



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

**POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Cuantificación del gen E2 del  
papilomavirus humano tipo 16 por  
PCR anidada en tiempo real en  
displasias del cuello uterino**

Tesis que presenta  
**Q.B. Eduardo Emmanuel Valdez Morales**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias**

En la especialidad de  
**Biología Molecular**

Director de la tesis:  
**Dr. Rubén López Revilla**

San Luís Potosí, S.L.P., 1 Febrero de 2007



## CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS

La tesis “**Cuantificación del gen E2 de papilomavirus humano tipo 16 por PCR anidada en tiempo real en displasias del cuello uterino**” presentada para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Eduardo Emmanuel Valdez Morales y aprobada el 1 de febrero de 2007 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

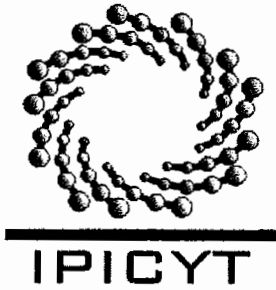
Dr. Rubén López Revilla

Dr. Ángel Alpuche Solís

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla. Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-191123).



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 034 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 1 días del mes de febrero del año 2007, se reunió a las 09:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Rubén López Revilla</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Eduardo Emmanuel Valdez Morales**

sobre la Tesis intitulada:

*Cuantificación del Gen E2 del Papilomavirus Humano Tipo 16 por PCR Anidada en Tiempo Real en Displasias del Cuello Uterino*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Rubén López Revilla**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 12:38 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 1 días del mes febrero de 2007.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico

  
**L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



## **DEDICATORIAS**

A mi linda esposa Raquel y a mi hermoso hijo Víctor.

A mis padres Juanita y Agustín.

A mis abuelos Rosa y Gilberto.

A mis hermanos Agustín, Ruth y Julio.

**¡Gracias por todo!**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al IPICyT por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y al CONACYT por el apoyo económico.

Al Dr. Rubén López Revilla por su valiosa guía y enseñanzas.

A Coco y Mireya por sus aportaciones y el gran apoyo en el laboratorio que siempre me dieron.

**¡Muchas gracias!**

# ÍNDICE

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS .....	II
CRÉDITOS INSTITUCIONALES .....	III
ACTA DEL EXAMEN .....	IV
DEDICATORIAS .....	V
AGRADECIMIENTOS .....	VI
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
INTRODUCCIÓN .....	1
MATERIALES Y MÉTODOS .....	4
CONSTRUCCIÓN DE pEV201 .....	4
TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> TOP 10 CON pEV201.....	4
DETECCIÓN ULTRARRÁPIDA DE TRANSFORMANTES .....	5
PREPARACIÓN DE pEV201 .....	5
CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE E2-1031 Y E2-177.....	7
CARACTERIZACIÓN DE pEV201 .....	7
<i>Digestión con PstI</i> .....	7
<i>Amplificación de E2-1031</i> .....	8
<i>Amplificación de E2-177</i> .....	8
CALIBRACIÓN DE LA PCR-TR ANIDADA .....	8
<i>Preamplificación</i> .....	8
<i>Calibración de la PCR-TR anidada</i> .....	9
<i>Perfil de extinción de la fluorescencia</i> .....	9
<i>Cuantificación del número de copias del gen E2-VPH16</i> .....	9
<i>Incubación y fluorometría</i> .....	9
RESULTADOS .....	10
CLONACIÓN DEL PRODUCTO E2-1031 DE pVPH16 EN pGEM .....	10
CARACTERIZACIÓN DE PEV201 .....	11
SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL INSERTO E2-1031 pb .....	11
CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE E2-1031pb.....	12
CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE E2-177pb.....	12
AMPLIFICACIÓN DE E2-177 POR PCR-TR DIRECTA Y ANIDADA A PARTIR DE pEV201	13
CUANTIFICACIÓN DEL GEN E2 EN MUESTRAS CERVICALES CON DISPLASIAS .....	14
DISCUSIÓN .....	15
REFERENCIAS.....	20

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1. OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS .....	21
TABLA 2. MEZCLAS DE PCR PARA AMPLIFICAR E2-1031 .....	22
TABLA 3. MEZCLAS DE PCR PARA AMPLIFICAR E2-177 .....	23
TABLA 4. DETECCIÓN ULTRARRÁPIDA DE TRANSFORMANTES .....	24

## LISTA DE FIGURAS

FIG. 1. LOCALIZACIÓN Y PRODUCTOS DE PCR DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS E2-1F/1R Y E2-2F/2R EN EL GENOMA DE VPH16. ....	25
FIG. 2 CLONACIÓN DEL PRODUCTO E2-1031 .....	26
FIG. 3. DETECCIÓN ULTRARRÁPIDA DE CLONAS TRANSFORMANTES. ....	27
FIG. 4. DIGESTIÓN DE pEV201 Y pGEM CON <i>Pst</i> I. ....	28
FIG. 5. AMPLIFICACIÓN DE E2-1031 A PARTIR DE pEV201 INTACTO Y LINEAL. ....	29
FIG. 6. AMPLIFICACIÓN ANIDADA DE E2-177 pb CON LA PAREJA DE OLIGONUCLEÓTIDOS E2-2F/2R. ....	30
FIG. 7. SECUENCIA DEL INSERTO E2-1031 PRESENTE EN pEV201.....	31
FIG. 8. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE E2-1031.....	32
FIG. 9. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE E2-177.....	33
FIG. 10. PREAMPLIFICACIÓN DE pEV201 Y DILUCIONES PARA CALIBRAR LA PCR-TR ANIDADA. ....	34
FIG. 11. AMPLIFICACIÓN DE E2-177 POR PCR EN TIEMPO REAL DIRECTA Y ANIDADA. ....	35
FIG. 12. EXTINCIÓN TÉRMICA DE LA FLUORESCENCIA DE LOS PRODUCTOS E2-177 ....	36
FIG. 13. AMPLIFICACIÓN DE E2-177 POR PCR-TR ANIDADA.....	37
FIG. 14. CORRELACIÓN DEL NÚMERO DE LAS COPIAS DEL GEN E2-VPH16 CON EL GRADO DE DISPLASIA DEL CÉRVIX.....	38
FIG. 15. EXTINCIÓN DE LA FLUORESCENCIA DEL PRODUCTO E2-177 DE LAS MUESTRAS CON DISPLASIA CERVICAL Y LAS DE LA FAMILIA DE CURVAS GENERADAS A PARTIR DE pEV201.....	39

## ANEXOS

1. CÁLCULO DEL NÚMERO DE COPIAS DE LA SECUENCIA E2-1031 EN pEV201 .....	40
2. NÚMERO RELATIVO DE COPIAS (NRC) VS $\Delta$ CT .....	41



## RESUMEN

La transformación maligna del epitelio cervicouterino es causada por infección persistente de virus del papiloma humano (VPH) que expresan los oncogenes virales E6 y E7. El gen viral E2 codifica un represor de los oncogenes E6 y E7 y usualmente se interrumpe durante la integración del genoma viral, con la consecuente pérdida de su actividad represora que resulta en sobreexpresión persistente de los oncogenes que inician la transformación neoplásica y provocan la progresión tumoral. La integración del genoma viral es más frecuente en las lesiones neoplásicas de alto grado y constituye un marcador de progresión tumoral. La determinación del estado físico del genoma viral puede hacerse por PCR en tiempo real (TR) mediante la relación del número de copias de los genes E2 y E6, ya que el primero usualmente es eliminado durante la integración del genoma viral al genoma celular. Con el fluorocromo SYBRGreen ha sido posible cuantificar las copias de los genes E2- y E6-VPH16 y correlacionar el cociente E2/E6 con el grado de la lesión neoplásica. En este trabajo aumentamos notablemente la sensibilidad de la PCR-TR para determinar el número de copias del gen E2 con un método de PCR-TR desarrollado en nuestro laboratorio en el cual preamplificamos con 15 ciclos mediante PCR convencional y luego llevamos a cabo PCR anidada en presencia de EvaGreen, fluorocromo más eficiente que SYBRGreen. Con este método hemos podido correlacionar el número de copias con el grado de las lesiones displásicas del cérvix; y esperamos pronto cuantificar simultáneamente los genes E2- y E6-VPH16 para determinar la integración del genoma viral. Nuestra estrategia incluyó la construcción del plásmido pEV201 con el inserto E2-VPH 16 de 1031 pb (E2-1031) amplificado a partir del genoma completo de VPH16, su clonación en *Escherichia coli* TOP 10 y su propagación y purificación para usarlo como control de calibración de las mezclas de PCR-TR. Los ensayos de PCR-TR se llevaron a cabo en dos etapas: 1) PCR1, mezclas de preamplificación convencional de E2-1031 por 15 ciclos a partir de 0.096 ng de DNA de pEV201 ( $2.1 \times 10^7$  copias) y 2) PCR2, mezclas con diluciones logarítmicas seriadas de PCR1 para amplificar el producto E2-177 por PCR-TR anidada en mezclas equivalentes a  $2.1 \times 10^3$ - $2.1 \times 10^7$  copias de pEV201. Cuantificamos el gen E2-VPH16 en siete raspados cervicales con lesiones displásicas (tres NIC1, dos NIC2, uno NIC3, uno de cáncer invasor) por interpolación en la familia de curvas tipo que fueron consistentes con valores apropiados de Ct ( $\Delta Ct_{avg} = 3.68$ , 87% de eficiencia,  $r^2 = 0.999$ ). Los productos generados a partir del plásmido control y las muestras problema tuvieron el mismo perfil de extinción térmica de fluorescencia con un pico a 91°C. El número de copias promedio de E2-VPH16 por 50 ng de DNA de muestras de raspado cervical fue 3185 para NIC1, 23 para NIC2, 4189 para NIC3 y 24000 para cáncer invasor. Nuestros resultados indican que las muestras efectivamente contienen E2-VPH16, confirman la correlación directa entre la carga viral y el grado de la lesión neoplásica y sientan las bases para determinar el estado físico del genoma de VPH16 por PCR-TR anidada con EvaGreen.

## ABSTRACT

Malignant transformation of the uterine cervical epithelium is caused by persistent infection of human papillomavirus (HPV) expressing the E6 and E7 oncogenes. The viral E2 gene encodes a repressor of both oncogenes and is usually disrupted during integration of the viral to the cellular genome; the resulting repressor loss allows persistent overexpression of the oncogens which start neoplastic cell transformation and provokes tumor progression. Integration of the viral genome is more frequent in high degree neoplastic lesions and therefore constitutes a tumor progression marker. Determination of the physical status of the viral genome (i.e., integration) can be performed with real time (RT) PCR through the E2/E6 copy number ratio, since the E2 gene is usually deleted during integration. The SYBRGreen fluorochrome has been used to quantify HPV16 E2 and E6 genes and to correlate the E2/E6 ratio with the degree of cervical neoplastic lesions. In this work we have significantly increased the sensitivity of the E2 gene copy number quantitation by using a RT-PCR method recently developed in our laboratory which consists of 15 cycles of conventional PCR amplification followed by nested PCR-RT with EvaGreen, a fluorochrome more efficient than SYBRGreen. With this new method we confirmed the correlation between copy number and the degree of the cervical neoplastic lesion and expect soon to quantify the E2- and E6-HPV16 genes simultaneously to determine the viral genome integration in displastic cervical scrapings. Our experimental strategy included construction of pEV201, containing the E2-HPV16 1031 bp insert (E2-1031) that had been amplified from pHPV16 (known to contain the complete HPV16 European reference genome); the construct was used to obtain cloned *Escherichia coli* TOP10 transformants from which it was propagated and purified as a calibration control. PCR-TR assays were performed in two steps: 1) PCR1, conventional direct PCR mixtures containing  $2.1 \times 10^7$  copies (4.65 ng) of pEV201 DNA incubated 15 cycles to preamplify E2-1031 and 2) PCR2, nested PCR-RT mixtures containing 1/50 volume of serial logarithmic dilutions of the PCR1 mixtures, equivalent to  $2.1 \times 10^4$ - $2.1 \times 10^7$  initial copies of pEV201 to amplify E2-177. The E2-HPV16 gene was quantified in seven cervical scrapings with displastic lesions of known degree (three CIN1, two CIN2, one CIN3, and one invasive cervical cancer), whit consistent family curves with appropriate values ( $\Delta C_{t_{avg}} = 3.68$ , PCR efficiency 87%,  $r^2 = 0.999$ ). RT-PCR products generated from pEV201 controls and problem samples had identical thermal fluorescence extinction profiles with a peak signal at 91°C. Average E2-HPV16 gene copy numbers from the problems were 3185 for CIN1, 23 for CIN2, 4189 for CIN3 and 24000 for the invasive cervical cancer samples. Our results indicate that the problem samples do contain E2-HPV16, confirm the direct correlation known to exist between viral load and degree of the cervical neoplastic lesion and set the foundation to determine the integration of the HPV16 genome with our nested PCR-RT EvaGreen method in the near future.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres del mundo y la primera en países en desarrollo, incluyendo a México (Lewis 2004). En 2002 hubo alrededor de 13,400 muertes por CaCu en México (i.e., una cada hora y media) (Muñoz et al. 2003).

El principal factor de riesgo para el desarrollo del CaCu es la infección persistente por virus del papiloma humano (VPH), reconocido actualmente como la enfermedad de transmisión sexual más frecuente (Walboomers et al. 1999, zur Hausen 2002). Hay más de 100 tipos de VPH de alto riesgo y bajo riesgo. Los tipos de alto riesgo son los que se encuentran asociados a la mayoría de los casos de cáncer cervical en el mundo y el más frecuente es el VPH16 (Muñoz et al. 1993).

La proliferación descontrolada de las células del epitelio cervical resulta de la sobreexpresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 que bloquean a las proteínas supresoras de tumores Rb y p53 (Dyson et al. 1989). Tres procesos alternativos pueden incrementar la expresión de las oncoproteínas virales: 1) alto número de copias del DNA de VPH (el DNA de VPH16 aumenta en órdenes de magnitud al aumentar el grado de enfermedad cervical) (Kozuca et al. 2000), 2) mutaciones que afectan los motivos YY1 en la región larga de control del genoma de VPH (Kozuca et al. 2000) y 3) integración del DNA de VPH al genoma celular (el ORF E2, cuyo producto reprime al promotor P97 de los genes E6 y E7 es interrumpido o destruido preferentemente durante la integración) (Swan et al. 1999). La integración del genoma viral es más frecuente en las lesiones de alto grado y parece aumentar la velocidad de progresión hacia el cáncer microinvasor e invasor (Nagao et al. 2002).

Un método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) con SYBRGreen, desarrollado para determinar el estado físico del genoma de VPH16 (i.e., episomal, integrado, mixto), distingue de manera confiable la forma

episomal pura de formas mixtas del DNA de VPH16, cuando 40% o más del DNA viral está integrado con ausencia de E2. El método se basa en la supuesta interrupción preferente del gen E2 en el caso de integración del genoma viral, que a su vez provocaría la pérdida de secuencias amplificables del gen E2. El número de copias de los genes E6 y E2 son equivalentes en las formas episomales; el número de copias del gen E2 es menor que el de E6 en las formas de DNA de VPH16 concomitantes (integrada y episomal) y nulo en las formas integradas (Nagao et al. 2002).

Nagao et al. (2002) determinaron el estado físico de VPH-16 en 50 casos de displasias: 15 casos (30%) con formas integradas puras (i.e, sin E2), 21 casos (42%) con formas episomales puras ( $E2/E6 > 0.6$ ) y 14 casos (28%) con formas mixtas ( $E2/E6 < 0.6$ ). Cuatro de los casos mixtos sugeridos por PCR-TR fueron evaluados por electroforesis en dos dimensiones para verificar el resultado, ya que un estudio anterior había encontrado que por PCR multiplex dos de esas muestras sugerían estado episomal. Los autores concluyeron que la prevalencia de las formas concomitantes e integradas aumenta con la progresión de la enfermedad cervical y que la PCR-TR es una técnica rápida y más sensible que la PCR multiplex y el Southern blot para la detección del estado físico del DNA VPH16 (Nagao et al. 2002).

Nuestro grupo ha desarrollado un método de PCR-TR anidada para determinar tanto la carga como el estado físico del genoma de VPH16. El uso de EvaGreen como fluorocromo hace al método más barato, 20 veces más sensible e igualmente específico y reproducible que el método con SYBRGreen (Hernández-Arteaga et al. 2006).

El propósito de este trabajo fue determinar las condiciones para cuantificar el gen E2-VPH16 adaptando nuestro método de PCR-TR anidada para el gen E6-VPH16. Una vez desarrollada esta segunda parte podríamos determinar el estado físico del genoma de VPH16 mediante la comparación del número de copias de los genes E6 y E2 en lesiones displásicas del cérvix.

Para determinar las condiciones óptimas para amplificar el producto E2-1031 (de 1031 pb, incluye los nucleótidos 2808-3839 del genoma de VPH16) que

cubre la mayor parte del ORF E2-VP16 (longitud total: 1091 pb) a partir de pHPV16, plásmido con el genoma completo del prototipo de VPH16 europeo. Clonamos E2-1031 en pGEM (vector de 3000 pb) y así obtuvimos la construcción pEV201 con el inserto. Considerando que pEV201 tiene una longitud de 4031 pb, calculamos que en 0.096 ng de pEV201 hay  $2.1 \times 10^7$  copias de E2-1031. A partir de diluciones logarítmicas seriadas de pEV201 preparamos mezclas de PCR con  $2.1 \times 10^3$ - $2.1 \times 10^7$  copias del plásmido para preamplificar el producto E2-1031 mediante 15 ciclos de PCR convencional y luego amplificar un fragmento de E2-177 por PCR anidada en tiempo real en presencia de EvaGreen para obtener familias de curvas tipo consistentes que por interpolación nos permitieron cuantificar las copias del gen E2-VP16 presentes en siete muestras de raspados cervicales con displasias de grado creciente (tres NIC1, una NIC2, dos NIC3 y una de cáncer invasor) asociadas a infección única por VPH16.

Por interpolación con los valores de las curvas tipo pudimos cuantificar las copias del gen E2-VP16 presentes en las muestras de pacientes con displasias cervicales de grado creciente. Por cada 50 ng de DNA total las muestras de NIC1 contenían 14, 4,190 y 5,350 copias; la de NIC2 23 copias; las de NIC3 2,690 y 6,940 copias y la de cáncer invasor 210,000 copias. Los productos amplificados a partir del plásmido control (pEV201) y las muestras problema tuvieron el mismo perfil de extinción térmica de la fluorescencia, con una temperatura de disociación máxima a 91°C.

Con este trabajo cumplimos la meta de definir las condiciones apropiadas para cuantificar E2-VP16 mediante PCR-TR anidada con EvaGreen en pacientes con displasias ya que 1) las familias de curvas tipo para amplificar E2-177 mediante PCR-TR directa y anidada son reproducibles y consistentes con el número inicial de copias de pEV201, 2) la preamplificación de E2-1031 por 15 ciclos de PCR convencional aumenta mil veces el rendimiento de la PCR anidada para E2-177, 3) los productos E2-177 de las lesiones neoplásicas son específicos/idénticos y 4) el número de copias de E2-VP16 correlaciona con el grado de displasia a partir de las muestras NIC 2 y podrá ser comparado con el número de copias de E6 para determinar la integración del genoma viral al celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Construcción de pEV201

Amplificamos el segmento E2-VP16 de 1031 pb (nt 2808-3839) con la pareja de oligonucleótidos E2-1F/1R a partir del plásmido pHPV16 que contiene el genoma completo del prototipo europeo VPH16 (donado por el Dr. Alejandro García-Carrancá) (Tabla 1, Fig. 1).

Las mezclas de PCR, de 50  $\mu$ l, contenían 1  $\mu$ l de DNA y los siguientes componentes:  $MgCl_2$  4 mM, dNTPs 20  $\mu$ M c/u, mezcla de oligonucleótidos 0.6  $\mu$ M (cada uno) y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). El programa del termociclador incluyó desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 40 ciclos con desnaturalización a 94°C por 1 min, annealing a 45°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min.

El producto resultante fue ligado a pGEM (Invitrogen) y clonado en *Escherichia coli* TOP10. La mezcla de ligación fue preparada en un volumen total de 10  $\mu$ l [5  $\mu$ l de amortiguador de ligación 2 $\times$ , 1.5  $\mu$ l de agua, 2  $\mu$ l de la mezcla de PCR, 1  $\mu$ l de DNA ligasa T4 (3U/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l del vector pGEM (50 ng/ $\mu$ l)] e incubada toda la noche a 4°C.

### Transformación de E. coli TOP 10 con pEV201

Añadimos 5  $\mu$ l de la mezcla de ligación a 50  $\mu$ l de suspensiones de células *E. coli* TOP10 (electrocompetentes) que mantuvimos en hielo por 2 min y luego las electroporamos con un pulso de 25  $\mu$ F, 400  $\Omega$ , 2.5 kV. Inoculamos la mezcla electroporada en un tubo con 1 ml de caldo LB y la incubamos con agitación a 37°C por 45 min; después centrifugamos a 12,000 $\times$ g e inoculamos la pastilla celular en un matraz con 200 ml de caldo LB que incubamos con agitación a 37°C toda la noche.

Del cultivo en matraz tomamos 30 ó 50  $\mu$ l que inoculamos en placas de agar LB-ampicilina (1 mg/ml) cada una de las cuales había sido  $\square$ ervido  $\square$  con 14  $\mu$ l de X-Gal al 10% y 20  $\mu$ l de isopropil- $\beta$ -tiogalactósido (IPTG, 20 mg/ml).

Después de incubar toda la noche a 37°C aparecieron colonias blancas (Lac-) o azules (Lac+).

### **Detección ultrarrápida de transformantes**

Realizamos la detección ultrarrápida del plásmido en seis cepas transformantes (cuatro Lac- y dos Lac+). La mezcla de lisis de cada muestra contenía 20 µl de amortiguador de carga 6× (glicerol 30%, xilencianol 0.02%, orange G 0.02%), 3 µl de SDS 1% y 10 µl de agua. Etiquetamos un tubo Eppendorf (1.5 ml) para cada muestra, con la punta de la pipeta tomamos la colonia transformante y la depositamos en el tubo Eppendorf etiquetado, la mezclamos con 33 µl de la solución de lisis, agitamos con el vórtex por 5 s, luego agregamos 33 µl de fenol-cloroformo (1:1), centrifugamos a 1500×g, y cargamos 10 µl de la fase acuosa en un gel de agarosa con bufer de sodio-ácido bórico (SB) al 1%. El bufer SB se compone por borato disodico decahidratado 5mM o hidroxico de sodio 10mM ajustado a pH: 8.5 con ácido bórico. Corrimos el gel por 1 h a 80 V y luego lo teñimos con bromuro de etidio (1 mg/ml) por 15 min. Adquirimos las imágenes digitales en el fotodocumentador ChemiDoc EQ (BioRad, Hercules, CA) y cuantificamos los pixeles con el programa Quantity One (BioRad, Hercules, CA).

### **Preparación de pEV201**

Una asada con una colonia de la clona SL201 Amp<sup>R</sup> Lac- fue inoculada en 50 ml de caldo LB-ampicilina e incubada toda la noche a 37°C. La preparación del DNA (“midiprep”) de pEV201 fue obtenida con el kit PureYield<sup>TM</sup>  erviño Midiprep System (Promega, Madison, WI).

Centrifugamos el cultivo a 10000×g por 10 min, descartamos el sobrenadante y drenamos el medio de cultivo invirtiendo el tubo sobre una toalla de papel. Mezclamos la pastilla con 3 ml de solución para resuspensión (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, 100 µg de Rnasa A, pH 7.5). Agregamos 3.0 ml de solución de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1%) y mezclamos el contenido del tubo suavemente por inversión 3 a 5 veces. Incubamos 3 min a temperatura ambiente y agregamos 50 ml de solución neutralizante (clorhidrato de guanidina 4.09 M, acetato de

potasio 759 mM, ácido acético glacial 2.12 M, pH 4.8), mezclamos el tubo suavemente 3 a 5 veces y lo dejamos reposar verticalmente hasta observar una precipitación blanquecina.

Para limpiar el lisado, colocamos una columna azul del kit PureYield™ en un tubo Falcon nuevo de 50 ml, añadimos el lisado al interior de la columna e incubamos 2 min para desprender el resto de las partículas celulares. Centrifugamos la columna azul a 1500×g por 5 min y colocamos la columna de unión de color blanco en un tubo Falcon nuevo de 50 ml. Añadimos el filtrado de la columna azul a la columna blanca y centrifugamos a 1500×g por 3 min. A la columna blanca agregamos 5 ml de la solución de lavado y removedora de endotoxinas (fórmula secreta del proveedor) y centrifugamos a 1500×g por 3 min; la columna fue entonces removida, el líquido fue descartado y luego se vuelve a insertar en el tubo. Añadimos 20 ml de la solución de lavado en la columna (etanol 60%, acetato de potasio 60 mM, EDTA 0.04mM, Tris-HCl 8.3 mM, pH 7.5) y centrifugamos a 1500×g por 5 min; la columna es entonces removida, el líquido fue descartado y luego se volvió a insertar en el tubo. Aplicamos una centrifugación adicional por 10 min para eliminar el resto de etanol y cubrimos la tapa con una toalla de papel para eliminar los restos de etanol de la columna.

Para eluir el DNA colocamos la columna blanca en un tubo Falcon nuevo de 50 ml, añadimos 600 µl de agua libre de nucleasas, centrifugamos a 1500×g por 5 min y transferimos el filtrado a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. El DNA de pEV201 fue cuantificado en el fluorómetro GENios (TECAN, San Jose, CA) acoplado a una computadora con el programa erviño 4, empleando el kit PicoGreen dsDNA Quantitation (Molecular Probes, Eugene, OR). En una microplaca FIA negra de 96 pozos (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania) fueron colocados 198 µl de la solución de ensayo (PicoGreen 1:400 en TE 1×) y 2 µl de DNA estándar o de cada muestra problema. El contenido de DNA de los problemas fue calculado por interpolación en la curva tipo derivada de pozos que contenían 5, 10, 25 ó 50 ng de DNA del fago λ.



### **Condiciones de amplificación de E2-1031 y E2-177**

En mezclas de PCR convencional directa ensayamos concentraciones variables de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs y oligonucleótidos y un gradiente de temperatura de annealing para determinar las condiciones para maximizar la amplificación de los productos E2-1031 y E2-177.

En el caso de E2-1031 probamos MgCl<sub>2</sub> 1 a 4 mM, dNTPs 20 a 80 μM, y oligonucleótidos 0.08 a 0.12 μM e incubamos las mezclas de PCR a temperaturas de annealing en el rango de 44 a 49°C. Para E2-177 probamos MgCl<sub>2</sub> 1 a 5 mM, dNTPs 0.02 a 0.012 mM, y oligonucleótidos 0.06 a 0.14 μM e incubamos las mezclas a temperaturas de annealing en el rango de 56 a 62°C. El programa del termociclador para ambos productos consistió en desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, annealing (45°C para E2-1031 y 59°C para E2-177) por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, seguida de extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos de PCR fueron visualizados □erviño□ la electroforesis de muestras de 10 μl en geles de SB-agarosa al 1.5% (Jonathan et al. 2004) seguida de tinción con bromuro de etidio por transiluminación con luz ultravioleta y registramos las imágenes digitales en un fotodocumentador ChemiDoc EQ (BioRad, Hercules, CA). Los pixeles de las bandas principales de cada experimento fueron cuantificados con el programa Quantity One (BioRad, Hercules, CA).

### **Caracterización de pEV201**

#### *Digestión con PstI*

En una mezcla de 500 μl que contenía 50 μl de amortiguador de digestión 10× (Tris-HCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0 a 25°C), 25 μl de una solución con PstI y 325 μl de agua, linearizamos 100 μl de DNA de pEV201 (95.92 ng/μl). Además, linearizamos 4 μl del vector pGEM con 1 μl de solución con PstI en una mezcla con 2 μl de amortiguador de digestión 10× y 13 μl de agua para obtener un volumen final de 20 μl. Preparamos un gel de SB-agarosa al 0.8% y lo

cargamos con muestras de 1 µl lineales e intactas; corrimos el gel a 100 V por 1 h y lo teñimos con bromuro de etidio (1mg/ml) por 15 min.

#### *Amplificación de E2-1031*

Usamos 1 µl de pEV201 (92.5 ng/µl) lineal o intacto como molde para la amplificación de E2-1031. La mezcla de PCR contenía MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTP 40 µM (c/u), oligonucleótidos E2-1F/1R 0.1 µM (c/u), amortiguador de PCR 1× y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). El programa del termociclador constó de desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, annealing a 45°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y extensión final a 72°C por 5 min.

#### *Amplificación de E2-177*

Diluimos 1:10 la mezcla con el producto E2-1031 y añadimos 1 µl como molde para la reacción anidada de E2-177. La mezcla contenía MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTP 0.06 mM (c/u), oligonucleótidos E2-2F/2R 0.12 µM (c/u), amortiguador de PCR 1× y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa. El programa del termociclador constó de desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, 25 ciclos con desnaturalización a 94°C por 1 min, annealing a 59°C por 1min, extensión a 72°C por 1 min y extensión final a 72°C por 5 min.

### **Calibración de la PCR-TR anidada**

#### *Preamplificación*

En la primera reacción (PCR1) usamos la pareja de oligonucleótidos E2-1F/1R con las condiciones establecidas por 15 ciclos con 0.096 ngde DNA de pEV201 (equivalentes a  $2.1 \times 10^7$  copias). El programa del termociclador consistió en desnaturalización inicial a 95°C por 3 min seguido por 15 ciclos con desnaturalización a 95°C por 15 s, annealing a 45°C por 30 s y extensión a 72°C por 1min.

#### *Calibración de la PCR-TR anidada*

Con las mezclas de la PCR1 preamplificadas preparamos diluciones logarítmicas seriadas de las cuales añadimos 1  $\mu$ l a las mezclas de PCR-TR anidada (PCR2) equivalentes a  $2.1 \times 10^4$ - $2.1 \times 10^7$  copias originales de pEV201 como molde para amplificar el producto E2-177. El programa del termociclador en tiempo real constó de desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 15 s, annealing a 59°C por 30 s y extensión a 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 5 min.

#### *Perfil de extinción de la fluorescencia*

Para obtenerlo, a partir de 60°C programamos en el iCycler iQ Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) el aumento de temperatura de 0.5°C cada 30 segundos por 72 veces hasta alcanzar 96°C.

#### *Cuantificación del número de copias del gen E2-VP16*

El número de copias fue calculado por interpolación del valor de Ct de las muestras problema con la ecuación de la recta resultante de la familia de curvas tipo.

#### *Incubación y fluorimetría*

Las incubaciones y la detección de las mezclas de PCR-TR tiempo real fueron realizadas en el iCycler iQ con ayuda del Optical System software versión 3.1 (Bio-Rad).

## RESULTADOS

### Clonación del producto E2-1031 de pVPH16 en pGEM

La construcción con el fragmento de 1031 pb del gen E2-VPH16 sirvió como control para la cuantificación del mismo gen por PCR-TR. Para obtener la construcción (pEV201) amplificamos por PCR convencional el segmento E2-1031 con la pareja de oligonucleótidos E2-1F/1R a partir del plásmido pHPV16, ligamos *in vitro* el producto de PCR E2-1031 a pGEM-T y transformamos células de *E. coli* TOP10 por electroporación con la mezcla de ligación (Fig. 2). Obtuvimos varias clonas transformantes mediante dos pases sucesivos de colonias aisladas en agar LB-Amp X-Gal e IPTG.

De las transformantes con fenotipo Lac<sup>-</sup> (colonias blancas, pGEM con inserto) o Lac<sup>+</sup> (colonias blancas, pGEM sin inserto) analizamos mediante detección ultrarrápida de transformantes cuatro clonas Lac<sup>-</sup> y dos Lac<sup>+</sup> y seleccionamos la clona Lac<sup>-</sup> SL201 que porta el plásmido denominado pEV201 con el inserto de tamaño esperado (Fig. 3).

Como esperábamos, con la pareja de oligonucleótidos E2-1F/1R obtuvimos un producto de PCR de alrededor de 1000 pb amplificado a partir de pHPV16. En cajas de agar LB-Amp X-Gal e IPTG inoculadas con 30 µl o 50 µl de suspensiones de *E. coli* TOP 10 ( $A_{600} = 0.6$ ) electroporadas con la mezcla de ligación obtuvimos respectivamente 141 y 278 colonias Lac<sup>+</sup> y 183 y 406 colonias Lac<sup>-</sup>.

En la detección ultrarrápida observamos que los plásmidos de las clonas Lac<sup>+</sup> (pGEM sin inserto) y Lac<sup>-</sup> (pGEM con el inserto E2-1031) tuvieron los tamaños esperados de 3000 y 4000 pb (Fig. 3) e inferimos que la cepa SL201 Lac<sup>-</sup> porta la construcción pEV201 (derivada de pGEM probablemente con el inserto E2-1031 esperado). A partir de este análisis elegimos las clonas SL201 Lac<sup>-</sup> (pEV201) y SL204 Lac<sup>+</sup> (pGEM vacío) para amplificar y purificar el DNA plasmídico (Tabla 2). De 50 ml de cultivo de la clona SL201 en caldo LB-Amp obtuvimos 92.9 µg de DNA pEV201 puro.

### **Caracterización de pEV201**

Para saber si pEV201 contiene el sitio único de corte esperado para *Pst*I, si su inserto es del tamaño esperado (1031 pb) y si es adecuado como molde para amplificar E2-1301 y E2-177, llevamos a cabo los experimentos correspondientes: 1) digestión de pEV201 y pGEM con *Pst*I y comparación del tamaño de la construcción con la forma intacta y lineal de pGEM (Fig. 2), 2) amplificación por PCR convencional directa de E2-1031 con la pareja E2-1F/1R a partir de pEV201 intacto y lineal (Fig. 5) y 3) amplificación del producto E2-177 por PCR anidada convencional con la pareja E2-2F/2R a partir de E2-1031 (Fig. 6).

Como esperábamos, en la electroforesis observamos que pEV201 y pGEM tratados con *Pst*I parecen contener 4000 pb y 3000 pb, respectivamente (Fig. 4). Por otra parte, a partir de pEV201 amplificamos el producto E2-1031 esperado por PCR convencional directa y a partir del producto E2-1031 amplificamos E2-177 por PCR anidada (Figs. 5 y 6). Así confirmamos que pEV201 tiene un sitio único de corte por *Pst*I fuera del inserto, contiene el inserto E2-1031 completo pues permite amplificar E2-1031 y E2-177 y puede usarse como control para cuantificar las copias de E2-VPH16 mediante PCR-TR anidada. Por otra parte, decidimos usar la preparación de pEV201 puro como molde para establecer condiciones óptimas de amplificación de E2-1031 y E2-177 por PCR convencional directa.

### **Secuencia nucleotídica del inserto E2-1031**

Para determinar si la secuencia del inserto de pEV201 corresponde al gen E2-VPH16 de referencia y ubicar la posición de los oligonucleótidos E2-1F/1R (que generarían el producto E2-1031 en la PCR directa) y de los oligonucleótidos E2-2F/2R (que generarían el producto E2-177 en la PCR anidada), analizamos la secuencia nucleotídica del inserto E2-1031 obtenida por secuenciación automática (forward y reverse) del inserto de pEV201 amplificado con los oligonucleótidos E2-1F/1R. Después alineamos la secuencia del inserto con la del gen E2-VPH16 de referencia (GenBank, No. De acceso AY686584) (Fig. 7).

La secuencia del inserto alineó casi perfectamente con el ORF E2-VPH16 (99% de identidad. El inserto presentó tres bases de diferencia en las posiciones: A447T,  $\Delta$ 864A G934A), las posiciones de las dos parejas de oligonucleótidos

fueron localizadas en los sitios previstos y fueron confirmados los tamaños esperados de los productos E2-1031 y E2-177 (Fig. 9). Como el inserto E2-1031 de pEV201 tiene el tamaño esperado, identidad del 99% con el ORF E2-VPH16 y contiene la secuencia del producto E2-177 esperado en la PCR anidada, decidimos usar rutinariamente pEV201 en adelante como control para la cuantificación del gen E2-VPH16 mediante PCR-TR.

#### **Condiciones para la amplificación de E2-1031pb**

Para maximizar la especificidad y eficiencia de la preamplificación del gen E2 mediante PCR-TR, en la cual debería ser generado el producto E2-1031 que luego usaríamos como molde en la segunda etapa (PCR anidada para generar E2-177), en mezclas de PCR convencional con pEV201 como molde y la pareja E2-1F/1R ensayamos concentraciones variables de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, oligonucleótidos y temperaturas de annealing de 44°C a 49°C. Las condiciones que maximizaron la amplificación de E2-1031 fueron: MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTPs 40 µM (c/u), oligonucleótidos E2-1F/1R 0.1 mM (c/u), annealing a 45°C; las cuales fueron seleccionadas para ser usadas rutinariamente en la etapa de preamplificación de la PCR-TR (Fig. 8).

#### **Condiciones para la amplificación de E2-177pb**

Para maximizar la especificidad y eficiencia en la etapa final de amplificación del gen E2 mediante PCR-TR en la cual debe ser generado el producto E2-177, en mezclas de PCR convencional con pEV201 como molde y la pareja E2-2F/2R probamos concentraciones variables de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs y oligonucleótidos y temperaturas de annealing de 56°C a 62°C. Las condiciones que maximizaron la amplificación de E2-177 fueron: MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTPs 0.06 mM (c/u), oligonucleótidos E2-2F/2R 0.12 µM (c/u), annealing a 59°C, las cuales fueron seleccionadas para ser usadas rutinariamente en la etapa final (anidada) de la PCR-TR (Fig. 9).

### **Amplificación de E2-177 por PCR-TR directa y anidada a partir de pEV201**

Para aumentar la sensibilidad y cuantificar de manera confiable el número de copias del gen E2-VP16 presentes en muestras con cargas virales muy bajas no detectables con PCR-TR directa, en la primera etapa preamplificamos E2-1031 por 15 ciclos de PCR directa convencional en una mezcla con  $2.1 \times 10^7$  copias iniciales de pEV201 (Fig. 10). En la etapa final de la PCR-TR amplificamos E2-177 primero de manera directa en mezclas equivalentes a diluciones logarítmicas seriadas con  $2.1 \times 10^4$ - $2.1 \times 10^7$  copias iniciales de pEV201 (Fig. 11<sup>a</sup>) y luego de manera anidada con 1  $\mu$ l de la mezcla preamplificada sin diluir o diluida seriadamente 10, 100 y 1000 veces que añadimos como molde a mezclas de PCR-TR simulando diluciones logarítmicas seriadas con  $2.1 \times 10^4$ - $2.1 \times 10^7$  copias iniciales de pEV201 (Fig. 11B).

Al amplificar E2-177 con PCR-TR a partir de diluciones 1/50 de mezclas en las que E2-1031 había sido preamplificado 15 ciclos mediante PCR convencional el valor de Ct disminuyó en 4.4, lo cual equivale a un factor de 20 veces en el aumento de sensibilidad (Fig. 11), que al ser multiplicado por el factor de dilución de 50 veces da un aumento total de sensibilidad equivalente a 1000 veces (Anexo No. 1). Además encontramos que los productos principales de las mezclas de PCR-TR para la amplificación de E2-177 tuvieron idénticos patrones de extinción térmica de la fluorescencia, con un valor máximo a 91°C (Fig. 12).

Concluimos que las familias de curvas tipo para la amplificación de E2-177 mediante PCR-TR directa y anidada fueron consistentes con el número inicial de copias de pEV201, que la preamplificación de E2-1031 por 15 ciclos mediante PCR convencional aumenta 1000 veces el rendimiento de E2-177 en la PCR-TR anidada y que la amplificación de E2-177 por PCR-TR directa y anidada es específica porque genera el mismo producto principal con un pico único de extinción térmica de la fluorescencia a 91°C. Por lo anterior decidimos usar la PCR-TR anidada en estas condiciones para cuantificar las copias del gen E2 presentes en las muestras de lesiones displásicas del cérvix causadas por VP16 incluidas en este estudio.

### **Cuantificación del gen E2 en muestras cervicales con displasias**

Para determinar la carga viral con el gen E2 (y en el futuro poder determinar la integración del genoma viral por comparación con el número de copias del gen E6) en displasias del cérvix causadas por VPH16, primero hicimos la preamplificación directa de E2-1031 con 15 ciclos de PCR convencional en mezclas con  $2.1 \times 10^7$  copias de pEV201 (Fig. 10) y mezclas con 50 ng de DNA aislado de las siete muestras de displasias del cérvix con infección única por VPH16. Después amplificamos con 35 ciclos de PCR-TR anidada el producto E2-177 en mezclas que contenían 1/50 de volumen de mezclas preamplificadas tanto de las muestras problema como de las diluciones logarítmicas seriadas para obtener la familia de curvas tipo equivalentes a  $2.1 \times 10^3$ - $2.1 \times 10^7$  copias iniciales de pEV201.

Las curvas tipo para la amplificación de E2-177 mediante PCR-TR anidada con  $2.1 \times 10^3$ - $2.1 \times 10^7$  copias de pEV201 fueron consistentes ( $\Delta C_{t_{avg}} = 3.68$ ) (Fig. 13). Con este método de PCR-TR anidada pudimos cuantificar las copias de E2-VPH16 presentes en las siete muestras de displasias del cérvix (Fig. 14B). Los productos principales de las mezclas de PCR-TR anidada generados a partir de pEV201 y de las lesiones neoplásicas tuvieron idénticos perfiles de extinción térmica de la fluorescencia, con un valor máximo a  $91^\circ\text{C}$  (Fig. 15). El número de copias de E2 tendió a aumentar con el grado de las lesiones neoplásicas del cérvix (rango: mínimo,  $14 \times 10^3$ - $24 \times 10^6$  copias; mínimo en una muestra de NIC1; máximo en la muestra de CaCu invasor) (Fig. 14<sup>a</sup>).

Por los resultados anteriores podemos afirmar que los productos E2-177 de pEV201 y de las lesiones neoplásicas son específicos/idénticos y que el número de copias de E2-VPH16 correlaciona con el grado de displasia y podrá ser comparado con el número de copias de E6 para determinar la integración del genoma viral.



## DISCUSIÓN

Mediante la detección ultrarrápida de clonas transformantes pudimos determinar las diferencias de tamaño de los plásmidos en las clonas de *E. coli* TOP10 Lac<sup>-</sup> (~4000 pb, pGEM con inserto y Lac<sup>+</sup> (~3000 pb, pGEM vacío) (Tabla. 4). Con estos resultados presumimos que las clonas Lac<sup>-</sup> portan plásmidos con el inserto E2-1031 y seleccionamos a cepa SL201 Lac<sup>-</sup> con la construcción pEV201 (derivada de pGEM con el inserto deseado: E2 VPH16-1031 pb) (Fig. 3). La detección ultrarrápida es un método de escrutinio menos laborioso, más rápido y barato que el uso de minipreps para la identificación de transformantes. La preparación de pEV201 a partir de 50 ml de cultivo de la cepa SL201 dio un rendimiento de DNA (92.9 µg) puro comparable (101.4 ng) de pHV101 (con el inserto E6-650) hecha recientemente en nuestro laboratorio (Hernández-Arteaga et al. 2006).

El vector pGEM, especial para clonar productos de PCR, permite obtener las construcciones deseadas rápidamente, puede ser linearizado por corte en los sitios de restricción conocidos para determinar los tamaños de las secuencias del vector y el inserto mediante electroforesis en geles de agarosa. pEV201 contiene el inserto E2-1031 completo pues permitió amplificar E2-1031 y E2-177 (Figs. 7 y 8) y optimizar la amplificación de ambos productos (Figs. 8 y 9). Por otra parte, el tratamiento con *Pst*I mostró que pEV201 tiene un sitio único de corte fuera del inserto confirmado por la amplificación de E2-1031 con la pareja E2-1F/1R (Fig. 7). La secuencia del inserto E2-1031 de pEV201 correspondió a la del gen E2-VPH16 del GenBank. Todo lo anterior indicó que pEV201 podría usarse como control para cuantificar las copias de E2-VPH16 mediante PCR-TR en las muestras problema.

Contar con una construcción con el inserto de interés resultó útil para usarlo como molde en la PCR-TR anidada y como control riguroso para cuantificar el gen E2-VPH16 en muestras con displasias, así como para optimizar las condiciones de amplificación de los productos E2-1031 y E2-177 (Figs. 8 y 9).

Usar un plásmido solamente con la secuencia del gen de interés es más limpio en los ensayos de PCR ya que evita hibridaciones inespecíficas de los oligonucleótidos en otros sitios del genoma viral y previene la generación de productos indeseados, aunque Nagao et al. (2002) usaron plásmidos con el genoma completo de VPH16 como referencia para la cuantificación de E2-VPH16.

Maximizamos la eficiencia de amplificación de E2-1031 mediante el ensayo de concentraciones variables de  $MgCl_2$ , dNTPs y oligonucleótidos así como de temperaturas de annealing en las mezclas de PCR. Las condiciones finales elegidas que maximizan la amplificación de E2-1031:  $MgCl_2$  1 mM, dNTPs 40  $\mu M$  (c/u), oligonucleótidos E2-1F/1R 0.1 mM (c/u), annealing a 45°C, fueron usadas rutinariamente en la etapa de preamplificación de la PCR-TR (Fig. 8).

Después de probar gradientes de concentración para  $MgCl_2$ , dNTPs y oligonucleótidos y un gradiente de temperatura de annealing elegimos las siguientes condiciones para maximizar la amplificación de E2-177 pb:  $MgCl_2$  1 mM, dNTPs 0.06 mM (c/u), oligonucleótidos E2-2F/2R 0.12  $\mu M$  (c/u), annealing a 59°C, que usamos en la etapa final (anidada) de la PCR-TR (Fig. 9).

Con las condiciones de amplificación optimizadas obtuvimos familias de curvas tipo de la PCR-TR consistentes con el número de copias de pEV201, las cuales sirvieron para cuantificar las copias del gen E2-VPH16 presente en las muestras con displasias incluidas en este estudio (Fig. 13).

A partir de una mezcla para preamplificar E2-1031 por 15 ciclos mediante PCR convencional que contenía  $2.1 \times 10^7$  copias (4.65 ng) iniciales de pEV201 hicimos diluciones logarítmicas seriadas en las cuales añadimos 1  $\mu l$  a mezclas de PCR-TR de 50  $\mu l$  para amplificar E2-177 equivalentes a  $2.1 \times 10^3$ -  $2.1 \times 10^7$  copias de pEV201 (Fig. 10), con las cuales obtuvimos una familia de curvas tipo ( $\Delta Ct_{avg} = 3.68$ ,  $r = 0.999$ , eficiencia de la PCR = 87%). Por estos resultados inferimos que las familias de curvas tipo para la amplificación de E2-177 mediante PCR-TR directa y anidada son reproducibles y consistentes con el número inicial de copias de pEV201 (Fig. 13).

Para obtener familia de curvas consistentes es esencial minimizar el error experimental que afecta la cuantificación de las copias presentes en las muestras

problema asurando la precisión al hacer las diluciones del plásmido control y agregar el número exacto de copias tanto en las mezclas de preamplificación de E2-1031 como al hacer las diluciones y añadir los volúmenes apropiados a las mezclas de PCR-TR anidada. Con nuestro método de PCR-TR anidada generamos familias de curvas tipo consistentes y reproducibles con  $2.1 \times 10^2$ - $2.1 \times 10^7$  copias de pEV201 (Fig. 13), en contraste con el trabajo de Nagao et al. (2002), en el cual emplearon hasta  $10^4$  copias como mínimo, lo cual sugiere que nuestro método es más sensible.

La preamplificación de E2-1031 por 15 ciclos de PCR convencional provocó un desplazamiento de 4.4 en el valor promedio de Ct ( $\Delta Ct_{avg} = 4.4$ ) respecto del experimento de PCR-TR directa (Fig. 11), el cual corresponde a un aumento de sensibilidad por un factor de 20 (según la regresión logarítmica lineal de los valores teóricos de  $\Delta Ct$ ). Al multiplicar este factor por el factor de 50 de la dilución de DNA en la mezcla calculamos que nuestro método con Eva Green aumenta al menos 1000 veces el rendimiento de E2-177 en la PCR-TR anidada (Anexo No. 2).

Las familias de curvas tipo generadas en mezclas por duplicado con diluciones logarítmicas seriadas con  $2.1 \times 10^4$ - $2.1 \times 10^7$  copias de pEV201 para la PCR-TR anidada de E2-177 en dos experimentos dieron valores adecuados de  $\Delta Ct$  (3.1 y 3.5 respectivamente) con un coeficiente de correlación lineal de 0.999 en ambos experimentos. Empleando pEV201 como molde en la PCR-TR directa para E2-1031 pudimos detectar desde  $2.1 \times 10^5$  copias y en la PCR-TR anidada para E2-177 desde  $2.1 \times 10^4$  copias de E2-VPH16 (Fig. 11).

El fluorocromo EvaGreen es 10 veces más eficiente que SYBRGreen según el fabricante; Hernández-Arteaga (2006) confirmó esta afirmación. Por lo tanto, nuestra PCR-TR anidada con EvaGreen aumenta unas 10000 veces la sensibilidad y permite cuantificar un número menor de las copias del gen E2-VPH16 que puedan estar inicialmente presentes en las muestras problema. Hemos confirmado que la PCR-TR anidada es más eficiente con EvaGreen pues nos permitió detectar desde  $10^3$  copias en lugar de las  $10^4$  copias detectables con SYBRGreen (Fig. 13).

Las mezclas de PCR-TR con agentes intercalantes como SYBRGreen y EvaGreen permiten además analizar la extinción térmica de la fluorescencia ( $dFU$  vs  $dT$ ) de los productos amplificados. La primera derivada de la pérdida de fluorescencia en función de la temperatura genera perfiles con picos ( $-dFU/dT$  máxima) a ciertas temperaturas que dependen del contenido de GC de cada producto amplificado. La demostración de la especificidad de la amplificación y la identidad de los productos deriva de que los perfiles de las curvas de  $-dFU/dT$  de los principales productos de las mezclas para amplificar E2-177 (GC = 57%) con copias pEV201 y las muestras problema resultaron idénticos, con un máximo a  $91^{\circ}C$  (Fig. 12). Sin embargo se puede presentar un desplazamiento mínimo de los picos  $\pm 0.5^{\circ}C$  por variación del %GC en el producto amplificado.

Hemos desarrollado un método ultrasensible de PCR-TR anidada con EvaGreen como fluorocromo para cuantificar el gen E2-VPH16 en muestras de pacientes con displasia cervical. Con este método encontramos que el número de copias de E2-VPH16 de las muestras NIC 2 a CaCu, correlaciona con el grado de displasia y podrá ser comparado en el futuro con el número de copias de E6 para determinar la integración del genoma viral (ver Hernández et al. 2006). Basamos la cuantificación del número de copias de E2-VPH16 por PCR-TR anidada presentes en las muestras de mujeres con displasias en las familias de curvas tipo para E2-177 ya descritas (Fig. 14). Sin embargo, para determinar con mayor seguridad la correlación entre la carga viral (i.e., número de copias de genes virales) con el grado de displasia habría que analizar al menos 20 muestras de mujeres con displasias para que el análisis tenga validez estadística.

La determinación del estado físico del genoma viral por PCR-TR puede hacerse por el cociente de las copias E2/E6, tomando en cuenta que el gen E2 es usualmente interrumpido durante la integración. Sin embargo, la integración puede ocurrir en otros genes como E1 y en esos casos este método no serviría.

Nuestro método de PCR-TR anidada usa EvaGreen, un fluorocromo más sensible y barato que SYBRGreen que además aumenta adicionalmente la sensibilidad, por lo anterior nuestro método es más sensible que cualquier método de PCR-TR directa con SYBRGreen. Por otra parte, la PCR-TR anidada, para la

detección del gen E2-VPH16 es 100 veces más sensible que la PCR convencional y mucho más que el Southern blot.

En las mezclas de PCR directa (PCR1) con un número conocido de copias iniciales de pEV201 y la pareja de oligonucleótidos E2-1F/1R amplificamos el producto E2-1031 que luego diluimos y usamos como molde en las mezclas de PCR-TR anidada para amplificar el producto E2-177 con los oligonucleótidos E2-2F/2R (Fig. 10), por lo tanto, el producto E2-1031 puede usarse de manera confiable como molde para E2-177.

Park et al. (1997) usaron la pareja E2-1F/1R para determinar la presencia/ausencia del gen E2-VPH16. Nagao et al. (2002) usaron la pareja E2-2F/2R para cuantificar E2-VPH16 por PCR-TR directa. En este trabajo usamos ambas parejas de oligonucleótidos para montar la PCR-TR anidada, que potencia la sensibilidad para detectar y cuantificar el gen E2-VPH16, utilizando el producto de la primer pareja para detectar el gen E2-VPH16 y además lo usamos como molde para la segunda reacción de PCR-TR anidada.

## REFERENCIAS

- Dyson N, Howley PM, Munger K, and Harlow E.** The human papilloma virus: 16 E7 oncoprotein is able to the retinoblastoma gene product. *Science*. 243:934–937, 1989.
- Hernández-Arteaga S, Sánchez-Garza M, López-Revilla R.** Nuevo método de PCR anidada en tiempo real con EvaGreen para determinar la carga de papilomavirus. (Aceptado en el II congreso de Química Médica. Queretaro 2006.) Artículo en proceso.
- Jonathan R, Brody JR, Kern SE.** Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques*. 36:214–216, 2004.
- Kozuka T, Aoki Y, Nakagawa K, Ohtomo K, Yoshikawa H, Matsumoto K, Yoshiike K, and Kanda T.** Enhancer-promoter activity of human papillomavirus type 16 long control regions isolated from cell lines SiHa and CaSki and cervical cancer biopsies. *Jpn. J. Cancer Res*. 91:271–279, 2000.
- Lewis MJ,** “Análisis de la situación del cáncer □erviño uterino en América latina y el caribe”, Organización Panamericana de la Salud. pp 1-40, 2004.
- Muñoz N, Bosch X, De Sanjosé S, Vergara A, del Moral A, Munoz MT, Tafur L, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P.** Risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade III/ carcinoma *in situ* in Spain and Colombia. *Epidemiol Biomarkers Prev*. 2:423-431, 1993.
- Muñoz N, Bosch X, De San José S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ;** International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J*. 348:518-527, 2003.
- Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, Hongo A, Kodama J, Iton S, Kudo** Rapid and sensitive detection for physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 40:863-867, 2002.
- Park JS, Hwang ES, Park SN, Ahn HK, Um SJ, Kim CJ, Kim SJ.** Physical status and expression of VPH genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol*. 65:121–129, 1997.
- Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, and Icenogle JP.** Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J. Clin. Microbiol*. 37:1030–1034, 1999.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, and Munoz N.** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol*. 189:12–19, 1999.
- Zur Hausen H.** Papillomaviruses and cancer: from Basic studies to clinical application. *Nature Rev Cancer*. 2: 342–350, 2002.

## TABLAS

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados**

Pareja	Oligonucleótidos			Tamaño del amplicón	Tm
	Nombre	Secuencia (5'→3')	Posición <sup>a</sup>		
1	E2-1F	ATGAAAATGATAGTACAGAC	2808	1031 pb	44°C
	E2-1R	CCAGTAGACACTGTAAATAG	3839		42°C
2	E2-2F	TTATTAGGCAGCACTTGGCC	3383	177 pb	63°C
	E2-2R	GTGAGGATTGGAGCACTGTCC	3560		62°C

<sup>a</sup> En el genoma del VPH16 prototípico (No. Acceso en GenBank: AY686584).

**Tabla 2. Mezclas de PCR para amplificar E2-1031**

<b>Componente</b>	<b>µl</b>	<b>Concentración</b>
Agua	41.8	---
Amortiguador de PCR 10×	5	1× <sup>a</sup>
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1	1 mM
Mezcla de dNTPs (10 mM c/u)	0.2	40 µM (c/u)
Mezcla de oligonucleótidos E2-1F/1R (10 µM c/u)	0.5	0.1 µM (c/u)
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5 U µl)	0.5	2.5 U
DNA problema	1	50 ng

<sup>a</sup> Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH 8.4 a 25°C.



**Tabla 3. Mezclas de PCR para amplificar E2-177**

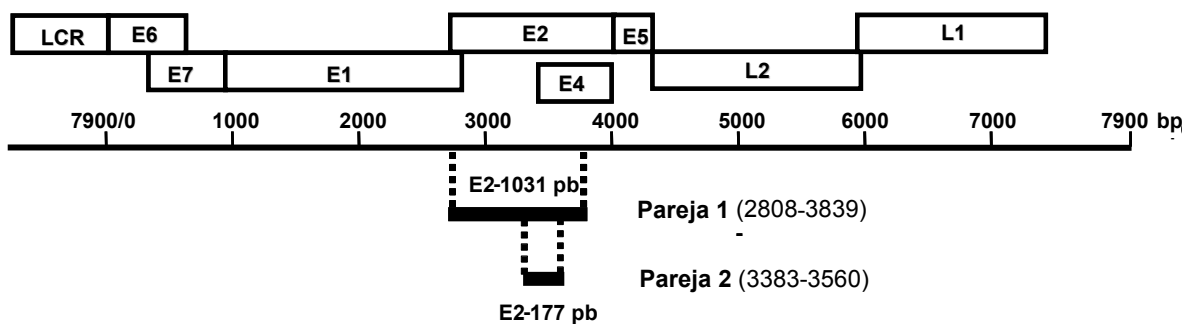
<b>Componente</b>	<b>µl</b>	<b>Concentración</b>
Agua	39.4	---
Amortiguador de PCR 10×	5	1× <sup>a</sup>
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1	1 mM
Mezcla de dNTPs (10 mM c/u)	0.3	0.06 mM (c/u)
Mezcla de oligonucleótidos E2-2F/2R (10 µM c/u)	0.6	0.12 µM (c/u)
<i>Taq</i> DNA pol (5 U µl)	0.5	2.5 U
EvaGreen (20×)	2.5	1×
DNA problema	1	50 ng

<sup>a</sup>Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH 8.4 a 25°C.

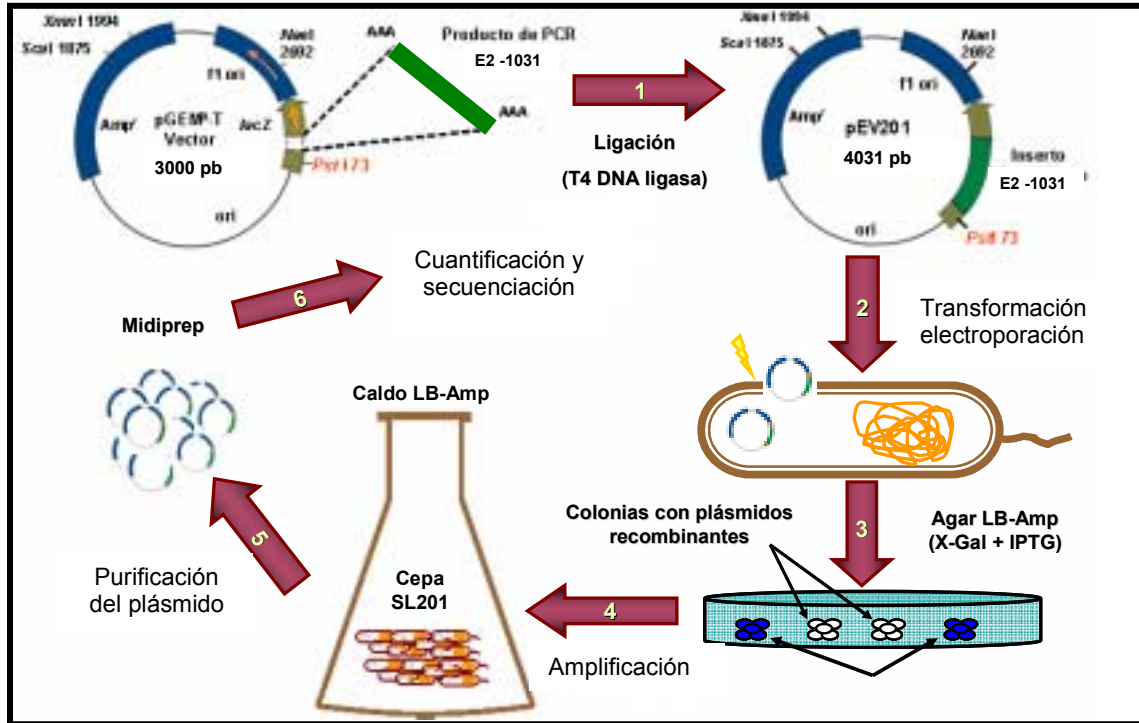
**Tabla 4. Detección ultrarrápida de transformantes**

<b>Carril</b>	<b>Clona</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Bandas de DNA</b>	
			<b>Cromosoma</b>	<b>Plásmido</b>
1	SL200	Lac-	Sí	Con inserto
2	SL201	Lac-	Sí	Con inserto
3	SL202	Lac-	Sí	Con inserto
4	SL203	Lac-	Sí	Con inserto
5	SL204	Lac+	Sí	Vacío
6	SL205	Lac+	Sí	Vacío

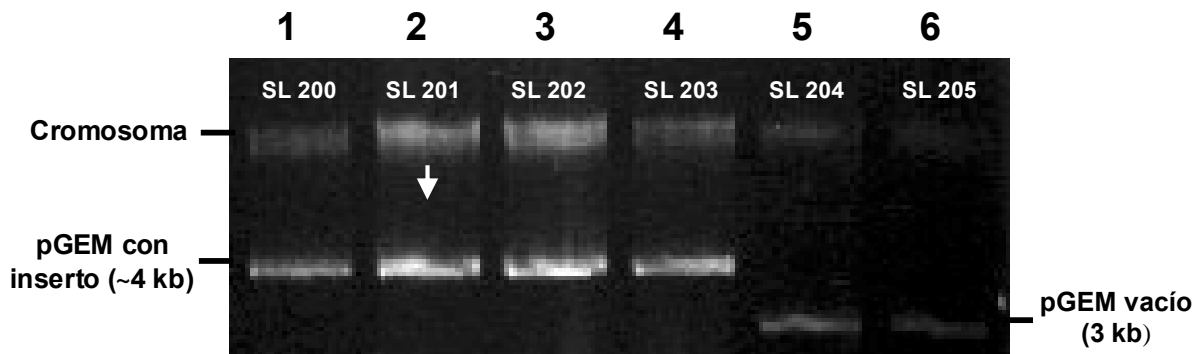
## FIGURAS



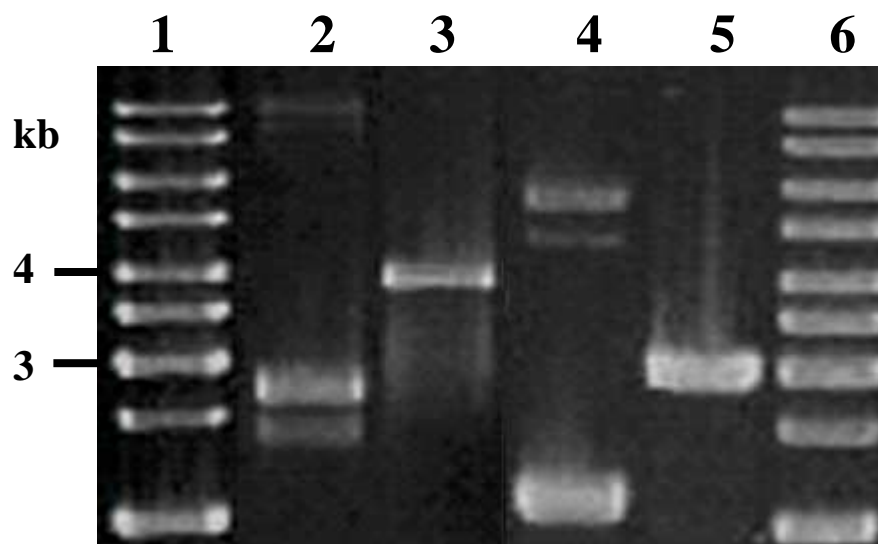
**Fig. 1. Localización y productos de PCR de los oligonucleótidos E2-1F/1R y E2-2F/2R en el genoma de VPH16.** Las parejas de oligonucleótidos E2-1F/1R y E2-2F/2R amplifican dos fragmentos del gen E2: el mayor de 1031 pb y el menor de 177 pb cuya secuencia está incluida en el primero. El amplicón generado por los oligonucleótidos E2-1F/1R abarca los nucleótidos 2808-3839 (1031 pb) y el generado por los oligonucleótidos E2-2F/2R los nucleótidos 3383-3560 (177 pb).



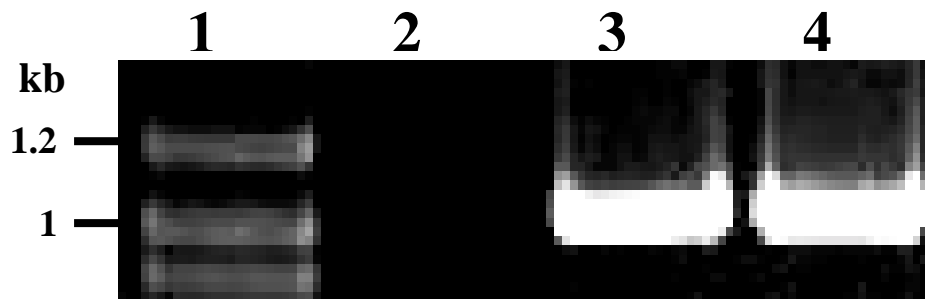
**Fig. 2 Clonación del producto E2-1031 amplificado a partir de pHPV16 en pGEM.** (Paso 1) El segmento E2-VPH16-1031 (nt 2810-3836) fue amplificado con la pareja de oligonucleótidos E2-1F/1R a partir de pHPV16 que contiene el genoma completo de VPH16, insertado en pGEM-T y sellado con DNA ligasa de T4. (Paso 2) Transformación por electroporación de células de *E.coli* TOP10 con el producto de ligación con un pulso de 25  $\mu$  F, 400 $\Omega$ , 2.5 kV. (Paso 3) Obtención de clonas transformantes mediante dos pases sucesivos de colonias aisladas en placas de agar LB-ampicilina (1 mg/ml) suplementadas con X-Gal (10%) e IPTG (20 mg/ml). Las clonas transformantes Amp<sup>R</sup> tenían el fenotipo Lac<sup>-</sup> (colonias blancas, probables portadoras del vector pGEM con el inserto esperado) o Lac<sup>+</sup> (colonias azules, probables portadoras del vector pGEM vacío). (Paso 4) Propagación de la clona SL201 seleccionada (Amp<sup>R</sup> Lac<sup>-</sup>, portadora de pEV201 derivado de pGEM con el inserto E2-1031). (Paso 5) Purificación (“midiprep”) de pEV201. (Paso 6) Cuantificación de pEV201 y secuenciación automática del inserto de pEV201 amplificado con la pareja E2-1F/1R.



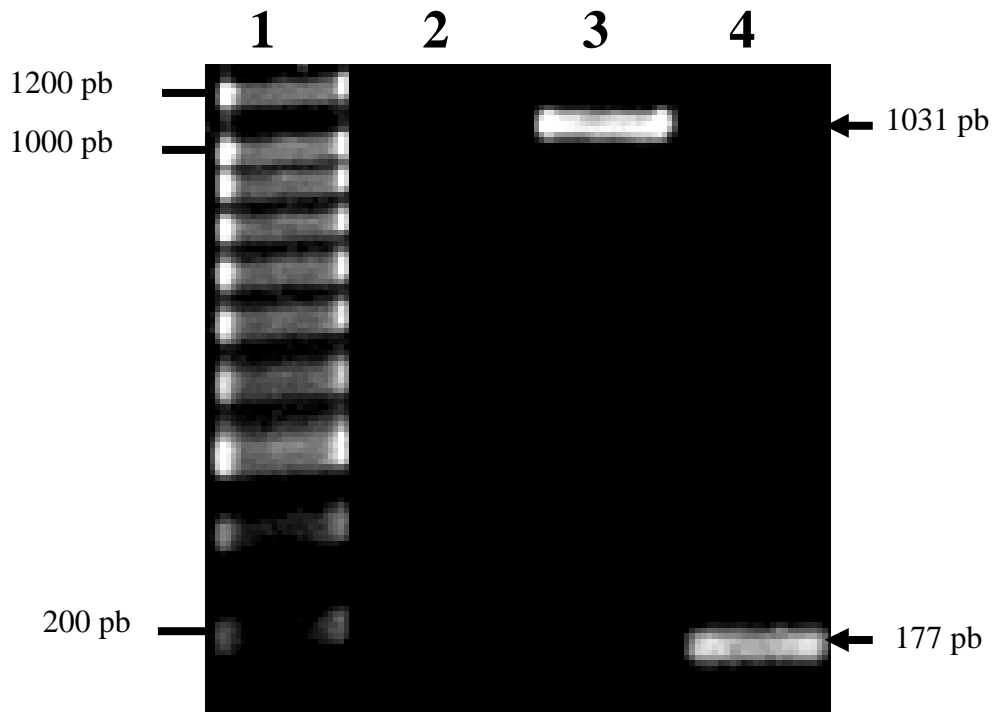
**Fig. 3. Detección ultrarrápida de clonas transformantes.** Gel de SB-agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1-4, transformantes *E.coli* TOP10 Lac- (pGEM con inserto). Carriles 5-6, Lac+ (pGEM vacío). Los nombres de las clonas están indicados en cada carril. Todas las muestras tienen una banda de DNA superior correspondiente al cromosoma bacteriano y una banda inferior correspondiente al plásmido derivado de pGEM. Los plásmidos de las clonas Lac- (SL200-SL203) migran una distancia similar entre ellas pero menor a las de las clonas Lac+ (SL204 y SL205). Parece evidente la presencia del inserto E2-1031 en las clonas Lac-. SL201 fue la clona elegida para propagar y purificar el plásmido con el inserto E2-1031 (pEV201, indicado por la flecha en el carril 2) que fue empleado en los experimentos subsecuentes.



**Fig. 4. Digestión de pEV201 y pGEM con *Pst*I.** Gel de SB-agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, escalera 1 kb. Carril 2, pEV201 intacto. Carril 3, pEV201 incubado con *Pst*I. Carril 4, pGEM intacto. Carril 5, pGEM incubado con *Pst*I. Carril 6, escalera 1 kb. La diferencia de tamaños en las mezclas de los carriles 3 (pEV201 ~ 4000 pb) y 5 (pGEM 3000 pb) indica que el inserto de pEV201 es de ~1000 pb, como se esperaba.



**Fig. 5. Amplificación de E2-1031 a partir de pEV201 intacto y lineal.** Gel de SB-agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, escalera 100 pb. Carril 2, control negativo (agua). Carril 3, pEV201 intacto. Carril 4, pEV201 linearizado por restricción con *Pst*I. La amplificación indica que el inserto de pEV201 es completo (1031 pb) y amplificable por PCR.



**Fig. 6. Amplificación anidada de E2-177 pb con la pareja de oligonucleótidos E2-2F/2R.** Gel de SB-agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, escalera 100 pb. Carril 2, control negativo (agua). Carril 3, mezcla PCR1 (directa, con pEV201 como molde inicial). Carril 4, mezcla PCR2 (anidada, con una 1/50 vol de mezcla PCR1 como molde).

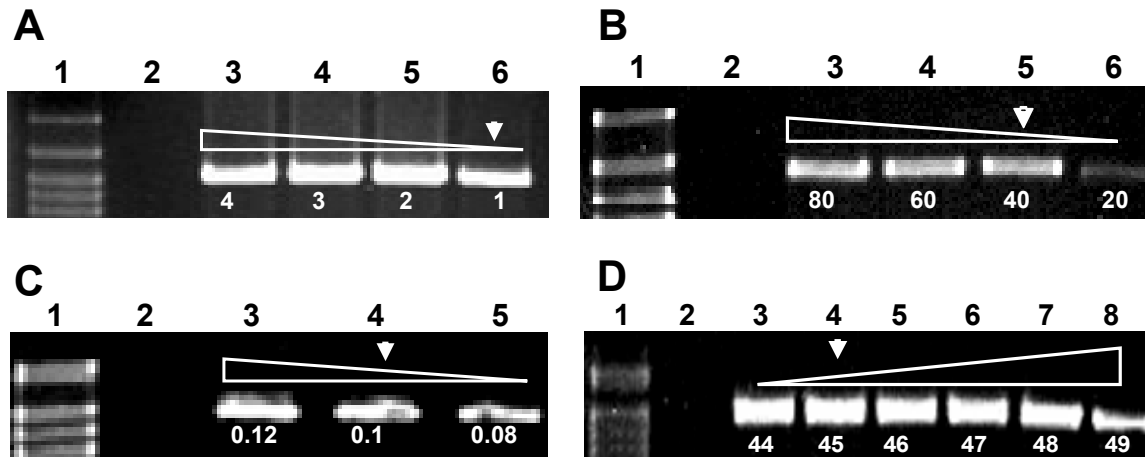


```

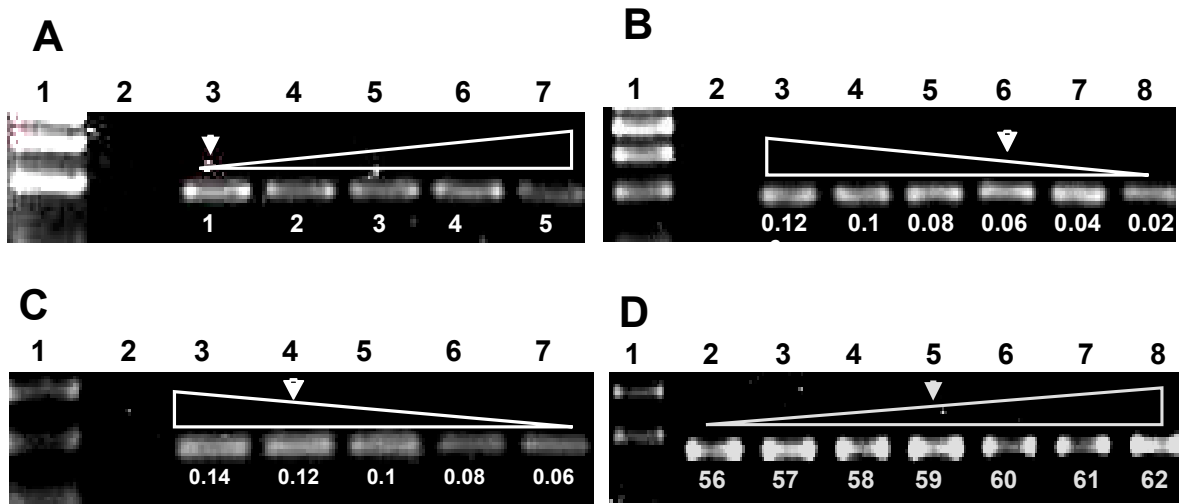
2756 atgga
2761 gactctttgc caacgtttaa atgtgtgtca ggacaaaata ctaacacATT ATGAAAATGA
2821 TAGTACAGAC CTACGTGACC ATATAGACTA TTGGAAACAC ATGCGCCTAG AATGTGCTAT
2881 TTATTACAAG GCCAGAGAAA TGGGATTTAA ACATATTAAC CACCAGGTGG TGCCAACACT
2941 GGCTGTATCA AAGAATAAAG CATTACAAGC AATTGAACTG CAACTAACGT TAGAAACAAT
3001 ATATAACTCA CAATATAGTA ATGAAAAGTG GACATTACAA GACGTTAGCC TTGAAGTGTA
3061 TTTAACTGCA CCAACAGGAT GTATAAAAAA ACATGGATAT ACAGTGGAAAG TGCAGTTTGA
3121 TGGAGACATA TGCAATACAA TGCATTATAC AAACCTGGACA CATATATATA TTTGTGAAGA
3181 AGCATCAGTA ACTGTGGTAG AGGGTCAAGT TGACTATTAT GGTTTATATT ATGTTTCATGA
3241 AGGAATACGA ACATATTTTG TGCAGTTTAA AGATGATGCA GAAAAATATA GTAAAAATAA
3301 AGTATGGGAA GTTCATGCGG GTGGTCAGGT AATATTATGT CCTACATCTG TGTTTAGCAG
3361 CAACGAAGTA TCCTCTCCTG AAATTATTAG GCAGCACTTG GCCAACACC CCGCCGCGAC
3421 CCATACCAA GCCGTCGCCT TGGGCACCGA AGAAACACAG ACGACTATCC AGCGACCAAG
3481 ATCAGAGCCA GACACCGGAA ACCCCTGCCA CACCACTAAG TTGTTGCACA GAGACTCAGT
3541 GGACAGTGCT CCAATCCTCA CTGCATTTAA CAGCTCACAC AAAGGACGGA TTAAGTGTAA
3601 TAGTAACACT ACACCCATAG TACATTTAAA AGGTGATGCT AATACTTTAA AATGTTTAAG
3661 ATATAGATTT AAAAAGCATT GTACATTGTA TACTGCAGTG TCGTCTACAT GGCATTGGAC
3721 AGGACATAAT GTAAAACATA AAAGTGCAAT TGTTACACTT ACATATGATA GTGAATGGCA
3781 ACGTGACCAA TTTTTGTCTC AAGTTAAAT ACCAAAACT ATTACAGTGT CTACTGGatt
3841 tatgtctata tga 3853

```

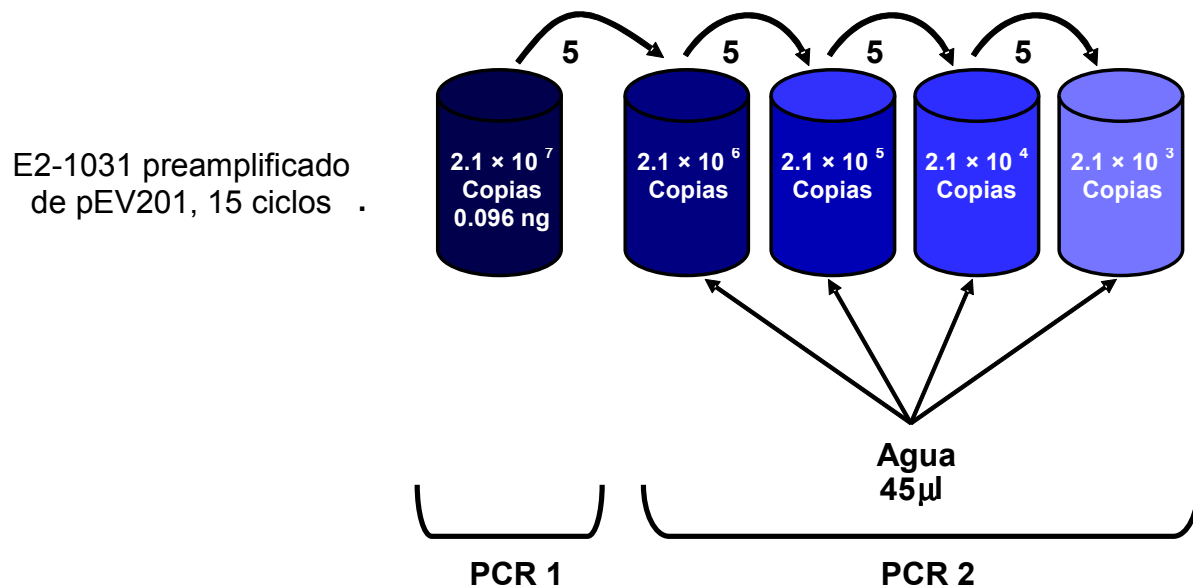
**Fig. 7. Secuencia del inserto E2-1031 presente en pEV201.** La secuencia del ORF completo del gen E2 tiene 1097 pb y abarca los nucleótido 2756-3853 del genoma de VPH16 en tanto que la secuencia de E2-1031 tiene 66 pb de bases menos. La secuencia obtenida por análisis de E2-1031 (producto de amplificación directa obtenido por nosotros en la mezcla PCR1) abarca los nucleótidos 2808-3737 y está resaltada en color azul; las secuencias de los extremos, correspondientes a los oligonucleótidos E2-1F/1R, están resaltadas en un color azul más intenso. La secuencia de E2-177 pb (producto de amplificación directa obtenido por nosotros en la mezcla PCR1) abarca los nucleótidos 3382-3560 y está resaltada en color naranja; las secuencias de sus extremos, correspondientes a los oligonucleótidos E2-2F/2R están resaltados en un color naranja más intenso. Las letras mayúsculas representan las secuencias amplificables de los productos E2-1031 y 177 en el contexto del gen E2-VPH16 de referencia, las letras minúsculas de los extremos resaltados en amarillo representan el resto del gen E2.



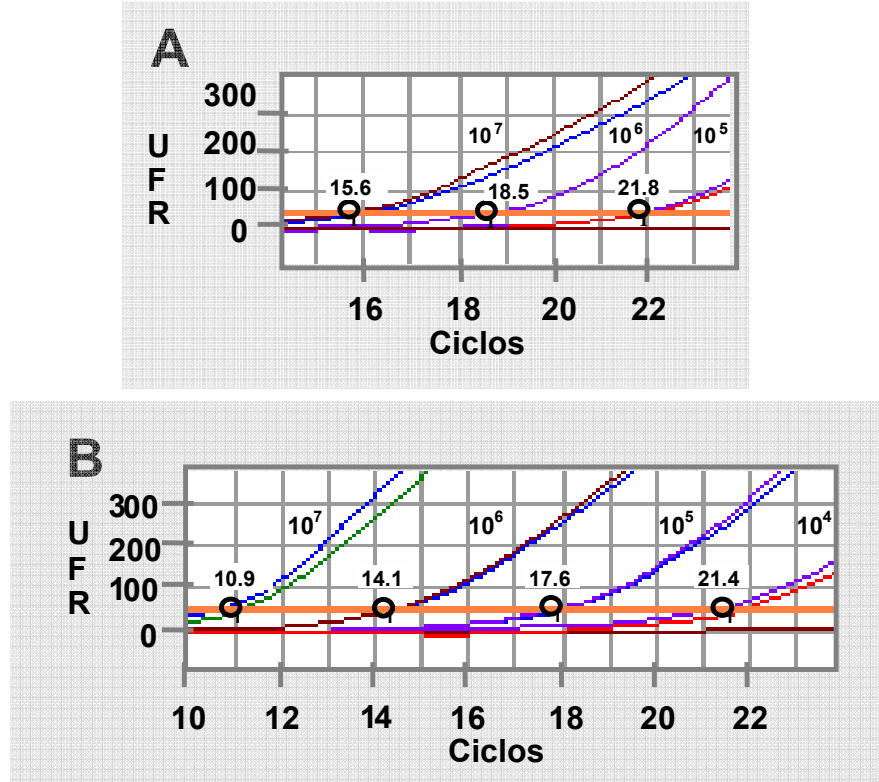
**Fig. 8. Condiciones de amplificación de E2-1031.** (A) Electroforesis en SB-agarosa 1% de muestras de las mezclas de PCR con concentraciones variables de (A) MgCl<sub>2</sub> (1-4 mM), (B) dNTPs (20-80 μM), (C) oligonucleótidos (0.08-0.12 μM) e incubadas (D) a diferentes temperaturas de annealing (44-49°C). Las condiciones elegidas (MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTP 40 μM (c/u), oligonucleótidos 0.1 μM (c/u), temperatura de annealing 45°C) están indicadas con una flecha en cada panel. Carril 2 de cada panel: CtlNeg (agua). En carril 1 de cada electroforesis se usaron los marcadores de una escalera de 100 pb.



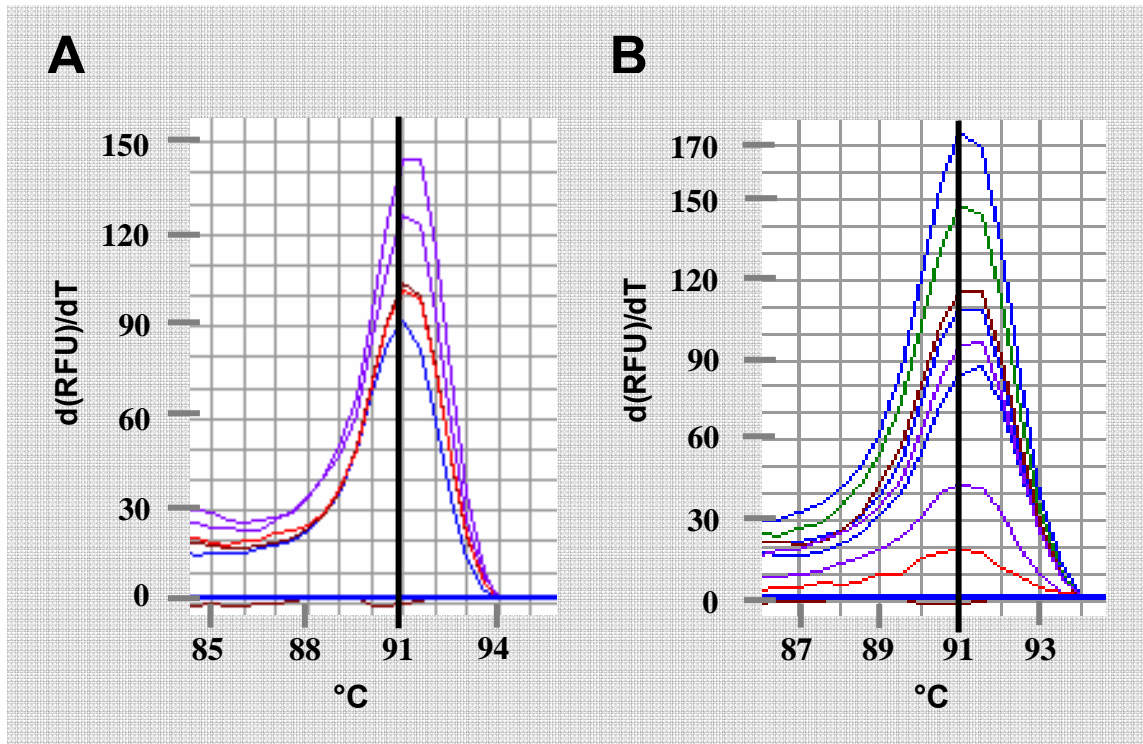
**Fig. 9. Condiciones de amplificación de E2-177.** (A) Electroforesis en SB-agarosa 1% de muestras de las mezclas de PCR con concentraciones variables de (A) MgCl<sub>2</sub> (1-5 mM), (B) dNTPs (0.02-0.12 mM), (C) oligonucleótidos (0.06-0.14 μM) e incubadas (D) a diferentes temperaturas de annealing (56-62°C). Las condiciones elegidas fueron MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTPs 0.06 mM (c/u), oligonucleótidos 0.12 μM (c/u), temperatura de annealing 59°C y están indicadas con una flecha en cada panel. Carril 2 de cada panel: CtINeg (agua) En el carril 1 de cada electroforesis se usaron los marcadores de una escalera de 100 pb.



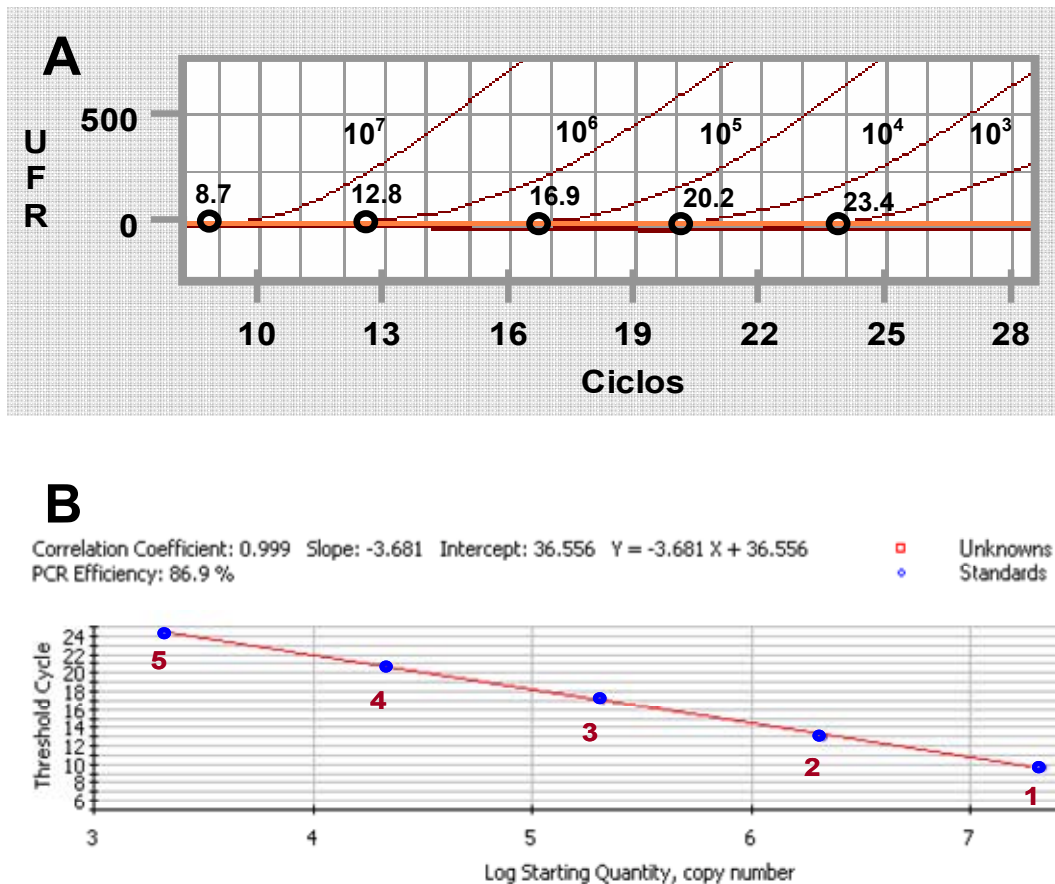
**Fig. 10. Preamplificación de pEV201 y diluciones para calibrar la PCR-TR anidada.** Mezcla de PCR directa (PCR1): con 0.096 ng de DNA de pEV201 ( $2.1 \times 10^7$ ), para preamplificar E2-1031 por 15 ciclos. Mezcla de PCR anidada (PCR 2): con la mezcla PCR1 preamplificada se prepararon diluciones logarítmicas seriadas (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) de la siguiente manera: 5 µl de la mezcla maestra se agregaron a 45 µl de agua; 5 µl de la primera dilución fueron diluidos sucesivamente en 45 µl de agua y así sucesivamente. Luego fue añadido 1 µl de cada dilución como molde para obtener la familia de curvas tipo para calibrar la cuantificación del gen E2-VPH16.



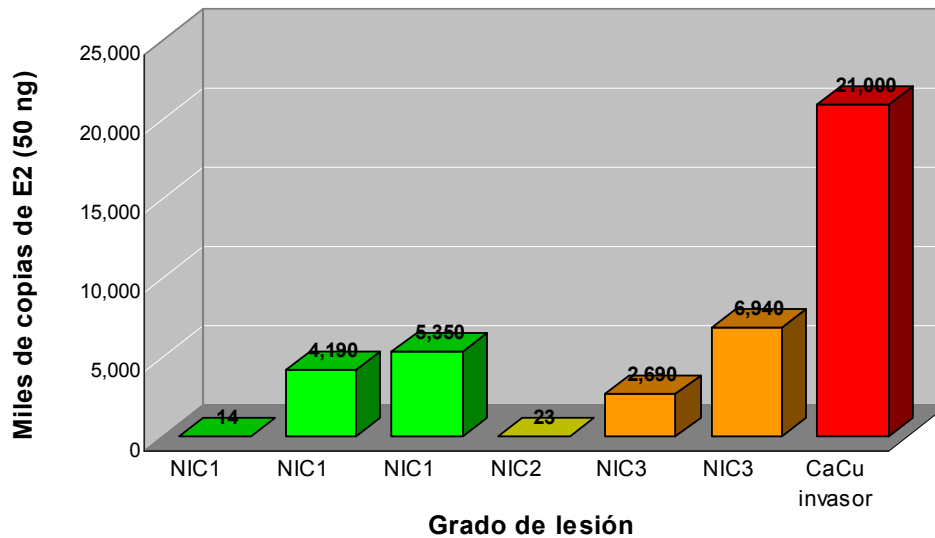
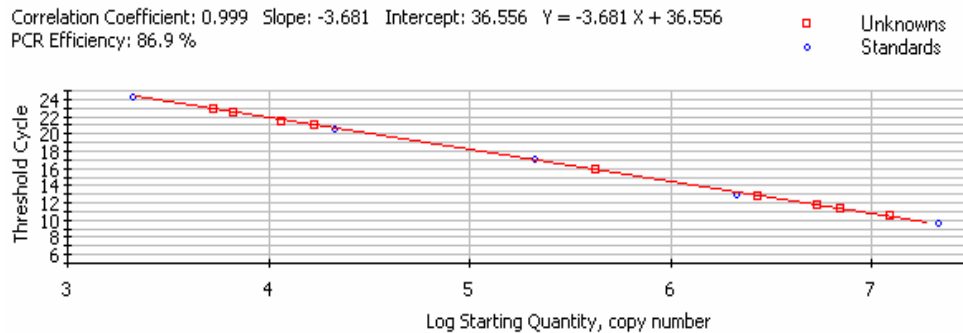
**Fig. 11. Amplificación de E2-177 por PCR en tiempo real directa y anidada.** (A) Familia de curvas tipo en función del número de copias iniciales ( $2.1 \times 10^5$ - $2.1 \times 10^7$ ) de pEV201 obtenida con mezclas de PCR en tiempo real directa preparadas con diluciones logarítmicas seriadas de pEV201. Los valores promedio de Ct en cada pareja de curvas fueron: Ct 1, 15.6 ( $2.1 \times 10^7$  copias). Ct 2, 18.5 ( $2.1 \times 10^6$  copias). Ct 3, 21.8 ( $2.1 \times 10^5$  copias). Incremento promedio de los valores de Ct con cada dilución:  $\Delta Ct_{avg} = 3.1$ . (B) Familia de curvas en función del número de copias iniciales ( $2.1 \times 10^4$ - $2.1 \times 10^7$ ) de pEV201 obtenida con mezclas de PCR en tiempo real anidada preparadas con diluciones logarítmicas seriadas con 1/150 de volumen de mezclas para preamplificar E2-1031 por 15 ciclos. Los valores de Ct en cada pareja de curvas fueron: Ct 1, 10.9 ( $2.1 \times 10^7$  copias). Ct 2, 14.1 ( $2.1 \times 10^6$  copias). Ct 3, 17.6 ( $2.1 \times 10^5$  copias). Ct 4, 21.4 ( $2.1 \times 10^4$  copias). Incremento promedio de los valores de Ct con cada dilución:  $\Delta Ct_{avg} = 3.5$ . Los valores de Ct promedio de ambas figuras están indicados por los círculos. El umbral fue fijado en 30 UFR para ambos experimentos. En el experimento A hubo amplificación nula de la mezcla con  $2.1 \times 10^4$  copias de pEV201, mientras que en el experimento B la misma mezcla amplificó con buen rendimiento. Nótese el desplazamiento general de una diferencia promedio de 4.4 en los valores de Ct en las curvas correspondientes del experimento B respecto a las curvas de del experimento A, lo cual indica que la preamplificación por 15 ciclos aumenta ~1000 veces el rendimiento de E2-177 en la PCR-TR anidada.



**Fig. 12. Extinción térmica de la fluorescencia de los productos E2-177 obtenidos con PCR-TR directa y anidada. (A) Mezclas de amplificación de E2-177 por PCR-TR directa. (B) Mezclas de amplificación de E2-177 por PCR-TR anidada. El producto principal de amplificación parece ser específico e idéntico en ambos experimentos porque todos los productos parecieron tener el mismo contenido y secuencia de bases dado que sus picos de extinción térmica de la fluorescencia coincidieron a  $91^{\circ}\text{C}$  (línea vertical negra).**

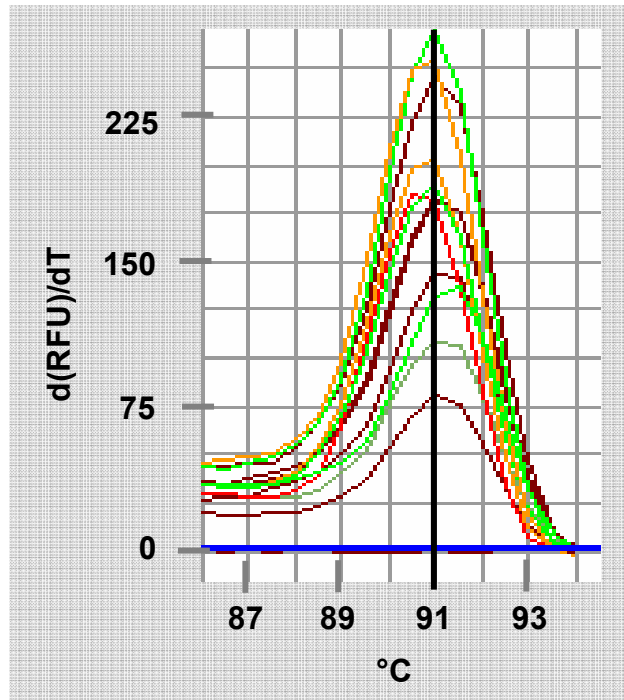


**Fig. 13. Amplificación de E2-177 por PCR-TR anidada.** (A) Familia de curvas de mezclas con  $2.1 \times 10^3$ - $2.1 \times 10^7$  copias de pEV201). Los valores de Ct, indicados por los círculos negros en cada curva fueron: Ct 1, 8.7 ( $2.1 \times 10^7$  copias). Ct 2, 12.8 ( $2.1 \times 10^6$  copias). Ct 3, 16.9 ( $2.1 \times 10^5$  copias). Ct 4, 20.2 ( $2.1 \times 10^4$  copias). Ct 5, 23.4 ( $2.1 \times 10^3$  copias). Incremento promedio de los valores de Ct con cada dilución:  $\Delta Ct_{avg} = 3.6$ , lo cual indica que las curvas tipo de la PCR-TR anidada son consistentes con el número inicial de copias de pEV201. (B) Regresión lineal de Ct vs log del número de copias de pEV201 (círculos azules). Los parámetros de esta familia de curvas tipo ( $r = 0.999$ , pendiente = -3.681, eficiencia de la PCR = 86.9%), indican que la cuantificación de las copias de E2 basadas en la amplificación de E2-177 es confiable.

**A****B**

**Fig. 14. Correlación del número de las copias del gen E2-VPH16 con el grado de displasia del cérvix.** (A) Copias del gen E2 en lesiones precancerosas (NIC1, NIC2 y NIC 3) y cancerosas del cérvix debidas a VPH16. Nótese la tendencia al aumento en el número de copias del gen E2 al aumentar el grado de la lesión. (B) Cálculo del número de copias del gen E2 (cuadrados rojos) en las muestras problema por interpolación en la recta obtenida con los valores de Ct vs log del número de copias de pEV201 (círculos azules vacíos) derivada de la familia de curvas tipo usada para la calibración.





**Fig. 15. Extinción de la fluorescencia del producto E2-177 de las muestras con displasia cervical y las de la familia de curvas generadas a partir de pEV201. Los productos de pEV201 y los de las lesiones neoplásicas analizadas parecen ser específicos/idénticos debido a que tienen la misma temperatura máxima de extinción de la fluorescencia ya demostrada (91°C).**

## ANEXOS

### 1. Cálculo del número de copias de la secuencia E2-1031 en pEV201

- Fragmento clonado: 1031 pb
- Vector pGEM: 3000 pb
- Construcción pEV210 (clona SL201): 4031 pb
- Peso molecular promedio de una base: 650 Da
- No. de Avogadro =  $6.023 \times 10^{23}$

Copias por gramo de construcción

$$\begin{array}{l} 2,620,150 \text{ g} \longleftarrow 6.023 \times 10^{23} \text{ copias} \\ \quad \quad \quad 1 \text{ g} \longrightarrow X \\ X = 2.23 \times 10^{17} \text{ copias/g} \end{array}$$

Copias por nanogramo de construcción

$$\begin{array}{l} 1 \text{ g} \longleftarrow 2.23 \times 10^{17} \text{ copias} \\ 1 \times 10^{-9} \text{ g} \longrightarrow X \\ X = 2.23 \times 10^8 \text{ copias/ng} \end{array}$$

2. Número relativo de copias (NRC) vs  $\Delta Ct$

