70%, y tipos de una misma especie, entre el 71-89%. Igualmente, a partir de las sustituciones nucleotídicas presentes en diferentes regiones del genoma viral, como L1, L2, E6 y la región larga de control, conocida también como LCR (por sus siglas en inglés: *Long Control Region*), se han definido cinco grupos filogenéticos o variantes: Europeo (E), Asiático (A), Asiático-Americano (AA), Africano 1 (Af1) y Africano 2 (Af2). Esta definición fue acordada en Quebec en 1995 en el "*International Papillomavirus Workshop*" (de Villiers *et al*, 2004).

Tabla 1. Géneros de virus de papiloma y organismos hospederos.

Género	Hospedero
Alphapapillomavirus	<i>Homo sapiens</i> (Humano)
Betapapillomavirus	<i>Homo sapiens</i> (Humano)
Gammapapillomavirus	<i>Homo sapiens</i> (Humano)
Deltapapillomavirus	(Rumiantes)
Epsilonpapillomavirus	<i>Bovinae</i> (Bovinos)
Etapapillomavirus	(Aves)
Iotapapillomavirus	<i>Rodentia</i> (Roedores)
Kappapapillomavirus	Lagomorpha (Conejos)
Lambdapapillomavirus	(Perros y gatos)
Mupapillomavirus	<i>Homo sapiens</i> (Humano)
Nupapillomavirus	<i>Homo sapiens</i> (Humano)
Omikronpapillomavirus	Phocoenidae (Marsopas)
Pipapillomavirus	<i>Mesocricetus auratus</i> (Hámster)
Thetapapillomavirus	(Aves)
Xipapillomavirus	<i>Bovinae</i> (Bovinos)
Zetapapillomavirus	<i>Equus ferus caballus</i> (Caballos)

(Santos *et al*, 2014).

El virus Papiloma infecta una variedad de especies (Burd, 2003), siendo específico para cada una de ellas. (Rivera *et al*, 2002). Por tanto, los VPH únicamente se encuentran en humanos y sólo se pueden transmitir entre ellos, la transmisión se da principalmente por vía sexual (Vasquez *et al*, 2017).

Los papilomavirus (PV) son una gran familia de virus relacionados con genomas de ADN de doble hélice circulares de 8 kb de tamaño que se replican y se ensamblan exclusivamente en el núcleo (Zheng y Baker, 2006). Su genoma (Figura 8) está dividido en tres regiones: temprana (E), tardía (L) y la región larga de control (LCR); su cápside es de simetría icosaédrica, mide alrededor de 55 nm de diámetro y está compuesta por 72 capsómeros en forma de estrella (Burd, 2003). Algunos tipos de PV causan hiperplasias epiteliales que van desde verrugas exofíticas benignas a, como ya se ha mencionado antes, lesiones premalignas que pueden progresar hasta cáncer invasivo (Jastreboff y Cymet, 2002).

La región temprana (E) abarca aproximadamente el 50% del genoma del virus y contiene seis genes no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) cuyos transcritos son descritos en la Tabla 2. Por otra parte, la región tardía (L) cubre alrededor del 40% del genoma viral y se encuentra debajo de la región E, contiene dos genes estructurales: L1 y L2 (Tabla 2).

La región larga de control (LRC por sus siglas en inglés: "*Long Control Region*") es un segmento de aproximadamente 850 pb (10% del genoma), no codifica para ninguna proteína, pero se encarga de controlar la expresión de los genes temprano E6 y E7 (zur Hausen, 2002; Zheng y Baker, 2006).

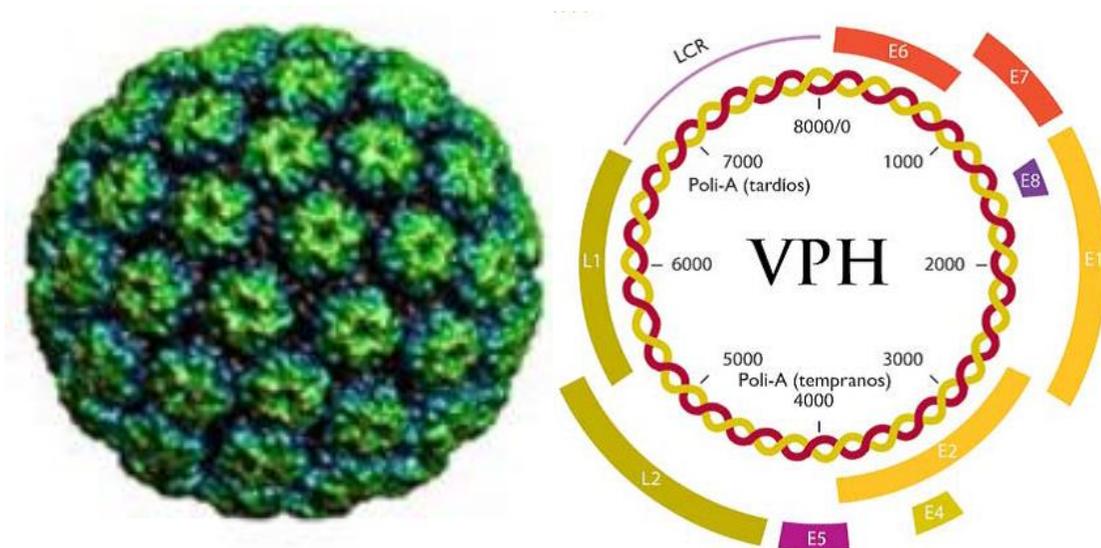


Figura 8. Estructura y organización del genoma de VPH (Santos *et al*, 2014; López y Lizano, 2006).

Tabla 2. Proteínas del virus y funciones asociadas

Proteína	Función
E1	Replicación viral, regula actividad transcripcional, funcionando como helicasa.
E2	Replicación viral, transcripción, segregación genómica y encapsidación
E4	Regula la expresión de genes tardíos, controla la maduración viral y la salida de los viriones.
E5	Estimula la actividad transformante de E6 y E7, promoviendo la fusión celular, aneuploidía e inestabilidad cromosómica, contribuyendo a la invasión de la respuesta inmunitaria.
E6	Se une a la proteína supresora de tumores p53 promoviendo su degradación, inhibe apoptosis, interactúa con proteínas del sistema inmunitario, contribuyendo a la evasión de la respuesta, y por lo tanto a la permanencia del virus, activa la expresión de la telomerasa.
E7	Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumor pRB, incrementa la actividad de cinasas dependientes de ciclinas, afecta la expresión de genes de fase S por interacción directa con factores de transcripción E2F y con histona desacetilasa, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria.
L1	Proteína mayoritaria de cápside, conforma el 80% de la cápside Reconoce receptores sobre la célula hospedera. Es altamente inmunogénica e induce anticuerpos neutralizantes.
L2	Proteína minoritaria de cápside, conforma el 20% de la cápside Participa en la unión del virión a la célula, en su entrada a la célula y transporte al núcleo, la liberación del genoma y el ensamble de los viriones.

(Santos *et al*, 2014; López y Lizano, 2006)

Grupos de alto y bajo riesgo

Más de 150 tipos de VPH han sido identificados, alrededor de 60 están asociados a lesiones anogenitales, intraepiteliales e invasoras y pertenecen al género Alphapapillomavirus (Bernard *et al*, 2006; Burk *et al*, 2011). De principal interés son los tipos considerados de alto riesgo oncogénico, principalmente 16 y 18, vinculados a cánceres ginecológicos y no ginecológicos (Rivera *et al*, 2002).

Los, aproximadamente, 60 tipos de VPH asociados a lesiones son frecuentemente clasificados en bajo riesgo (BR) como los tipos 6 & 11; y alto riesgo (AR) como los tipos 16 y 18. Esta clasificación es dada en relación a su capacidad para causar HSIL y carcinoma invasivo (zur Hausen, 1991; Burk *et al*, 2011). Existe un grupo intermedio para aquellos tipos que se han

identificados como de probable alto riesgo (Tabla 3). Cabe señalar que los virus BR están asociados con la aparición de condilomas acuminados que generalmente no progresan a lesiones malignas como lo hacen aquellos virus AR (Bernard *et al*, 2006).

Tabla 3. Clasificación de los tipos de VPH asociados a lesiones

Alto riesgo oncogénico	Probable alto riesgo oncogénico	Bajo riesgo oncogénico
16,18, 31, 33, 35, 39, 45,51, 52, 56, 58, 59, 67, 68, 73 y 82	26, 53 y 66	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 62, 64, 69, 70, 71, 72, 81, 83, 84 y CP6108

(Vásquez *et al*, 2017).

Importancia de los *Alphapapillomavirus*

El género de los Alphapapillomavirus está relacionado a infecciones en humanos considerándolos por tanto como VPH. Los tipos virales de este género se caracterizan por ser causantes de lesiones mucosas y cutáneas además de que la mayoría de ellos infectan el área genital. (López y Ancizar, 2006; Silva *et al*, 2013).

Este género consta de 14 subdivisiones dentro de las cuales encontramos a los Alphapapillomavirus 7 y 9, estas familias contienen a los tipos de VPH de alto riesgo con mayor prevalencia en la población, los tipos de virus pertenecientes a estas dos familias, en conjunto, se encuentran presentes en aproximadamente el 90% de las infecciones por VPH. La mayoría de tipos de VPHs AR están agrupados en las familias A7, siendo el VPH 18 el de mayor representación con incidencia aproximada del 15% en todos los casos de CaCU a nivel internacional; y en la familia A9 dentro de la cual encontramos al VPH 16 con incidencia mundial aproximada de 75%. Es debido a estos altos porcentajes que estas dos familias, particularmente, han sido objeto de amplio estudio (Chen *et al*, 2013).

En México los tipos 31, 33,45, 58 representan el 13% de los tipos detectados en CaCU y aunado a los tipos 16 y 18 representan el 90% todos estos tipos corresponden a las variantes A7 y A9 (Salcedo *et al*, 2014).

Tabla 4. Clasificación de las familias del género Alphapapillomavirus

Genero	Familia	Tipo
<i>Alphapapillomavirus</i>	Alpha-1	VPH 32
	Alpha-2	VPH 10
	Alpha-3	VPH 61
	Alpha-4	VPH 2
	Alpha-5	VPH 26
	Alpha-6	VPH 53
	Alpha-7	VPH 18
	Alpha-8	VPH 7
	Alpha-9	VPH 16
	Alpha-10	VPH 6
	Alpha-11	VPH 34
	Alpha-12	<i>Macaca mulata</i> Papillomavirus 1
	Alpha-13	VPH 54
	Alpha-14	VPH 90

(Bernard *et al*, 2010)

Familia α 7 del VPH

Los papilomavirus de la especie Alpha 7 (A7) están comprendido por los tipos 18, 39, 45, 59, 68, 70, 85, 97 y 177 (PaVE, 2018). Los VPH tipo 18 y tipo 45, en conjunto representan aproximadamente el 20% de incidencia en todos los casos de CaCU (Chen *et al*, 2008). Por tanto, se considera a la familia A7 como la segunda especie de mayor en importancia en la progresión carcinomas (Chen *et al*, 2013).

En el estudio realizado por Muñoz y colaboradores se encontró también que los VPH tipo 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 y 35 (en orden descendiente por frecuencia) se han reportado como los ocho tipos más comunes en pacientes incluyendo infecciones múltiples y sencillas. En este mismo estudio el VPH 18 fue el segundo tipo más común con prevalencia del 15% a nivel internacional seguido en tercer lugar por el VPH 45 con 5.9% (Muñoz *et al*, 2003).

Dichos datos coinciden también con lo reportado en el meta-análisis global hecho por Clifford y su equipo en 2003 donde reportan que el VPH 18 es el segundo más común para los casos de carcinoma de células escamosas con 12.3% pero en adenocarcinoma se posiciona como el predominante con un porcentaje global de 37.7% seguido por el VPH 16 (26-36%) y el VPH 45 con 5.8 %. Este último tipo también se reportó como el tercero más común para carcinoma de células escamosa pero un porcentaje menos que en adenocarcinoma (3.4%) (Figura 9).

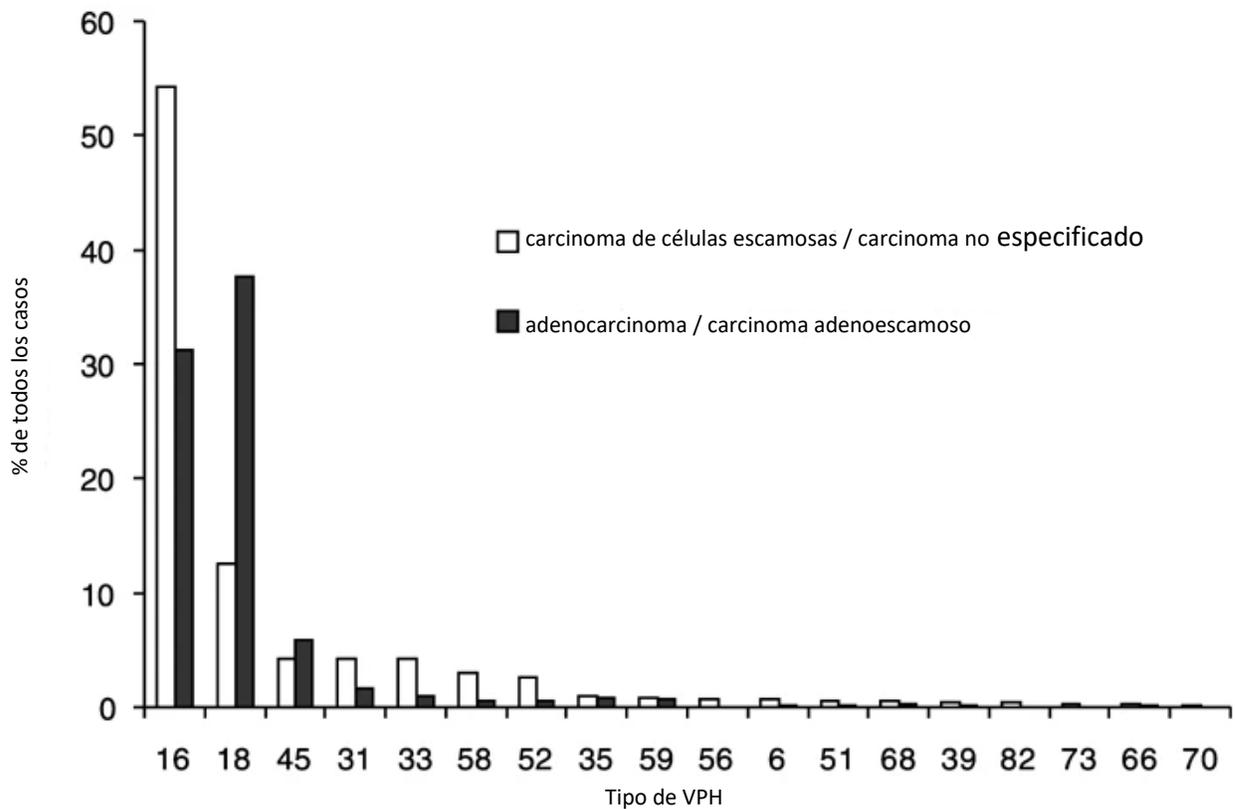


Figura 9. Prevalencia de diferentes tipos de VPH AR en 10058 casos internacionales de CaCU según tipo histológico (Modificado de Clifford *et al*, 2003).

La prevalencia de los diferentes tipos de VPH puede variar un poco entre las diferentes regiones globales; sin embargo, los tipos más importantes después del VPH 16 son el VPH 18 y VPH 45 (Clifford *et al*, 2003).

En México también se han observado datos semejantes de los tipos virales señalados en los anteriores estudios, según la investigación de López y colaboradores los tipos de VPH encontrados con más frecuencia en muestras de cérvix normal han sido 16, 18, 31, 33, 39, 45, 53, 58 y 59 (López *et al*, 2012).

Factores de riesgo

Existen diferentes factores que se asocian a la infección viral y pueden determinar la evolución hacia lesiones intraepiteliales y cáncer, varios de ellos guardan estrecha relación con el comportamiento sexual:

- La edad al primer coito antes de los 20 años y especialmente antes de los 18 años, dada la vulnerabilidad del epitelio cervical en esas edades. La infección en edades tempranas hace que el epitelio cervical, aún inmaduro, se exponga por un tiempo mayor a la acción deletérea de estos virus, lo que aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad.

El inicio de la vida sexual en la adolescencia, se convierte en un factor de riesgo dado que el epitelio cervical es de tipo simple, no estratificado y, por tanto, no es capaz de brindar una protección efectiva contra las infecciones

- Infecciones de transmisión sexual como el Herpes Simple Genital tipo 2 (HSG-2) que puede actuar de manera sinérgica en la acción oncogénica y el VIH aumentar las lesiones por la supresión del sistema inmune.
- Promiscuidad sexual, sobre todo cuando no se tiene en cuenta el uso del preservativo (Rodríguez *et al*, 1999).
- Multiparidad, debido a que durante el embarazo se produce una depresión inmunológica adicionalmente el mayor número de traumas, desgarros y laceraciones provocados en los partos, podrían facilitar la aparición de lesiones.
- Incremento del riesgo de CaCU en mujeres con infección activa por VPH ya que las lesiones pueden progresar más rápidamente a cáncer invasor (Rodríguez *et al*, 2014).
- Tabaquismo, se señala que los mecanismos de este efecto pudieran estar relacionados con el efecto directo de los carcinógenos de los cigarrillos en el epitelio cervical. La acumulación de la nicotina y de su producto de degradación, la cotinina, en las células de las glándulas productora de moco, interfieren con el funcionamiento normal de esas células (Díaz *et al*, 2014).

Vacunas

Actualmente en el mercado existen tres vacunas aprobadas por la FDA (por sus siglas en inglés: *Food and Drug Administration*) para la prevención primaria frente al VPH una de ellas: (Tabla 5).

Tabla 5. Vacunas contra preventivas contra VPH

Nombre	Tipo	Protección contra VPH tipo	Disponibilidad nacional
Cervarix vph2 ®	Bivalente	16 y 18 (AR)	Si
Gardasil vph4 ®	Tetravalente	16 y 18 (AR); 6 y 11 (BR)	Si
Gardasil9 ®	Nonavalente	16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58 (AR); 6 y 11 (BR)	No

(Vasquez *et al*, 2017)

Todas estas vacunas permiten la presentación lenta del antígeno viral por los monocitos hacia los linfocitos B.

Cabe señalar que la infección por algún tipo de VPH no inhibe la prevención para el resto de tipos de VPH; sin embargo, hay que tener en cuenta que estas vacunas son de carácter profiláctico y no tienen acción terapéutica para inducir regresión o prevenir la progresión de infecciones que ya están establecidas (Vasquez *et al*, 2017).

Las vacunas funcionan mejor si se administran antes de la exposición a los VPH. Por tanto, es preferible administrarlas antes del inicio de la vida sexual.

Algunos países han empezado a vacunar a los niños, dado que la vacuna previene distintos tipos de cáncer y verrugas genitales en ambos sexos. La OMS recomienda que se vacune a las niñas de edades comprendidas entre los 9 y los 13 años (WHO, 2018). Cabe señalar que, tanto en nuestro país como en todos aquellos con esquema de vacunación contra el VPH, esto no debe considerarse como sustituto a las pruebas de detección del CaCU.

Métodos de detección

La infección causada por este virus puede evidenciarse indirectamente mediante examen citológico o histopatológico a partir de cambios morfológicos sugestivos o directamente mediante pruebas moleculares que, a diferencia de los anteriores, permiten detectar al virus e identificar el tipo incluso en infecciones latentes.

También se utilizan pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos circulantes y la respuesta inmunitaria al nivel celular inducida por la infección viral, que incluyen el estudio de péptidos de las regiones E2, E4, L1, L2, E6 y E7 de los tipos 16 y 18 de VPH y la detección de anticuerpos frente a proteínas E6 y E7, así como de las proteínas de la cápside L1 y L2 (Guglielmo y Rodríguez, 2010).

A continuación, se presentan los métodos comerciales usados actualmente para la identificación molecular de virus y tipificación, se incluyen aquellos que detectan a partir del ADN viral (Tabla 6).

Tabla 6. Métodos comerciales para identificación y tipificación moleculares del VPH					
Método	Técnica	Fundamento	Tipos	Equipo	Resultado
GP5+/6+	PCR punto final	Amplificación de un fragmento de 150pb del gen L1 flanqueado por oligonucleótidos degenerados.	6, 11, 16, 18, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 42, 45, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 57, 62 y 72	Termociclador.	Banda única para cualquiera de los tipos detectados.
Captura de híbridos HC2	Hibridación ADN: ARN	En fase líquida el ADN: ARN son capturados sobre una superficie que contiene anticuerpos específicos para estos híbridos, reaccionan con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina. La unión es detectada por un sustrato quimioluminiscente de dioxetano, produciéndose una señal amplificada por lo menos 3.000.	AR: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 BR: 6,11, 42, 43 y 44	Luminómetro (RLU), agitador orbital, lavador de placas.	No identifica tipos virales individuales.
MY11/ 09	PCR punto final	Amplificación de un fragmento de 450pb del gen L1 flanqueado por oligonucleótidos degenerados.	6, 11, 16, 18, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 42, 45, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 57, 62 y 72	Termociclador.	Banda única para cualquiera de los tipos detectados.
AMPLICOR HPV test	PCR y reacción enzimática colorimétrica	Amplificación del ADN blanco por PCR, seguida de hibridación de los ácidos nucleicos para la identificación de VPH de alto riesgo oncogénico en células cervicales recolectadas en un medio de transporte; adicionalmente, evalúa la presencia del gen humano de b-Globina, como control interno de la amplificación y de calidad de la	AR: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68	Termociclador.	No identifica tipos virales individuales.

		muestra biológica.			
Linear Array e INNO-LiPA	Hibridación reversa por PCR	Utiliza iniciadores biotinilados para VPH con sondas específicas inmovilizadas en un sustrato sólido; la hibridación es detectada mediante reacción colorimétrica. Con ambos métodos se amplifica un fragmento de la región L1 del genoma viral, de 450 y 65 pb respectivamente.	Linear Array :6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 y CP6108 INNO-LiPA: 32 tipos AR y BR	Iniciadores biotinilados, termociclador, baño de agua, agitador, hibridación automatizada (para alto rendimiento).	Identifica tipos virales individuales.
Inv2	Sistema automatizado de sondas fluorescentes	Compuesto por un por 3 pool de sondas tipo específicas A5/A6, A7 y A9.	A5/A6: 51, 56 y 66 A7: 18, 39, 45, 59 y 68 A9: 16,31,33,35,52 y 58	Casetes de transferencia de energía de resonancia fluorescente.	Identificación por grupo A5/6, A7 y A9.
Cervista HPV HR	Resonancia fluorescente de transferencia de energía (FRET)	Se basa en lo que se conoce como "química invasora" como método de amplificación de la señal para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos virales. Este método usa dos tipos de reacciones isotérmicas: una que se produce en la secuencia de ADN blanco y la otra que genera la señal fluorescente.	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	Software procesador de señal fluorescente, termociclador, lector de placa de fluorescencia, computadora con "Call Reporter" software.	No identifica tipos virales Individuales.
Cervista HPV 16/18		Utiliza la misma tecnología de Cervista HPV.	16 y 18		Identifica individualmente

Test					VPH 16 y 18
Cobas 4800 HPV Test	qPCR	Amplifica un fragmento de gen viral L1. Esta reacción es una variante mejorada de la PCR convencional que permite un proceso de amplificación génica y detección simultánea del ADN amplificado en "tiempo real"; el monitoreo simultáneo del progreso de la amplificación del ADN blanco se logra mediante una reacción química que usa compuestos fluorescentes que proporcionan una detección específica, empleando instrumentación especialmente diseñada para la lectura.	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	Termociclador Cobas Z, equipo Cobas x 480 y el analizador Cobas z 480.	Solo identifica individualmente tipo 16 y 18 Los demás tipos no son identificados de manera individual.
CLART	Microarreglos	Hibridación por microarreglos, mediante la hibridación de una sonda específica para la detección de VPH que detecta 35 genotipos de VPH	6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 83, 84, 85, 89	Equipo especializado para observar los resultados, software SAICLART.	Identifica tipos virales individuales.

(Guglielmo y Rodríguez, 2010; Qu *et al*, 1997; Picconi, 2013; Ginocchio *et al*, 2008; WHO, 2018).

Oligonucleótidos y PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*) es una poderosa técnica de amplificación a partir de la cual se puede generar una alta cantidad de un segmento específico de ADN partiendo de cantidades de ADN muy pequeñas (Lorenz, 2014).

El proceso que sigue la PCR semeja el proceso de división celular mitótica, en el cual se crea una copia del genoma para cada nueva célula somática. Con la creación de estas copias se duplica la cantidad de ADN que se comparte por igual entre las dos nuevas células. La duplicación del ADN nuclear tiene lugar en cada división celular, ya que se crea un organismo multicelular mediante la división celular continua a partir de la célula progenitora original. La copia del genoma único en la célula progenitora original se convierte en muchos miles de millones de copias en el organismo completamente maduro. La PCR se basa en principios similares y componentes aislados de este proceso para así lograr convertir dichas concentraciones muy bajas de ADN en concentraciones muy altas.

Los componentes físicos de la PCR son:

- Templado de ADN, es decir, el ADN que se copia
- Desoxinucleótidos trifosfatos, el ADN se compone de cuatro nucleótidos diferentes: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C)
- Oligonucleótidos o cebadores, son secuencias cortas de ADN complementarios al templado a las que se une la polimerasa para elongar la cadena.
- Solución tampón de fuerza iónica y pH apropiados.
- Enzima *Taq* polimerasa, esta se encarga de unir los nucleótidos creando una secuencia complementaria (A-T, G-C).

La enzima ADN polimerasa utilizada en la PCR es termoestable, la *Taq* polimerasa es derivada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*. La estabilidad térmica permite que la enzima resista el calentamiento requerido para desnaturalizar el ADN y mantener la actividad a temperaturas relativamente altas (Waters, 2014).

El desarrollo de la PCR consta de tres pasos básicos (Figura 10):

- Desnaturalización. Consiste en la separación de las dos cadenas del ADN por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos.
- Alineamiento. Consiste en la hibridación de los oligonucleótidos. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los mismos a las cadenas molde. La temperatura, aproximada de 50-60°C, y el tiempo requerido para el alineamiento de los oligonucleótidos depende de la composición, tamaño y

concentración. Una Temperatura de alineamiento puede ser 5°C menor a la temperatura a la que hibridan los oligonucleótidos, conocida como T_a (temperatura de alineamiento), de los mismos.

- Extensión (o Elongación). Se efectúa a 72°C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde. El tiempo de extensión debe aumentarse para fragmentos más largos. La *Taq polimerasa* agrega nucleótidos a una velocidad de aproximada de 2,000/min por lo que un tiempo de extensión de 30 segundos es apropiado para este paso.
- para productos de PCR de menos de 1 kb de longitud.

El número óptimo de ciclos dependerá principalmente de la concentración inicial del templado cuando los otros parámetros son optimizados (Seaman *et al*, 2010).

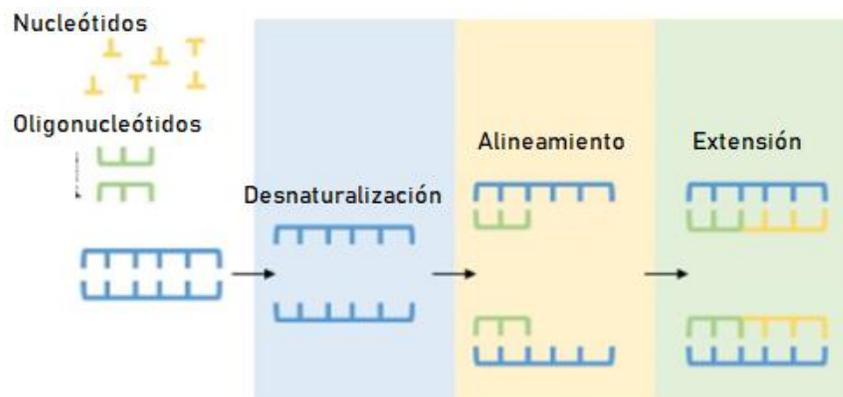


Figura 10. Pasos principales de la PCR. Figura realizada por Alaniz-Barraza, 2019.

Al repetir este proceso a través de varios ciclos, la concentración del ADN objetivo aumenta exponencialmente. Si, por ejemplo, hubiera una sola copia del objetivo disponible para la amplificación, un ciclo de PCR generará una sola copia que duplica la cantidad del objetivo. En el segundo ciclo de PCR habrá dos objetivos que se pueden copiar, duplicando la cantidad del objetivo a cuatro. El tercer ciclo duplica el objetivo de cuatro a ocho, luego de ocho a dieciséis, y así sucesivamente. Suponiendo una eficiencia perfecta de la PCR, después de cada ciclo, la cantidad de ADN es dos veces la anterior así, después de n ciclos tendremos 2^n cantidad de ADN. La PCR se realiza de manera rutinaria durante 25 a 35 ciclos, por lo que la PCR puede multiplicar la cantidad de ADN objetivo en el orden de 2^{25} a 2^{35} veces (Seaman *et al*, 2010).

El éxito de los experimentos de PCR dependen, en gran medida del diseño de los oligonucleótidos y la optimización de la reacción para el experimento. Los oligonucleótidos son fragmentos de 18-30 nucleótidos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN. Al diseñar un conjunto de cebadores para una región específica del ADN deseado para la amplificación, un cebador debe reconocer la cadena positiva

("forward"), orientada en la dirección 5' → 3' y el otro cebador debe complementar la cadena negativa ("reverse"), orientada en la dirección 3' → 5' (Lorenz, 2014). Los factores principales que afectan la función de los oligonucleótidos son: la temperatura de fusión, la posible homología entre los iniciadores, el tamaño del mismo y el contenido CG. La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la PCR (Dinc *et al*, 2010).

A continuación, se describen los parámetros para un buen diseño de oligonucleótidos.

- Especificidad. A menudo hay varias regiones de secuencia muy similar dentro de un genoma. Identificar secuencias apropiadas para el alineamiento de los oligonucleótidos es esencial y puede llegar a ser un fuente común de error. Dependiendo del propósito del experimento, los cebadores necesitan alinearse en regiones únicas o no únicas del templado. Si el propósito es amplificar una secuencia blanco, los oligonucleótidos deben reconocer las regiones exclusivas de ese blanco, de lo contrario podrían amplificar secuencias que no son el objetivo. Las secuencias intrónicas e intergénicas son generalmente sitios de unión a cebadores apropiados para la amplificación de regiones diana únicas. En contraste, las secuencias codificantes conservadas compartidas por una familia de genes son útiles para amplificar miembros de esa familia de genes. Las regiones genéticas funcionales como los dominios catalíticos o de unión al sustrato definen la identidad del gen. Estas regiones están altamente conservadas, y si el gen objetivo es parte de una familia de genes, los oligonucleótidos que se unen a estas regiones conservadas pueden amplificar más de un miembro de la familia de genes.
- Temperatura de fusión (T_m). La temperatura a la que el ADN de doble cadena se separa y se convierte en ADN de una sola hebra es la T_m. Debe tomarse en consideración que la T_m ideal para la selección de los cebadores se debe encontrar entre los 50 y 65°C sin que difieran entre ellos por más de 2°C.
- Longitud. La longitud óptima de los cebadores de PCR es de 18 a 30 pb. Los cebadores de esta longitud logran el equilibrio adecuado entre la especificidad y la temperatura de alineamiento; cuanto más largo sea el oligonucleótido, mayor será la especificidad y mayor será la temperatura de alineamiento.
- Contenido de GC, total, y extremo 3'. El contenido total de GC de un cebador debe ser del 50% ± 10%. Gs y Cs dentro de los cinco nucleótidos del extremo 3' de los cebadores estabilizan los cebadores.
- Estructuras secundarias "hairpins". Si los extremos 5' y 3' de un oligonucleótido son complementarios entre sí, el extremo 5' puede retorcerse y unirse al extremo 3' formando una estructura en horquilla también llamada "hairpin". Estas estructuras

pueden interferir seriamente con la unión del cebador. Para evitar que la formación de "hairpins" interfiera con con el rendimiento de la PCR, la T_m de este debe ser menor que la de los oligonucleótidos.

- Heterodímeros y homodímeros. Un cebador puede unirse tanto a sí mismo (homodímero) como a su par (heterodímero). Esto debe tenerse en cuenta y evitarse, en particular las secuencias complementarias en el extremo 3' de los cebadores. La energía de formación de estas estructuras, ΔG , debe ser mayor a -9 kcal/mole para que su formación sea un impedimento en la hibridación de los oligonucleótidos con el templado.
- Repetición de secuencia. Una secuencia repetida (poli A, poliT, poliG, poliC) dentro del sitio de unión del cebador puede llevar a un cebado incorrecto y debe evitarse. Cuando no sea posible evitar la secuencia de repetición, deben mantenerse al mínimo y, como regla general, no exceder de cuatro (Waters, 2014).

Elegir los cebadores apropiados para la tarea que se busca cumplir es probablemente el factor más importante para obtener resultados en la PCR.

El proceso de diseño y selección de oligonucleótidos específicos involucra dos etapas.

1. Generar manualmente o mediante herramientas de software los cebadores que flanquean las regiones de interés.
2. Buscar los cebadores en una base de datos de secuencias de nucleótidos adecuada utilizando herramientas como "BLAST" para examinar los posibles blancos. Aunque el programa "BLAST" se ha utilizado ampliamente para la detección del objetivo del cebador, de hecho no es una herramienta ideal para este propósito, ya que BLAST es un algoritmo de alineación local y no necesariamente devuelve información de coincidencia completa en todo el rango del cebador y el objetivo, particularmente cuando el "match" no es perfecto hacia los extremos. Ahora bien, la herramienta "Primer-BLAST" combina "BLAST" con un algoritmo de alineación global para garantizar una alineación completa entre el cebador y el objetivo, y es lo suficientemente sensible como para detectar blancos que tienen un número significativo de desajustes con los oligonucleótidos. El software de "Primer BLAST" también ofrece flexibilidad para cambiar la configuración de especificidad.

Varios estudios han investigado los efectos de los desajustes entre las secuencias blanco y los oligonucleótidos y han demostrado que un objetivo puede amplificarse incluso si tiene algunos desajustes con los cebadores. En general, los desajustes hacia el extremo 3' afectan la amplificación del blanco mucho más que los desajustes hacia el extremo 5'. Un solo desajuste

de base (incluso en el extremo 3'), así como algunos desajustes en el medio o hacia el extremo 5', todavía permiten la amplificación, aunque con una eficiencia reducida para algunos casos.

Existen otros programas de *software*, como "*In Silico PCR*" y "*Reverse ePCR*" que determinan los objetivos de amplificación de los pares de cebadores suministrados por el usuario. "*Autoprime*" diseña cebadores que abarcan uniones exón o intrones para que los cebadores solo se dirijan al ARNm. Sin embargo, no aborda el problema de especificidad del cebador. "*QuantPrime*" es una herramienta especializada para diseñar cebadores específicos del objetivo para detectar ARN mensajero en PCR en tiempo real. Estas herramientas de *software* utilizan principalmente una estrategia basada en índices, que requiere un preprocesamiento computacionalmente intensivo de la base de datos de búsqueda, están limitadas por la disponibilidad de bases de datos y generalmente no son lo suficientemente sensibles como para detectar objetivos que tienen un número significativo de desajustes con los cebadores aunque sean potencialmente amplificables. Por lo cual, ninguna de estas herramientas garantiza un recuento preciso de las coincidencias de nucleótidos entre el oligonucleótido y el objetivo debido a que todas ellas utilizan un algoritmo de alineación local (es decir, "*BLAST*"). En cambio, "*Primer-BLAST*" sí incorpora un mecanismo de alineación global y está diseñado para ser muy sensible en la detección de posibles objetivos de amplificación.

Dicho de otro modo, el programa Primer-BLAST es altamente recomendado para verificar la amplificación entre los oligonucleótidos "*forward*" y "*reverse*", además este programa también verifica las amplificaciones que pudieran surgir de cualquiera de los cebadores solos, por ejemplo, cuando el "*forward*" también pueda actuar "*reverse*" (o viceversa) si coincide con algunas regiones en la otra cadena del templado (Ye *et al*, 2012).

Una vez que los cebadores han sido diseñados, analizados, verificados *in silico* y están listo para usarse, la PCR debe ser probada empíricamente para ajustar las condiciones que optimicen la reacción.

El resultado de la PCR se analiza mediante electroforesis en gel. Cuando la PCR tiene éxito, se detecta una banda o bandas del tamaño esperado con intensidad de señal alta. En cambio, en el carril del control negativo no debe haber ninguna banda.

En caso de falla de la PCR, esta necesita ser optimizada. La alteración de cualquiera de sus parámetros, ya sea en cuanto a componentes o condiciones del ciclo, puede afectar el resultado final. Sin embargo, la Ta y la concentración de Mg²⁺ tienen el mayor impacto. Si la Ta es demasiado alta o la concentración de Mg²⁺ es demasiado baja, los cebadores no se unen y si la Ta es demasiado baja o la concentración de Mg²⁺ es demasiado alta, los cebadores se unen de manera no específica, dando oportunidad a la amplificación de secuencias que no son el objetivo.

En común con la mayoría de los experimentos, se puede incluir una variedad de controles positivos y negativos en los experimentos de PCR. Estos controles son opcionales con una excepción muy importante: el control negativo sin templado, es decir, sin ADN molde. Para detectar la presencia de secuencias contaminantes, se debe incluir un control negativo de sin templado en todos los experimentos de PCR.

Cabe mencionar que los protocolos de PCR son solo guías. Cada laboratorio necesita determinar empíricamente las condiciones que permiten la amplificación de un fragmento particular de ADN ya que cada máquina de PCR, ADN polimerasa y muestra de ADN se comportarán de manera diferente y afectan el resultado de la PCR.

Los compuestos tales como DMSO y betaína debilitan los enlaces de hidrógeno entre nucleótidos y también se pueden utilizar en la PCR para relajar las estructuras secundarias que puedan interferir con la polimerización del ADN. Estos compuestos ya sea adicionados juntos o por individual mejoran el rendimiento de la reacción (Waters, 2014).

El uso de las sondas de PCR y oligonucleótidos específicos en la detección de secuencias de patógenos específicos se ha utilizado extensivamente en el diagnóstico de patógenos virales, particularmente cuando el patógeno en la muestra está presente en números bajos o cuando la cantidad de muestra es limitada. Se ha utilizado habitualmente para detectar el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la leucemia de células T humanas (HTLV tipo I y II), el virus del papiloma humano (VPH), enterovirus, citomegalovirus, virus de la hepatitis humana (B, C, D y E) y otros agentes infecciosos, incluidos los patógenos bacterianos, fúngicos y parasitarios, y tiene una importancia considerable en la práctica diagnóstica clínica (Ramesh *et al*, 1992).

Justificación

El CaCU es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres mexicanas. Los genotipos de VPH pertenecientes a la familia A7 están estrechamente relacionados con lesiones carcinogénicas, principalmente CaCU, en mujeres mexicanas, dicha situación remarca la importancia de diseñar un sistema para su detección diferente a las pruebas usadas actualmente debido a que estas requieren de una amplia variedad de reactivos, equipo costoso y especializado, siendo en su mayoría parte de kits comerciales. Además, este tipo de pruebas comerciales no focalizan la detección por familia, por lo que el implementar un nuevo sistema para detectar únicamente a los genotipos de importancia oncogénica de la familia A7, 18 y 45, basado en PCR punto final, disminuye el costo y permite realizar una detección dirigida. El diseño que se propone implica que el diagnóstico pueda llevarse a cabo con menor costo y de manera dirigida para los genotipos de alto riesgo oncogénico del grupo A7, 18 y 45, que en conjunto representan aproximadamente el 20% de incidencia en todos los casos de CaCU, señalando además que el VPH 18 es el segundo tipo más común y el predominante para los casos de adenocarcinoma, con un porcentaje de incidencia de 37.7% global.

Objetivos

Objetivo general

Diseñar un sistema de oligonucleótidos, para PCR punto final, empleando herramientas bioinformáticas, con la finalidad de identificar los tipos 18 y 45 de la familia $\alpha 7$ del virus del papiloma humano.

Objetivos particulares

- Obtener las secuencias nucleotídicas completas de los VPH tipo 18 y 45 comparando genomas de referencia.
- Identificar dentro de la secuencia completa la región L1 para ambos tipos, útil para el diseño del par de oligonucleótidos, a partir de las cuales se realizará el alineamiento en las plataformas "BLAST" y "EMBOSS".
- A partir de los alineamientos, verificar las zonas de hibridación del par de oligonucleótidos diseñados con los diferentes tipos de la familia.
- Verificar de manera experimental la hibridación de los iniciadores en muestras biológicas de pacientes previamente tipificadas disponibles.
- Estandarizar las condiciones de PCR para el par de cebadores diseñados.

Hipótesis

Debido a la homología entre las secuencias de los VPH tipo 18 y 45 de alto poder oncogénico podrán ser detectadas por el mismo par de oligonucleótidos.

Materiales y Métodos

Se diseñó un par de oligonucleótidos para la detección por PCR de los tipos de VPH 18 y 45, pertenecientes a la familia A7. El trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Oncología Genómica de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas ubicada en el Hospital de Oncología de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Tabla 7. Reactivos

Termociclador 2720 Thermal cycler de Applied Biosystems by Life Technologies	Acetato de amonio
Espectofotómetro NanoDrop ND-1000	Proteinasa K
Transiluminador UV	Isopropanol
Centrífuga	Buffer de lisis nuclear
Termoblock	Etanol al 70%
Vortex	Master mix para PCR
Campana estéril	Muestras clínicas tomadas de pacientes con lesiones precursoras y CaCu
Refrigerador	Oligonucleótidos $\alpha 9x$
Guantes	Oligonucleótidos $\alpha 9y$
Cámara para electroforesis horizontal	Agua destilada
Micropipetas de 1-100 μ L	DMSO (dimetilsulfóxido) al 5%
Puntas para micropipeta	Agarosa
	TBE
	Bromuro de etidio

Diseño del par de oligonucleótidos

➤ **Obtención de secuencias**

Se analizaron las secuencias de los tipos 18 y 45 de la familia A7 del VPH obtenidas de la base de datos PaVE, se descargó la secuencia completa de cada genotipo (Anexo 1), así como la correspondiente al gen L1 para ambos casos.

➤ **Alineamiento**

Para encontrar las regiones adecuadas para la creación del par de oligos se realizó el alineamiento utilizando la herramienta "*Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*" en su subdivisión "*Nucleotide BLAST*".

➤ **Diseño de oligonucleótidos**

Fueron seleccionados de manera manual al encontrarse una región que cumpliera con los parámetros establecidos en la Tabla 8.

Tabla 8. Criterios de selección para el par de oligonucleótidos.

✓ % CG: 40-60%	✓ Diferencia de Ta máximo 2°C	✓ Dímeros: $\Delta G > -9$ kcal/mole
✓ Ta: 50-65°C	✓ Cambio de nucleótido al centro del oligo	✓ Menor variación de nt posible
✓ Afinidad por VPH 18 y 45	✓ Tamaño de amplificación máximo 300 pb	✓ Tm de Hairpins menor que la del oligo
✓ 18 -30nt		
✓ No regiones poliG o poliC		

Se analizaron diferentes opciones con "*Primer BLAST*" de la plataforma NCBI, para revisar especificidad y temperatura de alineamiento (Ta). Se utilizó también el programa "*Oligo Analyzer*" de IDT versión 3.1 y "*Primer3Plus*" para verificar %CG, Ta, Tm y estructuras secundarias que se pudieran formar por interacción entre el par de oligonucleótidos con el mismo fin se revisaron los ΔG , los cuales nos indican al ser mayor a valores de -1Kcal/mol que el oligonucleótido no formara horquilla (Anexo 3).

A partir de dicho análisis se obtuvo el siguiente par:

- **Forward (A7F):** CCT TCT GTG GCA AGA GTT GT
- **Reverse (A7R):** ACC TAA AGG CTG ACC ACG

Procesamiento de muestras

➤ **Extracción de ADN**

Se extrajo ADN a partir de muestras incluidas en parafina tomadas de biopsia de cérvix, agregando 1 ml de Xilol a la muestra parafinada en un microtubo cónico "*Eppendorf*". Para disolver la parafina, se dejó en el termoblock (a 67°C) durante 10 minutos, se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos, dejando salir los gases cada vez que la muestra salía de la centrifuga y decantando, se repitieron los lavados con Xilol hasta eliminar la mayor parte de parafina.

Posteriormente se realizó la extracción de ADN con el método de acetato de amonio: Se agregaron 300 µl de buffer de lisis de nuclear y 20µl de proteinasa K a la muestra y se dejó en el "termoblock" a una temperatura de 67°C por aproximadamente 24 horas. Posteriormente se agregaron 300µl de acetato de amonio 5M y se mezcló por inversión dejándose por 30 minutos a -20°C. Después se centrifugó la muestra a 14,000 rpm por 30 minutos y el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo. Se agregaron 500µl de isopropanol frío, dejándose a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó la muestra a 14,000 rpm por 15 minutos, al sacarla de la centrifuga se decantó para posteriormente pasar a los lavados con 1ml de etanol al 70% frío, se centrifugó a 7,500 rpm durante 5 minutos cada vez. El botón que se obtuvo en el tubo se dejó secar en el "termoblock" a 67°C por 2 o 3 minutos para eliminar el etanol restante, por evaporación. Finalmente, para la resuspensión se agregaron de 20 a 30µl de H₂O, dependiendo del tamaño de botón obtenido.

➤ **Cuantificación**

El ADN obtenido de la extracción se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

➤ **Electroforesis**

Se realizó en gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del ADN extraído.

➤ **Tipificación de las muestras**

El ADN obtenido de la extracción se sometió a tipificación viral usando los kits comerciales *Linear Array® HPV genotyping* e *INNO LiPA® HPV genotyping* para determinar el tipo viral presente en la muestra (Tabla 9).

Tabla 9. Tipificación de muestras con Linear Array e INNO LiPA.

No. de Muestra	Tipo de lesión del que se tomó la muestra	VPH presente
129	Bajo grado (LSIL)	16
185	Bajo grado (LSIL)	16, 31 y 45
64	Alto grado (HSIL)	52 y 58
183	Bajo grado (LSIL)	16 y 52
148	Bajo grado (LSIL)	18
118	Cáncer (CaCU)	33,58 y 66
170	Cáncer (CaCU)	16 y 31

Estandarización de oligonucleótidos

Forward (A7F): CCT TCT GTG GCA AGA GTT GT

Reverse (A7R): ACC TAA AGG CTG ACC ACG

Se estandarizó el par de oligonucleótidos determinando la Temperatura de alineación (T_a) para la PCR punto final, para tal fin se emplearon muestras de ADN de líneas celulares con tipo viral 16 y 18 además de muestras ya tipificadas, seleccionando las que presentaban infección con los tipos de interés: 18 y 45.

La PCR punto final se llevó a cabo en el equipo 2720 "Thermal Cycler" de "Applied Biosystems" by Life Technologies con las muestras previamente tipificadas para comprobar el funcionamiento de los oligonucleótidos diseñados para amplificar una región del gen L1.

Las cantidades utilizadas para la PCR fueron:

10 μ L Master mix

1 μ L oligo Forward [20 pmoles]

1 μ L oligo Reverse [20 pmoles]

1 μ L muestra de ADN [≤ 100 ng/ μ L]

1 μ L DMSO [5%]

6 μ L H₂O libre de nucleasas

20 μ L

Para el caso de los testigos negativos se utilizó un volumen de 7 μ L de H₂O ya que no se cargaba muestra de ADN.

El programa empleado para la estandarización fue el siguiente considerándose **X** como la T_a a definir según los resultados obtenidos por cada reacción.

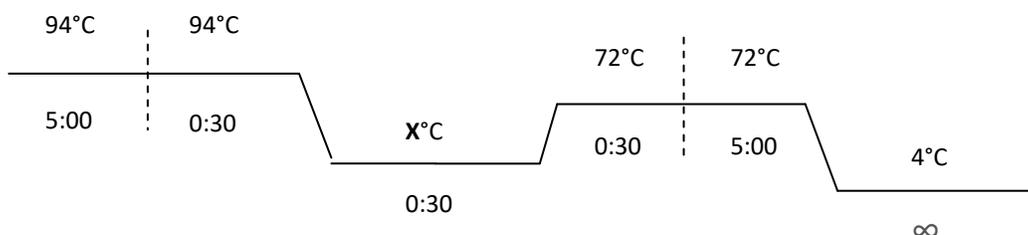


Tabla 10. Tipo viral de la líneas celulares empleadas.

Línea Celular	VPH 16	VPH 18
SiHa	✓	
HeLa		✓

Dichas líneas celulares fueron empleadas por el tipo viral que contienen, siendo el tipo 18 perteneciente a la familia A7, uno de los dos tipos hacia los cuales fue orientado el diseño de cebadores, por otro lado, el tipo viral 45, no está establecido en líneas celulares.

Electroforesis de los productos de reacción

Después de cada reacción de amplificación se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% cargando 5µL de los productos de reacción en cada pozo y 3µL del marcador de pares de bases (100 pb). Posterior al tiempo de corrida el gel se visualizó en un Transiluminador.

Purificación de bandas

En los resultados donde se obtuvieron bandas con diferente tamaño al esperado se procedió a la reamplificación de esa muestra con las mismas condiciones a las que se había obtenido. Con los siguientes volúmenes:

10µL Master mix
1µL oligo Forward [20 pmoles]
1µL oligo Reverse [20pmoles]
5µL producto de reacción
1µL DMSO [5%]
2µl H₂O libre de nucleasas

20µL

A partir de esta reacción de reamplificado se hizo el corrimiento en cámara electroforética en gel de agarosa al 2%. Se recuperaron las bandas obtenidas en este gel para realizar el procedimiento de purificación con el kit comercial "*Wizard SV gel and PCR clean-up system*"[®] de Promega (Anexo 2).

Se cuantificó el ADN recuperado de la purificación y se mandó a secuenciar al laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Análisis de resultados de secuenciación

Los archivos de secuenciación se revisaron y analizaron utilizando el programa SnapGene y la herramienta de NCBI Nucleotide BLAST donde se compararon las secuencias obtenidas buscando altas y bajas coincidencias.

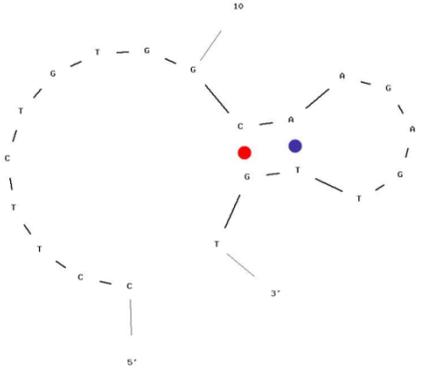
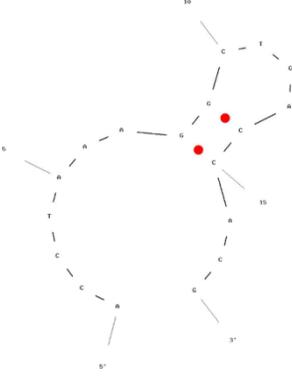
Resultados

Diseño de oligonucleótidos

Una vez alineadas y analizadas las secuencias del gen L1 del VPH tipo 18 y 45 se diseñaron los oligonucleótidos y se evaluaron para seleccionar la opción que cumpliera con los criterios de selección mencionados previamente (Tabla 8).

Las secuencias del par de oligonucleótidos resultantes a partir del análisis de su especificidad y características termodinámicas se muestran en la Tabla 11 en la cual se incluyen también los resultados más destacados de la formación de estructuras secundarias evaluadas en la herramienta de IDT Oligo Analyzer, los valores obtenidos a partir de tal análisis (mostrados sólo los valores más altos en la tabla 11 y en el Anexo 3 los resultados completos) indicó que los oligonucleótidos son adecuados para el uso experimental.

Tabla 11. Oligonucleótidos diseñados para detección del gen L1 de los VPH 18 y 45 de la familia A7

	Forward (A7F)	Reverse (A7R)
Secuencia 5'- 3'	CCT TCT GTG GCA <u>AGA</u> GTT GT	ACC TAA AGG CTG <u>ACC</u> ACG
Longitud	20nt	18nt
%CG	50%	55.6%
Ta	55.2 °C	54.6 °C
Alineamiento VPH 18 y 45	<pre> CCTTCTGTGGCAAGAGTTGT VPH18 CCTTCTGTGGCCAGAGTTGT VPH45 </pre>	<pre> CGTGGTCAGCCTTTAGGT VPH18 CGTGGGCAGCCTTTAGGT VPH45 </pre>
Tamaño de amplificación	297pb	300pb
Hairpin máximo	 <p style="text-align: center;">Tm 29.6 °C</p>	 <p style="text-align: center;">Tm 37.9 °C</p>
Homodimero	<pre> 5' CCTTCTGTGGCAAGAGTTGT ::: 3' TGTGAGAACGGTGTCTTCC </pre> <p style="text-align: center;">Delta G: -3.9 kcal/mole (3 pb)</p>	<pre> 5' ACCTAAAGGCTGACCACG ::: 3' GCACCAGTCGGAAATCCA </pre> <p style="text-align: center;">Delta G: -4.67 kcal/mole (3 pb)</p>
Heterodimero	<pre> 5' CCTTCTGTGGCAAGAGTTGT : 3' GCACCAGTCGGAAATCCA </pre> <p style="text-align: center;">Delta G: -6.61kcal/mol (4 pb)</p>	

Evaluación *in silico* del par de oligonucleótidos A7F/R

Se evaluó con la herramienta "Primer BLAST" de "NCBI" el par A7F/R para verificar *in silico* la región de hibridación del par de oligos, obteniéndose los datos presentados en la Tabla 12.

Tabla 12. Alineamiento global del par de iniciadores A7F/R usando "Primer BLAST"

Resultados de alineación para el par de oligonucleótidos A7F/R

Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer (A7F) CCTTCTGTGGCAAGAGTTGT	20	58.03	50.00	5.00	1.00
Reverse primer (A7R) ACCTAAAGGCTGACCACG	18	56.56	55.56	4.00	2.00

> MF288727.1 Human papillomavirus type 18 isolate 14945'						> KU049755.1 Human papillomavirus type 45 isolate 14Uk3					
product length = 297						product length = 300					
Forward primer	1	CCTTCTGTGGCAAGAGTTGT	20			Forward primer	1	CCTTCTGTGGCAAGAGTTGT	20		
Template	5652	5671			Template	1418C.....	1437		
Reverse primer	1	ACCTAAAGGCTGACCACG	18			Reverse primer	1	ACCTAAAGGCTGACCACG	18		
Template	5948	5931			Template	1717C.....	1700		

> MF288726.1 Human papillomavirus type 18 isolate 13143'						> KU049754.1 Human papillomavirus type 45 isolate 14Uk3					
product length = 297						product length = 300					
Forward primer	1	CCTTCTGTGGCAAGAGTTGT	20			Forward primer	1	CCTTCTGTGGCAAGAGTTGT	20		
Template	5658	5677			Template	1418C.....	1437		
Reverse primer	1	ACCTAAAGGCTGACCACG	18			Reverse primer	1	ACCTAAAGGCTGACCACG	18		
Template	5954	5937			Template	1717C.....	1700		

> MF288725.1 Human papillomavirus type 18 isolate C4516						> KU049753.1 Human papillomavirus type 45 isolate 14Uk3					
product length = 297						product length = 300					
Forward primer	1	CCTTCTGTGGCAAGAGTTGT	20			Forward primer	1	CCTTCTGTGGCAAGAGTTGT	20		
Template	5658	5677			Template	1418C.....	1437		
Reverse primer	1	ACCTAAAGGCTGACCACG	18			Reverse primer	1	ACCTAAAGGCTGACCACG	18		
Template	5954	5937			Template	1717C.....	1700		

El alineamiento global realizado con la herramienta bioinformática "Primer BLAST" muestra las secuencias con coincidencias para todo el rango abarcado por los iniciadores, esta herramienta permite los templados que pueden ser amplificados por el par de oligonucleótidos en evaluación incluso cuando hay algunos "mismatch" o desajustes entre el cebador y la secuencia blanco, como en el caso del resultado obtenido para el VPH 45 el cual presenta un "mismatch" en la base 12 de A7F sentido 5'-3' y otro sobre el nucleótido 13 de A7R 5'-3'. Cuando existe un solo desajuste de base entre el iniciador y el templado aún es posible la amplificación del fragmento, por tanto, la coincidencia con VPH 45 se muestra como un resultado para la alineación global del sistema A7F/R. Por otro lado, también se obtuvo como blanco de alineación las secuencias nucleotídicas propias del VPH tipo 18, con una alineación completa para ambos cebadores. Por lo cual, con este análisis *in silico* confirma el adecuado

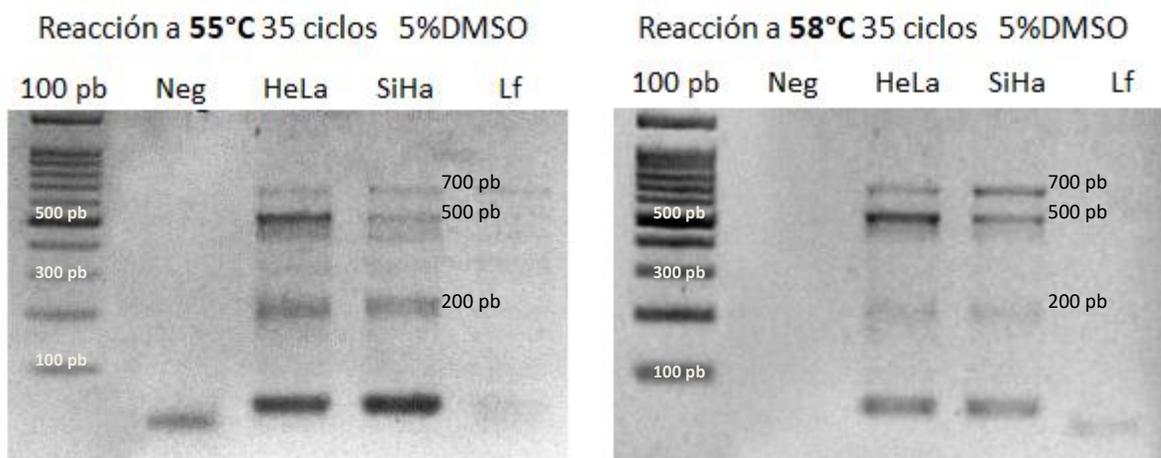
funcionamiento del par de oligonucleótidos diseñados para amplificar secuencias pertenecientes al gen L1 del VPH tipo 18 y 45.

Es de interés señalar que esta herramienta también nos ofrece información respecto a la longitud del fragmento que amplifican los cebadores evaluados, en este caso el análisis señala que el tamaño del producto de reacción esperado para hibridación con secuencias de VPH 18 es de 300 pares de bases (pb) y para VPH 45 es de 297 pb.

Estandarización de oligonucleótidos

Se realizó la PCR a diferentes temperaturas para determinar la T_a óptima para el funcionamiento del par A7F/R iniciando con 55°C ya que fue la T_a obtenida a partir de las evaluaciones *in silico*. Posteriormente, se evaluaron también temperaturas más altas. El tamaño esperado de los productos de amplificación fue de 300 pb para VPH 18 y 297 pb para VPH 45. A continuación, se presentan las imágenes de los resultados obtenidos.

→ Líneas celulares



Gel de agarosa 2% 100 V 30 min

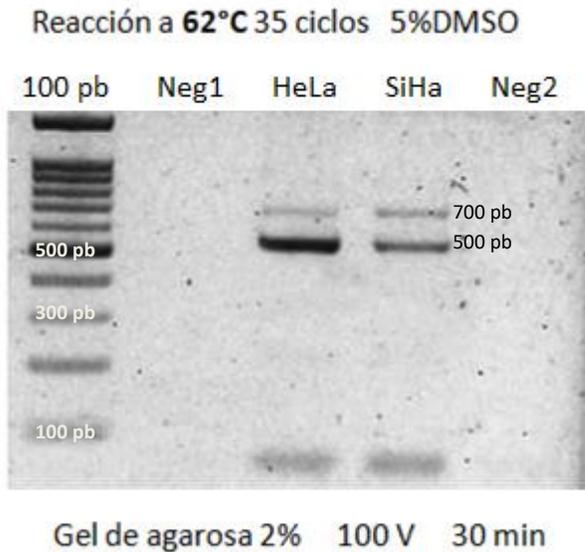
Figura 11. Reacciones en líneas celulares efectuadas a 55 y 58°C

En esta evaluación se utilizó como control negativo una muestra sin ADN (Neg) y otra más con ADN de linfocitos ("Lf"), ya que estas células no son un blanco de infección para el virus.

Se iniciaron las reacciones con T_a de 55°C ya que fue el valor ideal obtenido mediante los análisis *in silico* (Tabla 11) con diferentes herramientas bioinformáticas. A esta temperatura son apreciables bandas en el control negativo con ADN de linfocitos ("Lf") lo cual sugiere que la

temperatura evaluada no es la adecuada por tanto se continuó evaluando temperaturas, elevando los grados paulatinamente para observar el efecto en la reacción.

Evaluando la reacción con Ta de 58°C, desaparecen las bandas de carril “Lf”, confirmándose por tanto que el resultado a 55°C amplificó más bandas que la esperada por el uso de una Ta de alineación insuficiente. Se observaron más bandas de tamaños diferentes a los esperados en los carriles con muestra de línea celular HeLa y SiHa, por tanto, se continuó la evaluación probando el efecto producido por el incremento de temperatura.



A 62°C se observa disminución de las bandas que no corresponden al tamaño esperado de 300 pb utilizando las mismas líneas celulares.

Figura 12. Resultado de reacción de PCR efectuada a 62°C utilizando líneas

→ Muestras clínicas

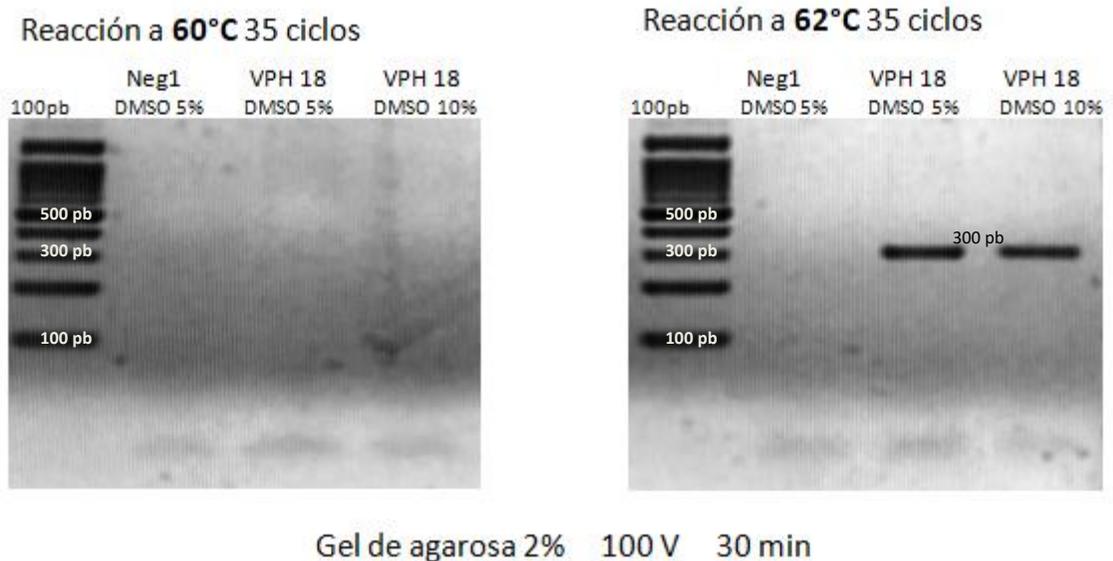


Figura 13. Reacción de PCR efectuada en muestra clínica a 60 y 62°C

La evaluación de reacción en muestra clínica No. 148 con VPH tipo 18 (Tabla 9) se probó a 60 y 62°C contemplando los resultados en líneas celulares, sin obtener bandas a 60°C lo cual es un indicador de que esta temperatura no es óptima para la reacción, contrario al resultado obtenido al evaluar Ta de 62°C ya que con esta temperatura se obtuvo la banda esperada (300pb) por igual en diferentes concentraciones de DMSO, por lo que se consideró como óptimo para la reacción la Ta de 62°C con 5% de DMSO.

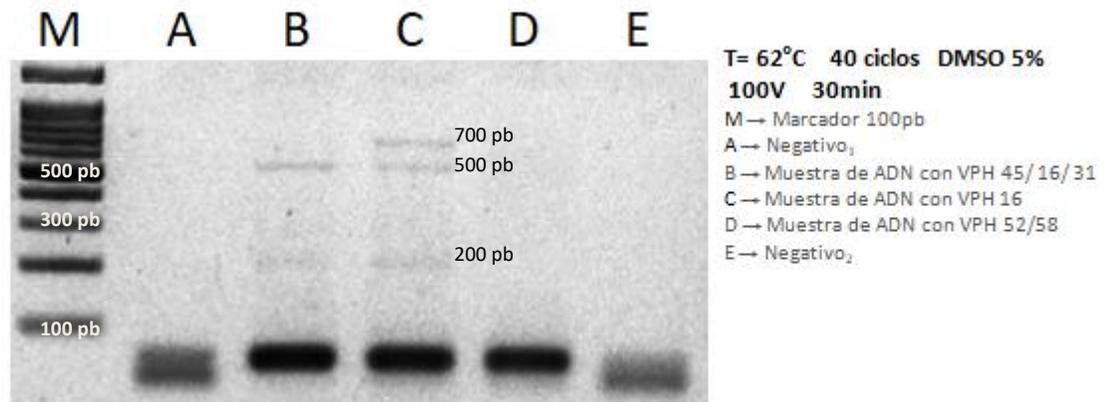


Figura 14. Reacción de PCR efectuada en muestra clínica a 62°C

Para evaluación de muestra clínica con VPH tipo 45 se emplearon las mismas condiciones de las cuales se obtuvo la banda esperada con la muestra clínica con VPH 18. La muestra con VPH 45 corresponde a una infección múltiple con VPH 16 y 31, considerándose este un factor de influencia, ya que como se observa en el carril B, el resultado obtenido no corresponde al tamaño esperado de 300pb.

Las tres bandas obtenidas de diferentes tamaños 200 pb, 500 pb y 700 pb se etiquetaron como A7B1, A7B2 y A7B3 respectivamente fueron reamplificadas y purificadas para su posterior secuenciación y análisis.

Purificación de bandas

Recuperando las bandas, obtenidas a partir de las muestras de líneas celulares, con tamaños diferentes al esperado según el diseño del par A7F/R se llevó a cabo la purificación de las mismas obteniéndose los resultados de la Tabla 13.

Tabla 13. Cuantificación de ADN de las bandas recuperadas.

Clave	Tamaño aproximado (pb)	Concentración de ADN	Índice 260/ 280
A7B1	200	14.6 ng/ μ L	1.96
A7B2	500	17.7 ng/ μ L	2.56
A7B3	700	15.2 ng/ μ L	2.86

Estos purificados se mandaron a secuenciar al laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México. A partir de lo cual se obtuvieron los siguientes cromatogramas:

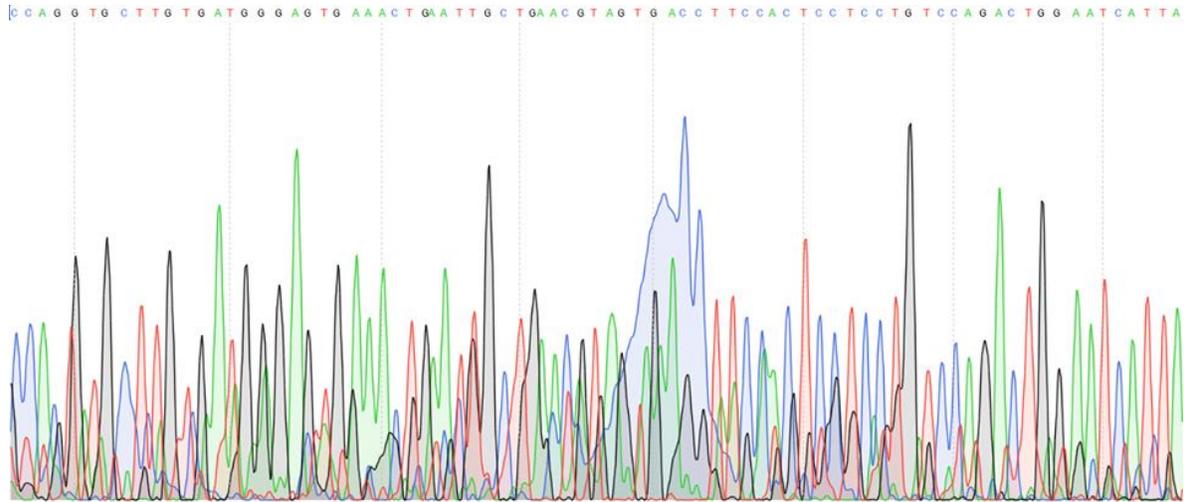


Figura 15. Cromatograma de secuenciación de la banda 1 (B1) a partir del oligo Forward (A7FB1). Imagen de SnapGene.

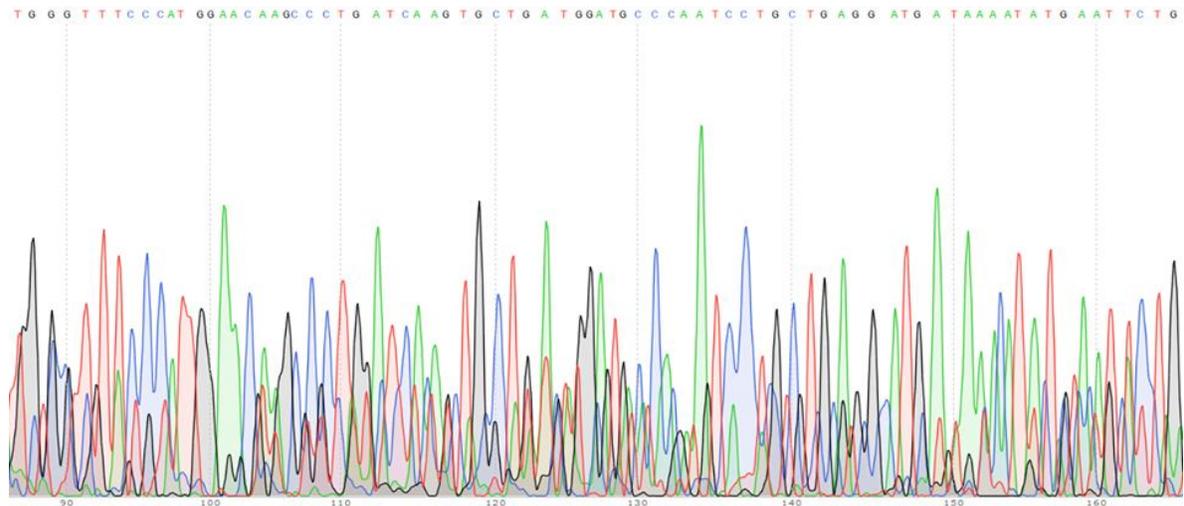


Figura 16. Cromatograma de secuenciación de la banda 1 (B1) a partir del oligo Reverse (A7RB1). Imagen de SnapGene.

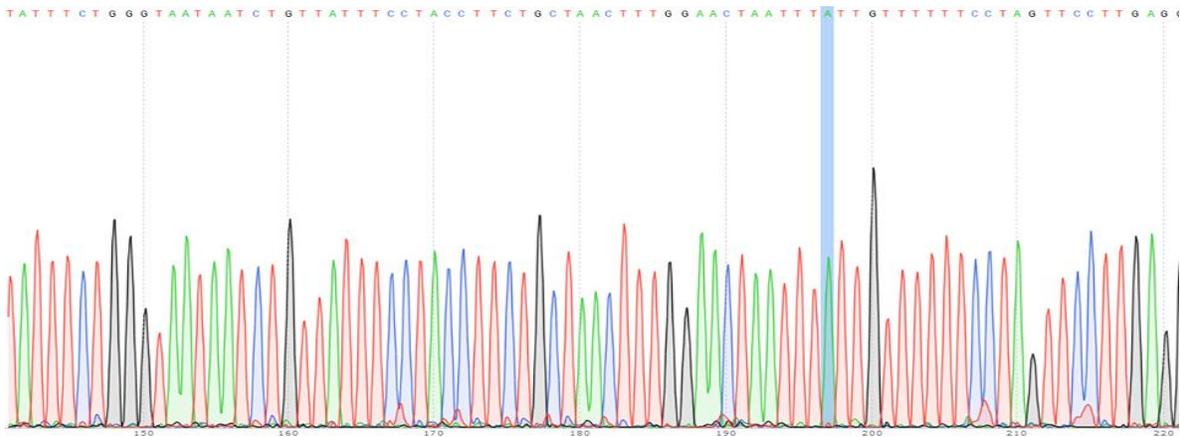


Figura 17. Cromatograma de secuenciación de la banda 2 (B2) a partir del oligo Forward (A7FB2). Imagen de SnapGene.

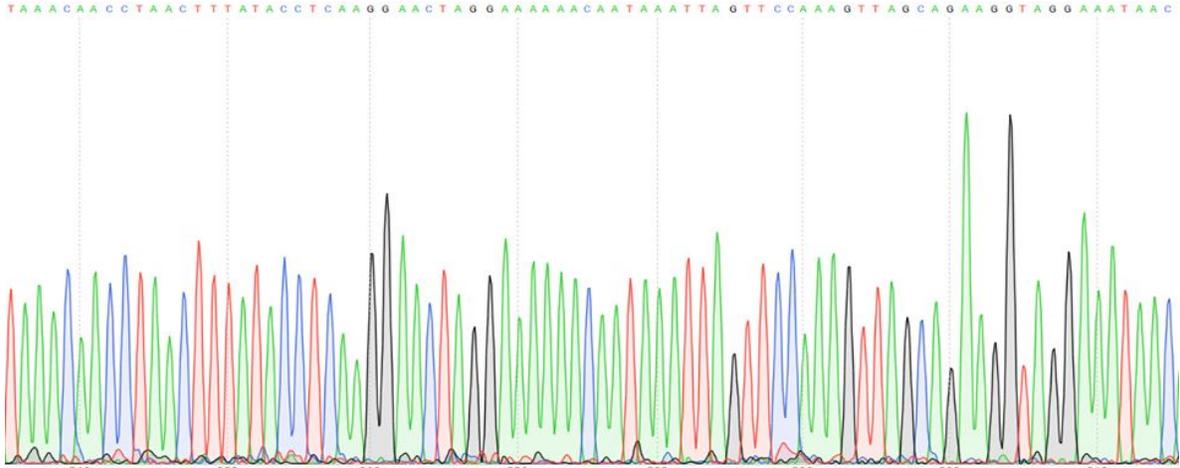


Figura 18. Cromatograma de secuenciación de la banda 2 (B2) a partir del oligo Reverse (A7RB2). Imagen de SnapGene.

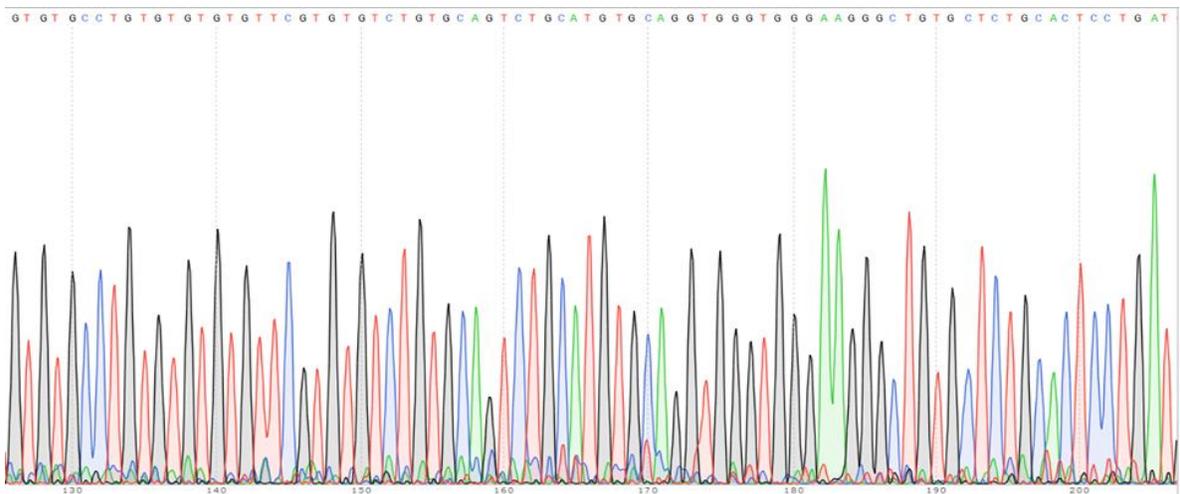


Figura 19. Cromatograma de secuenciación de la banda 3 (B3) a partir del oligo Forward (A7FB3). Imagen de SnapGene.

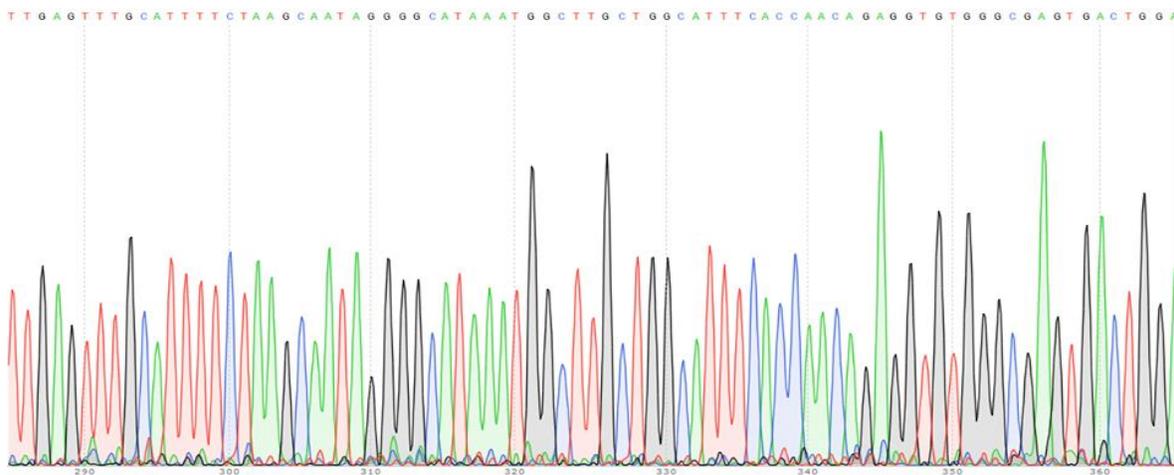


Figura 20. Cromatograma de secuenciación de la banda 3 (B3) a partir del oligo Reverse (A7RB3). Imagen de SnapGene.

Secuenciación

Se obtuvieron seis secuencias resultantes de la secuenciación de las tres bandas enviadas que fueron analizadas para su identificación (Tabla 14). Las secuencias completas están disponibles en el Anexo 4.

Tabla 14. Resultados de hibridación de las bandas secuenciadas.

Secuencia	pb analizadas	Resultado de BLAST	Cobertura de la secuencia	Identidad
A7B1 Forward	147 pb	<i>Homo sapiens</i> ch11 clone RP11-678L3	94%	94%
A7B1 Reverse	128 pb	<i>Homo sapiens</i> ch11 clone RP11-678L3	94%	94%
A7B2 Forward	339 pb	<i>Homo sapiens</i> ch12 clone RP11-96H19	100%	100%
A7B2 Reverse	377 pb	<i>Homo sapiens</i> ch12 clone RP11-96H19	100%	100%
A7B3 Forward	273 pb	<i>Homo sapiens</i> ch2 clone RP11-498O22	100%	100%
A7B3 Reverse	459 pb	<i>Homo sapiens</i> ch12 clone RP11-498O22	100%	100%

Discusión

Partiendo de las secuencias completas (Anexo 1) de los tipo 18 y 45 recuperadas de la base de datos PaVe se realizó el alineamiento en la región del gen L1 por ser esta una de las zonas más conservadas del genoma viral, es decir que presenta menos variación entre secuencias pertenecientes a la misma familia como es el caso de de VPH 18 y 45. El alineamiento es la herramienta con la que se cuenta para encontrar la zonas de mayor coincidencia, que en este caso eran las más adecuadas debido a que se buscaba la detección de ambos tipo con un único par de oligonucleotidos (Tabla 11).

Dinc y colaboradores en 2010 refieren que los criterios de selección empleados para el diseño de los oligonucleótidos (Tabla 8) son una parte muy importante ya que, de estos parámetros como la longitud del oligonucleótido, el porcentaje CG, la Ta y formación de las estructuras secundarias, depende el éxito de la amplificación mediante PCR. Para llevar a cabo el diseño de oligonucleótidos se hizo la búsqueda de estas secuencias cortas que cumplieran con los criterios a lo largo de las secuencias alineadas del gen L1 tipo 18 y 45. El cumplimiento de los parámetros para la selección del par de iniciadores fue evaluado y verificado con "Primer BLAST", "Oligoanalyzer", "Primer3Plus" y "EMBOSS" llegando así a la selección del sistema de oligonucleótidos nombrado A7F/R. Considerando el trabajo de 2013 de Chuang *et al* que menciona que los enfoques teóricos para el diseño de oligonucleótidos dependen de predicciones de estructura y que por tanto es recomendable el empleo de sistemas experimentales de prueba previo a la aplicación *in vivo*, se realizó la evaluación *in silico* para la formación de estructuras secundarias de este par en "Oligoanalyzer" (Anexo 3), con los resultados obtenidos a partir de este análisis se ratificó que la formación de estructuras secundarias como dímeros y "hairpins" no representaba impedimento para su adecuado funcionamiento. Igualmente se realizó la prueba *in silico* de alineamiento global del par A7F/R con la herramienta "Primer BLAST" para verificar las secuencias nucleotídicas que se pueden amplificar con A7F/R. Los resultados obtenidos (Tabla 12) señalan coincidencia únicamente para los genotipos 18 y 45 del VPH, sin opción de hibridación con ningún otro tipo, reafirmando por tanto de manera *in silico* que el par cumple con el objetivo de identificar las secuencias de los VPH 18 y 45 de la familia A7, siendo considerados entonces como adecuados para el uso experimental.

Ahora bien, en la verificación *in vivo* del sistema de oligonucleótidos A7F/R se obtuvo como resultado para la muestra clínica correspondiente a una lesión de bajo grado con VPH 18, un producto de amplificación de 300 pb, que es en efecto, el tamaño de amplificación para el cual fue diseñado el par de iniciadores A7F/R. En cambio, para la identificación del VPH 45 se esperaba un tamaño de amplificación de 297 pb y se obtuvieron diferentes bandas de 200, 500 pb, tamaños que no son correspondían al esperado, esto es debido a que la muestra que

contiene el VPH 45 presenta infección múltiple con otros dos genotipos virales de alta incidencia, por lo que la hibridación de los oligonucleótidos pudo haberse visto afectada como consecuencia del efecto competitivo entre los diferentes genotipos presentes en la muestra, afectando principalmente la detección de los tipos que se encuentren en menor concentración relativamente como lo reporta van Doorn en su estudio de 2006. Este patrón de bandas (200 y 500 pb) se obtuvo también en la muestra con infección simple por VPH 16 (carril C de la Figura 14) y en los carriles donde se evaluaron las líneas celulares provenientes de CaCU: HeLa y SiHa de la Figura 12.

López y Ancízar en su publicación de 2006 mencionan que en las lesiones avanzadas y CaCU prevalecen las formas integradas y que como parte del proceso de esta integración ocurre la linearización de genoma circular que involucra el rompimiento de la doble cadena viral y en la mayoría de los casos se presentan deleciones de fragmentos virales. Las células HeLa, en las cuales se evaluó también el par A7F/R, provienen de una paciente con CaCU por VPH 18, siendo así que en estas células el genotipo 18 se encuentra de forma integrada; como consecuencia de la fragmentación sólo aproximadamente la mitad del genoma está presente en estas células comprometiendo total o parcialmente la integridad de los genes E2, E4, E5, L1 y L2. Tomando en cuenta que en esta muestra las bandas obtenidas presentan diferentes tamaños 200, 500 y 700 pb y que tales no corresponden al tamaño diseñado para la amplificación de este genotipo se puede, por tanto, considerar como efecto de la fragmentación del gen L1 mencionada por Corden en 1999. En el mismo año Meissner así como Rosl y colaboradores en 1989 exponen también las zonas integradas del gen L1 del VPH al genoma de las células HeLa, en dichos trabajos podemos encontrar que parte de la secuencia ausente del gen L1 coincide con la zona de unión de A7F, por tanto al verse suprimida la zona de unión de uno de los oligos se dio oportunidad a los oligonucleótidos amplificaran el patrón de tamaños 200 pb, 500 pb y 700 pb diferentes al establecido en el diseño.

El repetido patrón de bandas obtenido en las diferentes muestras, correspondientes a los tamaños 200, 500 y 700 pb (etiquetado como A7B1, A7B2 y A7B3 respectivamente) fue secuenciado y los resultados (Tabla 14) arrojaron que dichas bandas correspondían a clones de los cromosomas 11 (región 11q24.3) en A7B1; cromosoma 12 (región 12q13.11) en A7B2 y cromosoma 2 (región 2p24.1) en A7B3.

La región 11q24.3 amplificada en A7B1 igualmente fue encontrada por Hu y colaboradores en 2015 como un sitio donde se encontraron integradas secuencias del virus del papiloma humano, en este trabajo los autores señalan integración del virus en seis puntos diferentes correspondientes a los genes ETS1, BARX2, ARHGAP32, APLP2, PRDM10 y TMEM225. Siguiendo con la secuencia recuperada en A72B se encontró también que la inserción del virus en algunas de las muestras evaluadas por Hu y su equipo se vieron afectadas en la zona donde se encuentran los genes SLC38A4 y SLC38A2, esta zona está ubicada en la región 12q13.11, misma

que fue identificada en la secuenciación de la banda A7B2 amplificada en este trabajo. Estas zonas han sido escasamente reportadas como blanco de inserción del VPH y no son reconocidas como "hotspots", es decir, zonas donde la probabilidad de inserción es mayor. No obstante, el no tener muchos reportes que indiquen puntos de inserción en tales regiones no descarta la capacidad que el virus posee de insertarse en diferentes sitios a lo largo del genoma tal como lo mencionan Xu y colaboradores.

Blumrich y su equipo, describen en 2011 que el sitio frágil FRA2C ubicado en la región 2p24 consta de dos sitios frágiles comunes en 2p24.3 y 2p24.2. Los sitios frágiles comunes cromosómicos son regiones genómicas inestables que se rompen bajo el estrés de la replicación, Fungtammasan *et al* en 2012 señala también que estos sitios se han visto involucrados en reordenamientos cromosómicos en el cáncer y como sitios de integración viral. Estos sitios son muy cercanos a la región amplificada en A7B3: 2p24.1 lo cual sugiere la susceptibilidad de esta región como sitio de integración. En otro estudio realizado en 2008 por Dall *et al* se presenta justamente esta región como un sitio de integración teniendo como gen más cercano HS1BP3, dato que se reitera con los hallazgos realizados en 2015 por Hu y su equipo en los cuales dentro de la región 2p24.1 mencionan también inserción en un punto correspondiente a HS1BP3 y tres puntos más dentro de la misma región cromosómica sin reportes previos los cuales corresponden a los genes KLHL29, APOB, RHOB.

Los resultados de este trabajo señalan que con el sistema de oligonucleótidos A7F/R fue posible cumplir el objetivo de hibridar con secuencias del VPH 18, perteneciente a la familia A7, y obtener la amplificación el fragmento esperado de 300 pb en muestras donde la fragmentación del genoma viral al integrarse no represente delección de las zonas de unión de los oligonucleótidos. En el caso de las líneas celulares de cáncer cervicouterino, en las cuales el virus ya ha cursado por un proceso de integración que conlleva delecciones parciales o completas de los genes virales entre ellos L1 se encontró que las zonas de unión del sistema A7F/R se vieron comprometidas por dichas fragmentación, obteniéndose como consecuencia un patrón de amplificación de bandas de tamaños diferentes al del diseño (200, 500 y 700 pb), el análisis de secuencias de estas bandas permitió identificar que estos fragmentos a su vez corresponden a regiones cromosómicas donde se han encontrado inserción del VPH. Por tanto, la hibridación de los oligonucleótidos A7F/R no descarta su relación con presencia detección de la presencia viral.

Conclusiones

Mediante la evaluación *in silico* del par A7F/R se confirmó la capacidad del mismo para hibridar con las secuencias del gen L1 de manera selectiva para los miembros de interés de la familia A7 bajo ciertas condiciones de reacción que posteriormente fueron evaluadas también en muestras biológicas.

La verificación de los oligonucleótidos diseñados en muestras biológicas dio como resultado la amplificación de la banda esperada de 300 pb en la muestra clínica con infección simple por el genotipo 18, cumpliendo en este caso el objetivo de identificación de esta secuencia perteneciente a la familia A7 mediante el sistema de oligonucleótidos A7F/R. Por otro lado, el resultado para verificación de detección múltiple fue variable para la muestra que contenía el tipo 45 ya que correspondía a una infección mixta donde adicional al tipo buscado se encontraban los VPH 16 y 31, por lo cual no se descarta que el efecto competitivo entre estos diferentes tipos afectara la capacidad de los oligonucleótidos para hibridar con el otro miembro de interés de la familia A7.

Adicional a los objetivos puntualizados para este trabajo se obtuvieron, a partir de los resultados de amplificación en líneas celulares con CaCU, datos sobre sitios de integración del VPH que reiteran la capacidad de este virus para integrarse en diferentes puntos del genoma humano más allá de los ya registrados como "hotspots" así como la tendencia de integración viral en sitios frágiles. Por lo cual, la hibridación del par de oligonucleótidos A7F/R no descarta su relación con presencia de la presencia viral.

Referencias

- Arévalo, A. R., Arévalo, D. E. y Villarroel, C. J. (2017). El cáncer de cuello uterino. *Revista Médica La Paz*, 23(2), 45-56.
- AEPCC. (2018). Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia. Infección por el Virus del Papiloma Humano. Recuperado el 27 de noviembre de 2018 de <http://www.aepcc.org/infeccion-por-el-vph/>
- Bengtsson, E. y Malm, P. (2014). Screening for cervical cancer using automated analysis of PAP-smears. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2014. doi:10.1155/2014/842037
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., y de Villiers, E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1), 70–79. doi:10.1016/j.virol.2010.02.002
- Bernard, H.U., Calleja, I.E., Dunn, S., T. (2006). Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*, 118(5), 1071-1076. doi:10.1002/ijc.21655
- Blumrich, A., Zapatka, M., Brueckner, L. M., Zheglo, D., Schwab, M. y Savelyeva, L. (2011). The FRA2C common fragile site maps to the borders of MYCN amplicons in neuroblastoma and is associated with gross chromosomal rearrangements in different cancers. *Human Molecular Genetics*, 20(8), 1488–1501. doi:10.1093/hmg/ddr027
- Burd, E. M. (2003). Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 1-17. doi:10.1128/cmr.16.1.1-17.2003
- Burk, R. D., Chen, Z., Harari, A., Smith, B. C., Kocjan, B. J., Marver, P. J. y Poljak, M. (2011). Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV 6 and HPV 11 isolates to variant lineages. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*, 20(3), 113-23.

- Buy, J. N., Ghossain, M. (2013). Embryology, Anatomy, and Histology of the Cervix. *Gynecological Imaging* 649-652. doi:10.1007/978-3-642-31012-6_26
- Chen, Z., Schiffman, M., Herrero, R., DeSalle, R., Anastos, K., Segondy, M., ... Burk, R. D. (2013). Evolution and taxonomic classification of alphapapillomavirus 7 complete genomes: HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68 and HPV70. *PLoS one*, 8(8), e72565. doi:10.1371/journal.pone.0072565
- Chen, Z., DeSalle, R., Schiffman, M., Herrero, R., & Burk, R. D. (2009). Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45, and 97. *Journal of virology*, 83(3), 1443–1455. doi:10.1128/JVI.02068-08
- Chuang, L. Y., Cheng, Y. H., Yang, C. H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology letters*, 35(10), 1541-1549. doi:10.1007/s10529-013-1249-8
- Clifford, G. M., Smith, J. S., Plummer, M., Muñoz, N., & Franceschi, S. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British journal of cancer*, 88(1), 63–73. doi:10.1038/sj.bjc.6600688
- Corden, S. A., Sant-Cassia, L. J., Easton, A. J., & Morris, A. G. (1999). The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Molecular pathology : MP*, 52(5), 275–282. doi:10.1136/mp.52.5.275
- Dall, K. L., Scarpini, C. G., Roberts, I., Winder, D. M., Stanley, M. A., Muralidhar, B., ... Coleman, N. (2008). Characterization of Naturally Occurring HPV16 Integration Sites Isolated from Cervical Keratinocytes under Noncompetitive Conditions. *Cancer Research*, 68(20), 8249-8259. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1741
- De la Fuente, D., Guzmán, S., Barboza, O., Gonzáles, R.A. (2010). Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina Universitaria*, 12(49), 231-238.
- De Villiers, E., Fauquet, C., Broker, T., Bernard, H. y zur Hausen, H. (2004). Classification of Papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17–27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033
- Díaz, Y., Báez, M., Pérez, J. y García, M. (2014). Presencia de algunos factores de riesgo de cáncer de cérvix en mujeres con citologías normales. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 30(2).
- Dinc, B., Rota, S., Onan, A., Bozdayi, G., Taskiran, C., Biri, A. y Güner, H. (2010). Prevalence of human papillomavirus (HPV) and HPV-16 genotyping by real-time PCR in patients with several cervical pathologies. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(1), 19-23.
- Dirección General de Epidemiología. (2019) Boletín Epidemiológico. *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información*, 36(29), 16.
- Fungtammasan, A., Walsh, E., Chiaromonte, F., Eckert, K., y Makova, K. (2012). A genome-wide analysis of common fragile sites: what features determine chromosomal instability in the human genome? *Genome research*, 22(6), 993–1005. doi:10.1101/gr.134395.111
- Ginocchio, C. C., Barth, D., y Zhang, F. (2008). Comparison of the Third Wave Invader human papillomavirus (HPV) assay and the digene HPV hybrid capture 2 assay for detection of high-risk HPV DNA. *Journal of clinical microbiology*, 46(5), 1641-6. doi: 10.1128/JCM.01824-07
- GLOBOCAN. (2018). Global Cancer Observatory. Recuperado el día 27 de noviembre de 2018 de <http://gco.iarc.fr/>
- Guglielmo, Z. y Rodríguez, A. (2010). Métodos utilizados en la identificación del virus de papiloma humano. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 33(1), 71-77. doi:10.4321/S1137-66272010000100008
- Hu, Z., Zhu, D., Wang, W., Li, W., Jia, W., Zeng, X., ... Ma, D. (2015). Genome-Wide Profiling of HPV Integration in Cervical Cancer Identifies Clustered Genomic Hot Spots and a Potential

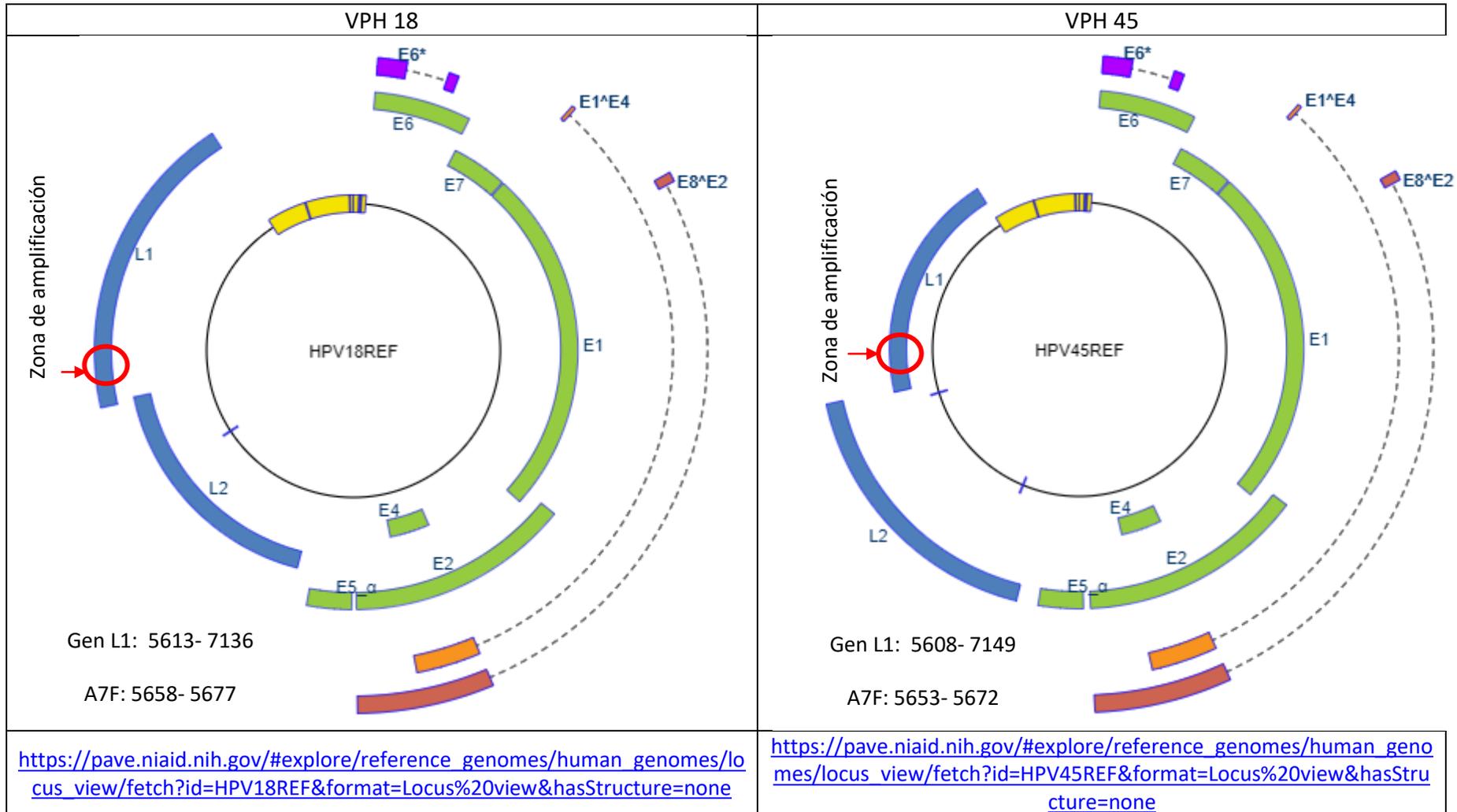
- Microhomology-Mediated Integration Mechanism. *Nature Genetics*, 47(2), 63-158. doi:10.1038/ng.3178
- Iftner, T. y Villa, L. (2003). Chapter 12: Human Papillomavirus Technologies, *Journal of the National Cancer Institute. Monographs.*, 2003(31),80-8
doi:10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003487
- Jastreboff, A. M., & Cymet, T. (2002). Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgraduate medical journal*, 78(918), 225–228. doi:10.1136/pmj.78.918.225
- López, A. y Lizano, M. (2006) Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerología*, 1, 31-55.
- López, M., Flores, M., Villalba, J. y Sánchez, V. (2012). Prevalence of human papillomavirus in women from Mexico City. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 2012(384758), 1-4. doi: 10.1155/2012/384758
- López, J. y Ancízar F. (2006). Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, 35(1), 5-32.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of visualized experiments: JoVe*, (63), e3998. doi:10.3791/3998
- Meissner, J. D. (1999). Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *Journal of General Virology*, 80(7), 1725–1733.
- Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., ... Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*. 6;348(6), 518-27. doi:10.1056/NEJMoa021641
- PaVE. (2018). Papillomavirus Episteme. Recuperado el día 27 de Noviembre de 2018 de <https://pave.niaid.nih.gov/>
- Picconi, M. (2013). Detección de virus papiloma humano en la prevención del cáncer cérvico-uterino. *Medicina Buenos Aires*, 73(6), 585-596.
- Qu, W., Jiang, G., Cruz, Y., Chang, C. J., Ho, G. Y., Klein, R. S., & Burk, R. D. (1997). PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *Journal of clinical microbiology*, 35(6), 1304–1310.
- Ramesh, R., Munshi, A., y Panda, S. K. (1992). Polymerase chain reaction. *The National Medical Journal of India*, 5(3), 115-119.
- Rivera, Z., Aguilera T. y Larraín, H. (2002). Epidemiología del virus papiloma humano (HPV). *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 67(6), 501-506.
- Rodríguez, D., Pérez, J. y Sarduy, M. (2014). Infección por el virus del papiloma humano en mujeres de edad mediana y factores asociados. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 40(2), 218-232.
- Rodríguez, A., Echavarría, A., Murlá, A. y Vázquez, C. (1999). Factores de riesgo del cáncer de cérvix en el municipio Cerro. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 37(1), 40-46.
- Rösl, F., Westphal, E. y zur Hausen, H. (1989). Chromatin structure and transcriptional regulation of human papillomavirus type 18 DNA in HeLa cells. *Molecular Carcinogenesis*, 2(2), 72–80. doi:10.1002/mc.2940020205

- Salcedo, M., Pina, P., Vallejo, V., Monroy, A., Aguilar, A., Cortes, E.I, ... Grijalva, I. (2014). Human papillomavirus genotypes among females in Mexico: a study from the Mexican institute for social security. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*, 14(23), 10061-10066. doi:10.7314/apjcp.2014.15.23.10061
- Sanabria, J., Fernández, Z., Cruz, I., Oriolo, L. y Llanuch, M. (2011) El cáncer cervicouterino y las lesiones precursoras: revisión bibliográfica. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 15(4), 295-319.
- Santos, G., Márquez, L., Reyes, J. y Vallejo, V. (2014). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2), 166-171.
- Seaman, W. T., Andrews, E., Couch, M., Kojic, E. M., Cu-Uvin, S., Palefsky, J., ... Webster-Cyriaque, J. (2010). Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. *Virology journal*, 7, 194. doi:10.1186/1743-422X-7-194
- Silva, R., León, D., Brebi, P., Ili, C., Roa, J. C. y Sánchez, R. (2012). Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Rev Chilena Infectol*, 30(2), 186-192.
- van Doorn, L., Moliñ, A., Kleter, B., Quint, W., y Colau, B. (2006). Highly effective detection of human papillomavirus 16 and 18 DNA by a testing algorithm combining broad-spectrum and type-specific PCR. *Journal of clinical microbiology*, 44(9), 3292–3298. doi:10.1128/JCM.00539-06
- Vasquez, W., Rotela, V. y Ortiz, Y. (2017). Virus del papiloma humano: Revisión de literatura. *Ciencia e investigación médica estudiantil latinoamericana*, 22(1), 72-76.
- Waters, D. L., Shapter, F. M. (2014) The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods. *Cereal Genomic*, 1099, 65-75. doi:10.1007/978-1-62703-715-0_7
- WHO. (2018). World Health Organization. Cancer. Recuperado el 27 de noviembre de 2018 de <https://www.who.int/cancer/es/>
- Woodman, C. B., Collins S. I. y Young L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*, 7(1), 11-22. doi:10.1038/nrc2050
- Xu, B., Chotewutmontri, S., Wolf, S., Klos, U., Schmitz, M., Dürst, M., & Schwarz, E. (2013). Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. *PLoS one*, 8(6), e66693. doi:10.1371/journal.pone.0066693
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., y Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
- Zhang, L., Liao, H., Yang, B., Geffre, C. P., Zhang, A., Zhou, A., ... Zheng, W. (2015). Variants of human papillomavirus type 16 predispose toward persistent infection. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(7), 8453–8459.
- Zheng, Z. M., & Baker, C. C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 11, 2286–2302.
- zur Hausen, H. (1991) Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*, 184(1), 9-13. doi:10.1016/0042-6822(91)90816-t
- zur Hausen H. (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 78, 1-30.
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews. Cancer*, 2(5), 342-350. doi:10.1038/nrc798

Anexos

Anexo 1

Secuencias del gen L1 obtenidas de PaVE de National Institute of Allergy and Infectious Diseases.



Anexo 2

Protocolo de purificación de bandas con kit comercial "Wizard®".

Añadir 75ml de etanol al 95% a "Membrane Wash Solution". Después de cortar la banda esta se puede almacenar a 4°C o -20°C. Añadir "Membrane Binding Solution" 10 µl por cada 10mg, mezclar con vortex e incubar 10 minutos entre 50-65°C ayudarse del vortex para terminar de disolver la agarosa y centrifugar brevemente. Colocar "SV Minicolumn" en un "Collection Tube". Añadir el gel ya disuelto en la columna e incubar por un minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 14000rpm por un minuto. Desechar lo que quede en el tubo inferior. Agregar 700 µl de "Membrane Wash Solution" y centrifugar por un minuto a 14000rpm. Repetir el lavado con 500 µl y centrifugar por cinco minutos a 14000rpm. Vaciar el tubo y centrifugar por un minuto con la tapa de la centrifuga abierta para evaporar el etanol. Transferir la columna a un tubo de 1.5ml. Añadir 30 µl de agua libre de nucleasas sin tocar la membrana. Incubar por un minuto a temperatura ambiente. Centrifugar por un minuto a 14000rpm. Desechar la columna y almacenar el purificado a -20°C.

Anexo 3

Evaluación completa en OligoAnalyzer

FORWARD (A7F)	SEQUENCE	5'- CCT TCT GTG GCA AGA GTT GT -3'			
	COMPLEMENT	5'- ACA ACT CTT GCC ACA GAA GG -3'			
	LENGTH	20			
"Hairpin"	Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m (°C)	
	1		-0.35	29.6	
	2		0.1	23.8	
	3		0.44	16.8	
	4		0.47	18.9	
	5		0.64	13.4	

Homodímero		Dimer Sequence: 5'- CCTTCTGTGGCAAGATTGT -3' Maximum Delta G: -36.5 kcal/mole	Delta G: 3.14 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : : : : : 3' TGTTGAGAACGGTGTCTTCC	
		Delta G: -3.9 kcal/mole Base Pairs: 3 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : 3' TGTTGAGAACGGTGTCTTCC	Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : 3' TGTTGAGAACGGTGTCTTCC	
		Delta G: -3.54 kcal/mole Base Pairs: 3 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : 3' TGTTGAGAACGGTGTCTTCC	Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : : : : 3' TGTTGAGAACGGTGTCTTCC	
		Delta G: -3.17 kcal/mole Base Pairs: 3 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : 3' TGTTGAGAACGGTGTCTTCC	Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : : : : 3' TGTTGAGAACGGTGTCTTCC	
Heterodímero	Primary Sequence: 5'- CCTTCTGTGGCAAGATTGT -3' Secondary Sequence: 5' ACCTTAGGCTGACCAAG 3' Maximum Delta G: -36.5 kcal/mole	Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : : : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : : : : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	
	Delta G: -6.61 kcal/mole Base Pairs: 4 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	Delta G: -1.05 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT . : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	
	Delta G: -6.37 kcal/mole Base Pairs: 4 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	Delta G: -1.34 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : 3' GCACCAATCGGAAATCCA
	Delta G: 3.14 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	Delta G: -1.94 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	Delta G: 1.34 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	Delta G: -1.34 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : 3' GCACCAATCGGAAATCCA
	Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : : : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	Delta G: -1.34 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : 3' GCACCAATCGGAAATCCA	Delta G: 1.34 kcal/mole Base Pairs: 2 5' CCTTCTGTGGCAAGATTGT : 3' GCACCAATCGGAAATCCA

REVERSE (A7R)	SEQUENCE	5'- ACC TAA AGG CTG ACC ACG -3'				
	COMPLEMENT	5'- CGT GGT CAG CCT TTA GGT -3'				
	LENGTH	18				
"Hairpin"	Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$
	1		-0.84	37.9	-20.4	-65.59
	2		-0.65	34.7	-20.5	-66.59
Homodímero	Delta G: -4.67 kcal/mole Base Pairs: 3					
	5' ACCTAAAGGCTGACCACG					
	:::					
	3' GCACCAGTCGGAAATCCA					
	Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2					
	5' ACCTAAAGGCTGACCACG					
	3' GCACCAGTCGGAAATCCA					
Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2						
5' ACCTAAAGGCTGACCACG						
::						
3' GCACCAGTCGGAAATCCA						
Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2						
5' ACCTAAAGGCTGACCACG						
3' GCACCAGTCGGAAATCCA						
Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2						
5' ACCTAAAGGCTGACCACG						
::						
3' GCACCAGTCGGAAATCCA						
Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2						
5' ACCTAAAGGCTGACCACG						
::						
3' GCACCAGTCGGAAATCCA						
Delta G: -0.96 kcal/mole Base Pairs: 2						
5' ACCTAAAGGCTGACCACG						
3' GCACCAGTCGGAAATCCA						

