



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

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**UNA NUEVA VARIANTE DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO
TIPO 16, CIRCULANTE EN SAN LUIS POTOSÍ**

Tesis que presenta

Marco Antonio Pineda Martínez

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la opción de

Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Rubén López Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., diciembre de 2005



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Una nueva variante de papilomavirus humano tipo 16, circulante en San Luis Potosí**” presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Marco Antonio Pineda Martínez** y aprobada el **09 de Diciembre de 2005** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén López Revilla
Director de la tesis

Dr. Lina Riego Ruiz
Asesora de la tesis

Dra. Irene Gastaño Navarro
Asesora de la tesis



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

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 015 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 14 días del mes de diciembre del año 2005, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidente	IPICYT
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretario	IPICYT
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Marco Antonio Pineda Martínez

sobre la Tesis intitulada:

Una nueva variante del papilomavirus humano tipo 16, circulante en San Luis Potosí

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 12:40 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 14 días del mes diciembre de 2005.



Dr. Marcial Bonilla Martín
Secretario Académico


Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue realizada 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 (No. 182067) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Esta tesis la dedico a la memoria de una persona que ha sido un pilar muy fuerte en mi vida, sin ella no habría llegado hasta aquí, mi bisabuelita (q.e.p.d.).

A mi abuelita, quien ha velado por mi bienestar y cuidado desde el momento en que nací.

A mis padres y hermana, por su apoyo incondicional en cada una de las metas fijadas.

A mis mejores amigas, Diana y Elsa, que a pesar de la distancia supieron darme aliento en los momentos difíciles, las quiero mucho.

A mi mejor amigo Fernando, por los momentos de ocio y reflexión compartidos desde hace trece años.

A mis compañeras Erika, Jacqueline, Nahomy y Yadira por su comprensión, amistad y confianza en todo momento, son ahora parte de mi vida.

A mis demás amistades y familiares, sinceramente muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén López Revilla por haberme ofrecido las bases para la realización de este trabajo. Por todo el apoyo, consejos y paciencia ofrecidos.

A la Dra. Lina Riego Ruiz y la Dra. Irene Castaño Navarro por la ayuda otorgada en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Alejandro García Carrancá del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por su generosa aportación.

Al Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, la Dra. Ma. de Lourdes Martínez Esparza, la Lic. Enf. Dalila Álvarez Fortanelli y el Dr. Julio Ortiz por las muestras provistas.

A la Biól. Mireya Sánchez Garza, por enseñarnos en gran medida las artes de este oficio.

A mis compañeras Luz Aurora Martínez Contreras y María Aurora Londoño Avendaño porque sin su trabajo y cooperación no habría llevado a buen término esta investigación.

A las Técnicas del Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria.

Al IPICYT por el apoyo para continuar con mis estudios.

Al CONACYT por la beca que me otorgó durante estos dos años.

ÍNDICE

CRÉDITOS INSTITUCIONALES	iv
DEDICATORIAS	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
Cáncer y CaCu.....	1
Papilomavirus humanos	1
Genotipos y variantes de HPV	2
HPV16.....	3
Epidemiología molecular del CaCu en México.....	3
El CaCu en San Luis Potosí.....	4
Propósito del trabajo.....	4
MATERIAL Y MÉTODOS	6
DNA.....	6
Controles.....	6
PCR directa.....	6
PCR anidada.....	7
Secuenciación de los productos de PCR anidada.....	7
Análisis de secuencia.....	7
Identificación de subtipos y variantes de HPV16	8
RESULTADOS	9
Condiciones de la PCR	9
PCR directa y anidada	9
Secuencias del gen E6.....	10
Identificación de subtipos y variantes de HPV16	10
Mutaciones adicionales identificadas.....	11
Análisis filogenético	12
DISCUSIÓN	13
PCR directa y anidada	13
Amplicones y secuencias obtenidas	14
Subtipos de HPV16 identificados	14
Variantes de HPV16 identificadas	15
Mutaciones adicionales y nuevas variantes identificadas	16
REFERENCIAS	17
ANEXO 1. SECUENCIAS DEL GEN E6 DE LOS SUBTIPOS DE HPV16	39
ANEXO 2. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA E6-HPV16 DE REFERENCIA	40

LISTA DE TABLAS

1. Parejas de oligonucleótidos	22
2. Mezclas de PCR	23
3. Ciclos de PCR para obtener los amplicones LCR/E7 y E6/E7	24
4. Características de las secuencias de E6-HPV16 obtenidas	25
5. Variantes de HPV16 identificadas con las secuencias de los amplicones	26
6. Mutaciones encontradas en las variantes	27
7. Alineación de la secuencia nucleotídica del gen E6-HPV16 de referencia (E-P) con la de los subtipos identificados	28

LISTA DE FIGURAS

1. Mapa del genoma de HPV16	29
2. Variantes de HPV16 encontradas en la ciudad de México	30
3. Frecuencia de los casos de cáncer cervicouterino <i>in situ</i> e invasor por grupos de edad en mujeres de San Luis Potosí	31
4. Productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos <i>LCRSE7AS</i> y <i>E6F/PU-2R16</i>	32
5. Amplificación por PCR directa del producto <i>LCR/E7</i> de ~650 pb y anidada del producto <i>E6/E7</i> de ~626 pb a partir de cuatro muestras cervicales HPV16-positivas y dos controles positivos (+16 y +18)	33
6. Posiciones de los nucleótidos en la secuencia del gen <i>E6</i> que permiten la identificación de subtipos y variantes de HPV16	34
7. Subtipos de HPV16 identificados en las 50 muestras cervicales secuenciadas en este trabajo	35
8. Variantes de HPV16 identificadas en las 50 muestras secuenciadas en este trabajo	36
9. Árbol filogenético de las variantes de HPV16 identificadas en las 38 secuencias completas del ORF <i>E6</i>	37
10. Árbol filogenético de las variantes de HPV16 identificadas, con ocho muestras representativas del ORF <i>E6</i>	38

RESUMEN

OBJETIVO. Identificar y determinar la frecuencia de subtipos y variantes del papilomavirus humano tipo 16 (HPV16) circulantes en mujeres con infecciones del cérvix en los estados de San Luis Potosí y Guanajuato. **MÉTODOS.** Empleamos DNA de 50 muestras de exudados cervicales previamente tipificadas en nuestro laboratorio como HPV16-positivas con infección única; 48 provenían de San Luis Potosí y dos de Guanajuato. Obtuvimos amplicones E6/E7 (626 pb) de las 50 muestras mediante PCR anidada con la pareja de oligonucleótidos E6F/PU-2R16 empleando como molde el producto LCR/E7 (650 pb) obtenido en la primera reacción de PCR. En las mezclas de PCR anidadas incluimos tres controles, dos positivos: plásmidos pHPV16 y pHPV18; y uno negativo: mezcla completa sin DNA. Los amplicones fueron secuenciados en el Laboratorio Nacional de Genómica del CINVESTAV-Irapuato. Comparamos las secuencias mediante alineamiento múltiple usando el programa ClustalW. Determinamos los subtipos y las variantes de HPV16 a partir de las secuencias completas del marco de lectura abierto (ORF) del gen E6 (Yamada et al. 1997). Predijimos las secuencias de aminoácidos de la proteína E6 con el programa Translate tool de la base de datos ExPASy. Construimos los dendrogramas de las secuencias de nucleótidos del gen E6 usando el método UPGMA con los programas Phylip y MEGA. **RESULTADOS.** La longitud promedio de bases secuenciadas, obtenidas de los 50 amplicones E6/E7 de 626 pb, fue 564 ± 63 pb (coeficiente de variación = 11.2%). Pudimos identificar los subtipos de HPV16 en el 98% (49/50) de las secuencias, y las variantes en el 94% (46/49) de las secuencias. Los dos subtipos identificados fueron el Europeo, E (n = 45, 92%) y el Asiático-Americano, AA (n = 4, 8%). Entre las variantes del subtipo E la más frecuente fue la de referencia (E-P) con 31 casos (62%), seguida por la E-350G con ocho casos (16%). Las variantes del subtipo E menos frecuentes fueron las E-C188G (dos casos, 4%) y E-A176G (un caso, 2%). Las variantes del subtipo AA fueron AA-a (dos casos, 4%) y AA-c (dos casos, 4%). Identificamos además 26 mutaciones puntuales adicionales a las de los subtipos y variantes conocidos entre 37 de las 46 secuencias: 16 sustituciones, seis inserciones y cuatro deleciones. La sustitución A404T (no sinónima), apareció en dos secuencias (4.3%), la sustitución A334G (sinónima) en 23 secuencias (50%) y la deleción de dos bases contiguas (AC) en las posiciones 56 y 57 del gen E6 26 pb corriente arriba del codón de inicio del ORF, en 13 secuencias (28.3%). **CONCLUSIONES.** Las 49 secuencias analizadas del gen E6 identifican los dos subtipos principales de HPV16 circulantes en los estados de San Luis Potosí y Guanajuato: 1) Europeo (n = 45; 90%) y 2) Asiático-Americano (n = 4, 8%). Las variantes de HPV16 identificadas en la gran mayoría (94%) de los dos subtipos son seis; cuatro del subtipo E: E-P (62%), E-350G (16%), E-C188G (4%), E-A176G (2%); y dos del subtipo AA: AA-a (4%) y AA-c (4%). Las sustituciones A404T y A334G y la deleción AC han sido identificadas por primera vez en dos, 23 y 13 de 46 secuencias del gen E6, respectivamente. La sustitución A334G, portada por la mitad de las secuencias del E6-ORF, parece corresponder a una nueva variante Europea de HPV16 característica de San Luis Potosí.

ABSTRACT

AIM. To identify and to determine the frequency of subtypes and variants of the human papillomavirus type 16 (HPV16) circulating among women with cervical infections in the states of San Luis Potosí and Guanajuato, Mexico. **METHODS.** DNA from 50 cervical samples infected only with HPV16, previously typed in our laboratory were used; 48 were from San Luis Potosí and two from Guanajuato. From the 50 samples E6/E7 (626 bp) amplicons were generated using nested PCR with the E6F/PU-2R16 primer pair, using as templates the LCR/E7 (650 bp) amplicons obtained in the first PCR. Three PCR controls were included: two positive, pHPV16 and pHPV18; and a negative one: master mix without template. Amplicons were sequenced at the National Genomics Laboratory, CINVESTAV-Irapuato, Mexico. Sequences were compared by means of multiple alignment using ClustalW software. HPV16 subtypes and variants were determined from the complete E6 gene open reading frame (ORF) sequences (Yamada et al. 1997). E6-protein amino acid sequences were predicted with the Translate tool software of the ExpASY database. Dendrograms of the E6 ORF nucleotide sequences were generated using the UPGMA method with both Phylip and MEGA software. **RESULTS.** The average length of the sequences obtained from the 50 E6/E7 amplicons was 564 ± 63 bp (variation coefficient = 11.2%). The HPV16 subtype was identified in 98% (49/50) of all E6/E7 sequences and the variants in 94% (46/49) of the E6 ORF sequences. Two subtypes were identified: 1) European, E (n = 45, 92%) and 2) Asian-American, AA (n = 4, 8%). E-P was the most frequent variant of the E subtype with 31 cases (62%), followed by E350G with eight cases (16%). The least frequent E subtype variants were E-C188G (two cases, 4%) and E-A176G (one case, 2%). The variants of the AA subtype were two: 1) AA-a (two cases, 4%) and 2) AA-c (two cases, 4%). Twenty-six point mutations additional to those of known subtypes and variants were identified in 37 of the 46 sequences: 16 substitutions, six insertions and four deletions. The non synonymous substitution A404T appeared in two sequences (4.3%), the synonymous substitution A334G in 23 sequences (50%), and the deletion of two contiguous bases (AC) in positions 56 and 57 of the E6 gene 26 bp upstream from the ORF start codon, in 13 sequences (28.3%). **CONCLUSIONS.** Sequencing of the 49 E6 gene amplicons identify the two major HPV16 subtypes circulating in the states of San Luis Potosí and Guanajuato, Mexico: 1) European (n = 45; 90%), and 2) Asian-American (n = 4, 8%). Six variants were identified among most (94%) of the two subtypes; four of the E subtype: E-P (62%), E-350G (16%), E-C188G (4%) and E-A176G (2%); and two of the AA subtype: AA-a (4%) and AA-c (4%). Substitutions A404T and A334G and the AC deletion have been identified for the first time in two, 23 and 13 of the E6 gene sequences, respectively. The A334G substitution, carried by 23/46 (50%) of the E6-ORF sequences, appears to correspond to a new HPV16 European variant characteristic of San Luis Potosí.

INTRODUCCIÓN

Cáncer y CaCu

El término cáncer designa a todos los tumores malignos y hace referencia al crecimiento descontrolado de una masa de tejido anormal (Willis, 1952). El cáncer es una de las primeras causas de muerte en todo el mundo, ya que anualmente se registran unos 10 millones de casos nuevos y más de seis millones de defunciones por algún tipo de cáncer.

El cáncer cervicouterino (CaCu) es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial y el primero en países en vías de desarrollo (Franco y Schlecht, 2003; Muñoz et al. 2003). La etiología y patogénesis del CaCu ha sido determinada a través de estudios clínicos, epidemiológicos, patológicos y moleculares. Los análisis epidemiológicos concluyeron que el CaCu parecía deberse a un agente infeccioso de transmisión sexual asociado a diversos factores de riesgo tales como la edad temprana del primer coito, múltiples parejas sexuales y multiparidad (zur Hausen, 1977).

Papilomavirus humanos

El papilomavirus humano (HPV) es considerado el factor etiológico más importante en la oncogénesis del cuello uterino, pues mediante técnicas moleculares se ha demostrado la presencia de HPV en 99.7% de los casos de CaCu (zur Hausen, 1977), principalmente de los tipos 16, 18, 31y 33, entre otros.

Los papilomavirus pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, son virus sin envoltura lipídica, con cápsides icosaédricas de 52-55 nm de diámetro que poseen un genoma circular de DNA de doble cadena de ~8 kilopares de bases (kb).

El genoma de los HPV (Fig. 1) puede ser dividido en tres regiones: i) una región temprana (E) de ~4 kb, la cual contiene los genes E1 y E2 que modulan la replicación y transcripción viral, así como los oncogenes E5, E6 y E7 que codifican proteínas reguladoras encargadas del proceso de transformación celular; ii) una región tardía (L) de ~3 kb que contiene los genes L1 y L2 que codifican las proteínas de la cápside viral y iii) una región larga de control (LCR) no codificante de ~1 kb localizada entre los genes L1 y E6, que contiene una serie de elementos en *cis* que regulan la expresión génica y la replicación viral (Münger et al. 2004; Villiers et al. 2004).

Genotipos y variantes de HPV

Existen cerca de 100 genotipos de HPV identificados (Münger et al. 2004; Villiers et al. 2004; Chan et al. 1995), que difieren aproximadamente $\geq 10\%$ en la secuencia completa de sus genomas (Bernard et al. 1994) y entre los cuales los genotipos 16, 18, 45, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 se asocian con mayor frecuencia al CaCu invasor, por lo que se les denomina de alto riesgo.

Espontáneamente ocurren mutaciones en el genoma de HPV que generan subtipos (antes denominados clases) que difieren del 2-10% en la secuencia de sus genomas, o variantes, cuando el porcentaje de diferencia es $\leq 2\%$ (Xi et al. 1997; Stewart et al. 1996; Chan et al. 1992; Ho et al. 1991). Los subtipos han sido descritos principalmente para los genes E6, L1 y la región larga de control. En el caso de HPV16, el gen E6 es uno de los más importantes, ya que un fragmento corto y continuo de la secuencia del genoma, posee información suficiente para identificar todos los subtipos y variantes descritos (Kämmer et al. 2000; Eriksson et al. 1999; Veress et al. 1999; Wheeler et al. 1997; Yamada et al. 1995). Además se sabe que ciertos subtipos específicos de los tipos de HPV16 y HPV18 aumentan aún más el riesgo de desarrollar cáncer, como es el caso del subtipo Asiático-Americano de HPV16 (Villa et al. 2000; Lizano et al. 1997).

HPV16

El genoma de HPV16 fue uno de los primeros en ser completamente secuenciado (Seedorf et al. 1985) y es considerado el genotipo más común de los más de 20 tipos de HPV asociados con lesiones cervicales y cáncer. Incluso se sabe que la infección en mujeres jóvenes (< 35 años) por ciertas variantes de HPV16 puede conducir a una progresión más rápida de la enfermedad (Swan et al. 2005; Hildesheim et al. 2001; Bosch et al. 1995).

Los subtipos de HPV16 se distribuyen diferencialmente en los continentes. El subtipo Asiático-Americano (AA) se encuentra principalmente en Centroamérica, Sudamérica y España; el Asiático (As) en el sur de Asia; los Africanos (Af-1, Af-2) en el continente africano; y el Europeo (E) en todas las regiones excepto España y África. El subtipo E es usado como prototipo de referencia de HPV16 por la mayoría de los autores (Yamada et al. 1995, 1997). Existe un grupo más, el Norteamericano (NA-1) considerado por algunos autores como un subtipo más de HPV16 y por otros como una variante del AA. Los subtipos de HPV16 difieren en prevalencia, propiedades químicas y biológicas (i.e. el subtipo AA posee una replicación viral más eficiente, así como una mayor estimulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7), y es incierta su implicación en la etiología del cáncer cervicouterino (Cruz et al. 2004; González-Losa et al. 2004; Zehbe et al. 1998; Stöppler et al. 1996).

Epidemiología molecular del CaCu en México

México ocupa el quinto lugar en los índices de mortalidad por cáncer cervicouterino en Latinoamérica (Arrossi et al. 2003). Además en nuestro país el CaCu es la primera causa de muerte por neoplasia en mujeres de vida reproductiva (Berumen et al. 2001; Secretaría de Salud, 2004).

Torroella-Kouri et al. (1998) demostraron la presencia de DNA de HPV en 87% de los especímenes de pacientes con CaCu en México. Lazcano-Ponce et al. (2001) confirmaron que la detección del genoma viral es más sensible que el Papanicolaou ya que encontraron DNA de HPV en el 14.5% de mujeres mexicanas con citología normal del cérvix.

Berumen et al. (2001) detectaron en la ciudad de México una incidencia del 50.8% de HPV16 en mujeres HPV-positivas y que el subtipo AA de HPV16 es 21 veces más frecuente en las mujeres con cáncer, y que las pacientes positivas para este subtipo son en promedio ocho años más jóvenes que las positivas para el subtipo E. En México la frecuencia del subtipo AA de HPV16 parece ser muy elevada (Fig. 2), lo que podría contribuir a la alta incidencia de CaCu en el país, ya que cerca del 60% de los casos de CaCu en mujeres de 35 años o menos pueden atribuirse a dicho subtipo (González-Losa et al. 2004; Ordóñez et al. 2004; Casas et al. 1999).

El CaCu en San Luis Potosí

San Luis Potosí, Nayarit, Morelos, Yucatán, Chiapas, Campeche, Veracruz, Michoacán y Guerrero han sido catalogados entre los estados con tasas de mortalidad por CaCu más altas para mujeres de 25 años o mayores en la República Mexicana.

Un estudio reciente elaborado por nuestro grupo entre la población abierta de mujeres residentes en el Altiplano y la Zona Centro del estado de San Luis Potosí con lesiones preneoplásicas y malignas en biopsias y conos de cérvix (Fig. 3) encontró una alta prevalencia de lesiones preneoplásicas (85.8%) que incluyen bajo y alto grado, así como CaCu invasor (14.2%) con predominio en las mujeres jóvenes de la capital del estado (Rosales-Ortuño et al. 2003).

El análisis de los tipos de HPV circulantes en el estado de San Luis Potosí mediante el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) del producto E6/E7 de 250 pb obtenido por PCR anidada a partir de DNA de muestras de exudado cervical, reveló una frecuencia del 63% para la infección del cérvix por HPV16 (Martínez-Contreras, 2005).

Propósito del trabajo

La alta prevalencia de las infecciones del cérvix por HPV16 entre las mujeres residentes en la capital de San Luis Potosí nos llevó a preguntarnos si en esta

ciudad 1) la distribución de subtipos y variantes de HPV16 es similar a la descrita por Berumen et al (2001) y 2) si podríamos detectar alguna variante no descrita previamente que fuese característica de la región.

Para responder estas preguntas llevamos a cabo un análisis comparativo por alineamiento múltiple de las secuencias de los amplicones E6/E7 de 626 pb obtenidos mediante PCR anidada con los oligos LCRS/E7AS en la primera reacción y E6F/PU-2R16 en la segunda reacción (Fig. 4) empleando como molde el DNA aislado de 50 muestras de exudado cervical previamente tipificadas como HPV16-positivas con infección única en nuestro laboratorio (Martínez-Contreras 2005).

MATERIAL Y MÉTODOS

DNA

Utilizamos 50 muestras con infección única del cérvix por HPV16 previamente tipificadas por PCR-RFLP, 48 provenientes del estado de San Luis Potosí y 2 de Guanajuato (Martínez-Contreras 2005). El DNA fue obtenido mediante extracción de los exudados cervicales usando un Buffer de lisis (10 mM Tris pH 8.0; 0.4 M NaCl; 2 mM Na₂ EDTA pH 8.0), SDS 10% y proteinasa K seguida de precipitación de las proteínas con 6M NaCl y de los ácidos nucleicos con isopropanol. Las muestras fueron proporcionadas por el Dr. Julio Ortiz de la Clínica de Displasias de la jurisdicción sanitaria No. 1 del estado de San Luis Potosí, la Dra. Ma. de Lourdes Martínez Esparzay la Lic. Enf. Dalila Álvarez Fortanelli. El DNA extraído fue diluido en alícuotas de 15 µl a una concentración de 10 ng/µl de DNA.

Controles

Para este propósito empleamos dos plásmidos, pHPV16 y pHPV18, que contienen el genoma completo de HPV de los tipos 16 y 18, proporcionados por el Dr. Alejandro García Carrancá del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. Y mezcla maestra sin DNA como control negativo.

PCR directa

Amplificación del producto LCR/E7 de 650 pb.

Usamos 25 ng de DNA de exudado cervical o 10 ng de DNA plasmídico como molde con los oligos LCRS/E7AS (Tabla 1) en mezclas de reacción de 50 µl (Tabla 2). Las mezclas fueron incubadas en el termociclador Touchgene Gradient

(Techne) con los ciclos y condiciones de PCR para los amplicones LCR/E7 y E6/E7 mostrados en la Tabla 3. Los amplicones generados fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1%-SB (Brody y Kern, 2000).

PCR anidada

Con el fin de tener suficiente DNA para la secuenciación del amplicón E6/E7, decidimos utilizar una PCR anidada que en la segunda reacción amplifica una región interna de 626 pb a partir del producto generado por la primera reacción (“directa”) con los oligos LCRS/E7AS.

Amplificación del producto E6/E7 de 626 pb.

Añadimos 1/50 de volumen (1 μ l) del producto LCR/E7, obtenido por PCR directa, como molde para la reacción anidada con los oligos E6F/PU-2R16 (Tabla 1) en mezclas de reacción de 50 μ l (Tabla 2). Las mezclas fueron incubadas en el termociclador con las condiciones descritas (Tabla 3). Los amplicones generados fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1%-SB (Fig. 5).

Secuenciación de los productos de PCR anidada

Purificamos 40 μ l de las mezclas de reacción con los productos E6/E7 generados mediante PCR anidada, usando el kit Wizard (PCR Preps DNA Purification Systems, Promega). Los amplicones purificados fueron secuenciados por el método dideoxy terminal (Sanger et al. 1977) con un equipo 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) en el Laboratorio Nacional de Genómica del CINVESTAV-Irapuato.

Análisis de secuencia

Obtuvimos 50 secuencias del amplicón E6/E7 de 626 pb. La asignación de las posiciones de los nucleótidos y aminoácidos se basó en el trabajo “Human papillomaviruses: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences” publicado por Myers (1997). Comparamos las secuencias por

alineamiento múltiple contra la secuencia de referencia (HPV16R; Anexo 1) usando el programa ClustalW v1.82 (Higgins et al. 1994). La predicción de la secuencia de aminoácidos de la oncoproteína E6 fue obtenida con el programa Translate tool de la base de datos ExpPASy (Gasteiger et al. 2003). La construcción de los dendrogramas se hizo con el método de grupo-par con promedio aritmético (UPGMA) empleando el modelo de Kimura con una tasa de transición-transversión de 2, a partir de 38 secuencias codificantes completas del ORF E6 con los programas Phylip v3.6 (Felsenstein, 2005) y MEGA v3.1 (Kumar et al. 2004).

Identificación de subtipos y variantes de HPV16

Los subtipos y variantes de HPV16 fueron clasificados sobre la base de los cambios en la secuencia de nucleótidos del gen E6 publicados por Yamada et al. (1997).

RESULTADOS

Condiciones de la PCR

Para optimizar la concentración de magnesio preparamos mezclas con MgCl_2 2, 2.5, 3, 4 y 5 mM para la pareja de oligos E6F/PU-2R16. La máxima intensidad de la banda principal esperada (626 pb) sin bandas inespecíficas fue obtenida en presencia de MgCl_2 2 mM, por lo que empleamos esta concentración en los experimentos subsecuentes.

PCR directa y anidada

Comparamos la sensibilidad de la PCR directa y anidada para la obtención del amplicón E6/E7 usando los oligos E6F/PU-2R16. En un primer ensayo evaluamos la cantidad de DNA (10, 25, 50, 75 y 100 ng) necesario para la obtención de una banda nítida del amplicón E6/E7 mediante PCR directa usando muestras tipificadas previamente y dos controles positivos (plásmidos con DNA de HPV-16 y -18 respectivamente). Detectamos la banda del producto E6/E7 en 23/28 muestras y ninguna banda en cinco muestras, independientemente de la cantidad de DNA empleada.

Para aumentar el rendimiento de los productos decidimos llevar a cabo ensayos de PCR anidada, consistentes en dos reacciones sucesivas en las cuales la primera amplifica un producto externo de 650 pb con los oligos LCRS/E7AS y en la segunda reacción (“anidada”) usamos como oligos internos la pareja E6F/PU-2R16 y una parte (1/50 μl) de la mezcla de la primera reacción como molde. De esta manera obtuvimos bandas conspicuas de DNA en todas las muestras de PCR anidada (Fig. 5) con un rendimiento suficiente (≥ 1500 ng por mezcla de 50 μl) para la purificación y secuenciación de amplicones.

Los ensayos subsecuentes fueron hechos con este método de PCR anidada que resultó más eficiente que la PCR directa.

Secuencias del gen E6

Obtuvimos 50 amplicones E6/E7 de 626 pb mediante PCR anidada empleando como molde DNA de muestras cervicales HPV-16 positivas tipificadas previamente (Martínez-Contreras, 2005). Los amplicones fueron secuenciados y la asignación de las posiciones de los nucleótidos y aminoácidos en las secuencias se basó en el trabajo de Myers (1997). En 29/50 amplicones obtenidos el sitio de inicio de la secuencia fue la posición 52 del gen E6 y el nucleótido (nt) 644 como la posición final de las mismas (10/50). La longitud promedio de las secuencias fue ~564 pb. Las características generales de las 50 secuencias analizadas están resumidas en la Tabla 4.

Identificación de subtipos y variantes de HPV16

Los subtipos y variantes de HPV16 fueron identificados sobre la base de los cambios en la secuencia del gen E6 (Fig. 6) publicados por Yamada et al. (1997). En 49 de las 50 secuencias analizadas pudimos determinar el subtipo de HPV16 (Tabla 4). Determinamos la variante en 46 de las 49 muestras con subtipo identificado, las tres restantes no fueron identificadas debido a que en ellas no contamos con las secuencias completas de los amplicones en posiciones esenciales para la identificación, principalmente el nt 350 del gen E6. Los subtipos identificados fueron dos: Europeo (n = 45) y Asiático-Americano (n = 4). Un resumen de las variantes identificadas y el número de casos de cada una se muestra en la Tabla 5.

El subtipo Europeo (E) predominó, con 45 casos (90%); los cuatro casos restantes, del subtipo Asiático-Americano (AA), representaron el 8% (Fig. 7). Entre las variantes del subtipo E la más frecuente fue la de referencia (E-P) con 31 casos (62%), seguida por la variante E-350G con 8 casos (16%). Las variantes del subtipo Europeo menos frecuentes fueron las E-C188G (dos casos, 4%) y E-

A176G (un caso, 2%). Las variantes del subtipo Asiático-Americano identificadas fueron AA-a (dos casos, 4%) y AA-c (dos casos, 4%). La distribución de frecuencias de las variantes de HPV16 identificadas se muestra en la Fig. 8.

Mutaciones adicionales identificadas

Encontramos un total de 26 mutaciones puntuales, adicionales de aquellas descritas para las 6 variantes identificadas, distribuidas entre 37 de las 46 secuencias con subtipo y variante determinado.

De las 26 mutaciones adicionales identificadas, 23 de ellas estuvieron presentes una sola vez, distribuidas entre 9 aislados: 14 sustituciones, 6 inserciones y 3 deleciones. Los detalles de cada una de estas mutaciones están resumidos en la Tabla 6.

Las 3 mutaciones adicionales restantes, fueron identificadas en dos o más de las 46 secuencias analizadas. La mutación A404T indica una sustitución de A por T en el nucleótido 404 y fue encontrada en dos de las 46 secuencias de variante determinada.

En 13 secuencias encontramos la deleción de dos bases vecinas, A y C, ubicadas en las posiciones 56 y 57 del gen E6, inmediatamente antes del codón de inicio de la traducción. Esta deleción parece no haber sido descrita anteriormente.

En 23 secuencias encontramos la sustitución sinónima A334G ubicada un nucleótido antes de la posición 335, utilizada comúnmente para la identificación de subtipo-variante (Tabla 6). Esta sustitución sinónima parece no haber sido descrita previamente.

Para identificar mutaciones no sinónimas, con el programa Translate tool dedujimos las secuencias de aminoácidos para las oncoproteínas E6 correspondientes a cada una de las 49 secuencias analizadas y las comparamos con la secuencia de referencia (Anexo 2).

Todas las secuencias identificadas como E-350G presentaron el cambio L83V esperado con respecto a la variante prototípica, i.e., sustitución de leucina por valina en la posición 83. Las secuencias identificadas como AA-a mostraron

los cambios de aminoácidos reportados para esta variante (Q14H; H78Y; L83V). Las secuencias identificadas como AA-c contenían los cambios de aminoácidos esperados (Q14H; I27R; H78Y; L83V). Las dos secuencias identificadas como E-C188G contenían los cambios de aminoácidos esperados (E20Q; L83V). La muestra identificada como E-A176G también generó los cambios de aminoácidos esperados (D25N; L83V).

La mutación A404T identificada en las secuencias de dos aislados produjo el cambio de aminoácidos I101F en la oncoproteína E6. La delección del nucleótido 484, identificada en la secuencia de un aislado generó un corrimiento en el marco de lectura de E6 a partir del aminoácido 127 en la predicción de la proteína. La mutación C374A identificada en una secuencia produjo el cambio de aminoácidos Q91K. Una mutación C206T generó un codón de paro en el aminoácido 35 de uno de los aislados, así como también la mutación T351A mostró un cambio L83E en la misma muestra. Una sustitución C173A produjo el cambio H24N en una secuencia. Finalmente, la mutación A182T identificada en una secuencia generó el cambio de aminoácidos I27L (Tabla 6).

Análisis filogenético

Las secuencias de nucleótidos de E6 (Tabla 7) fueron empleadas para construir dendrogramas con el método UPGMA usando el modelo de Kimura, a partir de 38 secuencias completas del ORF E6 con los programas de cómputo Phylip y MEGA.

Ambos tipos de árboles resultaron equivalentes, por lo que incluimos aquí sólo el obtenido con MEGA (Fig. 9). Debido al número y orden de las secuencias empleadas para la construcción del dendrograma anterior, no fue posible que la mutación no sinónima A404T se resolviera como un grupo independiente de la secuencia de referencia (E-P), por lo que usando el mismo método construimos un árbol basado solamente en ocho secuencias del ORF E6 que son representativas de cada una de las variantes identificadas (Fig. 10), incluyendo la que contiene las mutaciones A334G y A404T. Identificamos 6 variantes de HPV16 previamente descritas y 2 nuevas ramas, correspondientes a las mutaciones A334G y A404T que se agrupan cercanas a la secuencia de referencia E-P.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo amplían el conocimiento sobre la epidemiología de la infección por HPV16 iniciado recientemente por nuestro grupo (Martínez Contreras, 2005) y constituyen el primer acercamiento a la filogenia molecular de HPV16 en el estado de San Luis Potosí

PCR directa y anidada

El producto E6/E7 de 626 pb amplificado mediante PCR directa en mezclas que contenían la pareja de oligos E6F/PU-2R16 y 10-100 ng de DNA aislado de exudados cervicales identificados previamente en nuestro laboratorio como HPV16-positivos (Martínez-Contreras, 2005) fue detectado electroforéticamente mediante la observación de la banda del tamaño esperado en 23/28 muestras, por lo cual la sensibilidad de la PCR directa para detectar la infección por HPV a través de la amplificación de dicho producto fue ~82%.

Para maximizar la sensibilidad de la detección del DNA de HPV en las 50 muestras HPV16-positivas identificadas previamente que seleccionamos para este trabajo, decidimos emplear la PCR anidada mediante incubación sucesiva de dos mezclas de la siguiente manera: 1) en la primera mezcla generamos el producto LCR/E7 de 650 pb a partir de DNA de las muestras HPV16-positivas y la pareja de oligos LCRS/E7AS; 2) en la segunda mezcla, que contenía la pareja de oligos E6F/PU-2R16, generamos el producto E6/E7 de 626 pb empleando como molde 1/50 del volumen de la primera mezcla. De esta manera efectivamente pudimos observar las bandas esperadas del producto E6/E7 en las 50 muestras HPV16-positivas seleccionadas y por lo tanto aumentamos la sensibilidad de la detección del DNA de HPV al 100%.

Amplicones y secuencias obtenidas

Las mezclas de PCR anidada rindieron suficiente DNA puro del producto E6/E7 de 626 pb (= 240 ng por muestra) para secuenciar los amplicones de las 50 muestras HPV16-positivas. Para identificar los subtipos y las variantes de HPV16 decidimos comparar las secuencias del ORF completo del gen E6, obtenido mediante secuenciación de los amplicones E6/E7, ya que a través de un fragmento corto y continuo del genoma es posible obtener suficiente información para distinguir todos los subtipos y variantes descritos (Yamada et al. 1997).

La longitud de las secuencias obtenidas con los 50 amplicones no fue constante debido a que el proceso de secuenciación empleado (Sanger et al. 1977) y la calidad del DNA de los amplicones no permiten obtener la secuencia completa de los extremos 5' y 3' de todos los productos analizados, aunque la mayoría de las secuencias quedaron comprendidas entre los nucleótidos 52 (29/50, 58%) y 644 (10/50, 20%) del gen E6. La longitud promedio de las secuencias obtenidas fue de 564 ± 63 pb (CV = 11.17%). Las secuencias contenían información suficiente tanto para 1) distinguir los subtipos de HPV16, ya que contenían nucleótidos en posiciones esenciales para la identificación (Yamada et al. 1997), en prácticamente todas las muestras analizadas (49/50, 98%), como para 2) identificar las variantes de los subtipos en la gran mayoría de los casos (46/49, 93.8%). El análisis comparativo de las secuencias también nos permitió comprobar que todas corresponden al tipo HPV16, lo cual confirma la especificidad del método de PCR-RFLP para la tipificación viral empleado en nuestro laboratorio (Martínez-Contreras, 2005).

Subtipos de HPV16 identificados

En 49 de las 50 secuencias válidas del amplicón E6/E7-HPV16 encontramos los subtipos Europeo y Asiático-Americano. Predominó el subtipo Europeo (45/49, 90%), seguido de lejos por el subtipo Asiático-Americano (4/50, 8%). El único caso en el que no pudimos identificar el subtipo se debió a que la secuencia carecía de los nucleótidos en las posiciones esenciales para su clasificación, pues carece de un fragmento de 171 pb comprendido entre el nt 257 y el nt 428.

Nosotros no identificamos subtipos Africanos (Af-1 y Af-2) ni Asiáticos, igual que ha ocurrido en estudios previos realizados en la ciudad de México (González-Losa et al. 2004; Berumen et al. 2001). Es interesante mencionar que identificamos la variante E-A176G en un caso, la cual no había sido descrita en los trabajos que acabamos de mencionar. La distribución de las frecuencias de los subtipos Europeo y Asiático-Americano observada por nosotros difiere de la descrita por Berumen et al. (2001), quienes encontraron una prevalencia del subtipo AA del 44.2% entre las infecciones por HPV16 (Fig. 2) que contrasta con el 8% observado por nosotros. La diferencia podría deberse a los tipos de lesiones incluidas en ambos trabajos, ya que la población analizada por Berumen et al. (2001) se componía de mujeres con cáncer cervical invasor, mientras que en nuestro trabajo el 96% de las lesiones eran displasias de bajo y alto grado y solamente el 4% correspondía a CaCu invasor (dos casos; ambos identificados como subtipo AA).

Variantes de HPV16 identificadas

Pudimos identificar seis variantes de HPV16, a saber: 1) E-P (31, 62%), 2) E-350G (8, 16%), 3) E-C188G (2, 4%), 4) E-A176G (1, 2%), 5) AA-a (2, 4%) y 6) AA-c (2, 4%). Notamos que las frecuencias de las variantes del subtipo Europeo fueron diferentes a las observadas por Berumen et al. (2001). La variante más frecuente en nuestro trabajo fue la Europea de referencia (E-P) con un 62%, seguida de la E-350G con un 16% (Fig. 8), en tanto que Berumen et al. (2001) encontraron una frecuencia menor del 8% para la variante E-P (E-350T) y del 47% para la E-350G (Fig. 2).

El contraste en las frecuencias de subtipos y variantes de HPV16 encontradas por nosotros y por Berumen et al. (2001) resultan principalmente de las diferencias en los tipos de lesiones de las pacientes incluidas en ambos trabajos. Sin embargo, como las frecuencias de los tipos de HPV circulantes en el estado de San Luis Potosí y Guanajuato determinados por nuestro grupo (Martínez-Contreras, 2005) también difieren de las observadas en la ciudad de México (González-Losa et al, 2004; Berumen et al, 2001), dichas diferencias

pueden deberse también, al menos en parte, a las diferencias en la prevalencia de los tipos circulantes en las poblaciones muestreadas.

Mutaciones adicionales y nuevas variantes identificadas

Además de las mutaciones características que portan las seis variantes de HPV16 identificadas, detectamos 26 mutaciones adicionales repartidas en 37 de las 46 secuencias con subtipo y variante determinadas. Sin embargo, sólo tres de estas mutaciones parecen ser relevantes para la clasificación de variantes ya que se encuentran presentes en más de una muestra, y dos de ellas en un número considerable de las secuencias analizadas (13/46 y 23/46).

La primera de las mutaciones adicionales, encontrada en 2/46 secuencias, es la sustitución no sinónima A404T muy cercana a la secuencia de referencia E-P (Fig. 10) que generaría el cambio I101F en la secuencia de aminoácidos de la proteína E6. La relevancia de esta mutación para la función y patogenicidad es desconocida, pero llevando a cabo estudios de conformación de la estructura secundaria y terciaria, así como de motivos de unión a complejos y factores celulares podrían revelar mayor información al respecto.

La segunda de las mutaciones adicionales, observada en 13/46 (28%) secuencias, no había sido descrita previamente y consiste en una delección de dos bases contiguas (AC) en las posiciones 56 y 57 del gen E6 que se encuentran en la región 5' UTR. La importancia de esta mutación para la función y patogenicidad también es desconocida; sin embargo, mediante ensayos de mutagénesis dirigida y análisis de expresión transcripcional del gen E6 en líneas celulares como CasKi y SiHa podrían develar un conocimiento más amplio sobre esta delección.

La mutación sinónima A334G, presente en 23/46 de las secuencias subtipificadas provenientes del estado de San Luis Potosí, es muy cercana a la secuencia de referencia E-P (Figs. 9 y 10), y ya que se encuentra presente en el 50% de las muestras, parece representar una nueva variante de HPV16 que ha sido identificada por primera vez en este trabajo. Para confirmar que la posible variante potosina es efectivamente una nueva variante característica de esta región, el genoma completo debe ser clonado y secuenciado (Villiers et al, 2004).

REFERENCIAS

- Arrossi S, Sankaranarayanan R, Maxwell Parkin D. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex* 2003; 45 suppl 3: S306-S314.
- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton DL, Bauer HM, Wheeler CM. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994; 170, 1077-1085.
- Berumen J, Ordóñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Nat Cancer Inst* 2001; 93, 1325-1330.
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KY. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87, 796-802.
- Brody JR, Kern SE. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques* 2000; 36, 2-4.
- Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J. Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 83, 449-455.
- Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 1995; 69, 3074-3083.
- Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Dürst M, ter Meulen J, Villa L, Luande J, Mgaya HN, Bernard HU. Molecular variants of human

- papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* 1992; 66, 2057-2066.
- Cruz MR, Cerqueira DM, Cruz WB, Camara GNL, Brígido MM, Silva EO, Carvalho LGS, Martins CRF. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(3), 281-282.
- Eriksson A, Herron JR, Yamada T, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol* 1999; 80, 595-600.
- Felsenstein, J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 1989; 5:164-166. Version 3.6, 2005.
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
- Franco EL, Schlecht NF. The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J* 2003; 9(5), 348-359.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3784-3788. <http://us.expasy.org/tools/dna.html>
- González-Losa MR, Laviada Mier y Teran MA, Puerto-Solís M, García-Carrancá A. Molecular variants of HPV type 16 E6 among mexican women with LSIL and invasive cancer. *J Clin Virol.* 2004; 29(2), 95-98.
- Higgins D., Thompson J., Gibson T. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:4673-4680.
<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
- Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Scarpidis U, Lin QQ, Terai M, Bromley RL, Buetow K, Apple RJ, Burk RD. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93, 315-318.

- Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* 1991; 29, 1765-1772.
- Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* 2000; 81, 1975-1981.
- Kumar S, Tamura K & Nei M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 2004; 5:150-163. <http://www.megasoftware.net/>
- Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P. Epidemiology of HPV infection among mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001; 91, 412-420.
- Lizano M, García-Carranca A. Molecular variants of human papillomavirus types 16, 18 and 45 in tumors of the uterine cervix in Mexico. *Gac Med Mex* 1997; 133, 43-48.
- Martínez-Contreras LA. Tipos de papilomavirus de alto riesgo circulantes en mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato. Tesis de maestría, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. 2005.
- Münger K, Daldwin A, Edwards KM, Hyakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh KW. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78, 11451-11460.
- Muñoz N, Bosch X, De San José S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. International for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Eng J Med* 2003; 348, 518-527.
- Myers G, Baker C, Munger K, Sverdrup F, McBride A, Bernard HU. Human papillomaviruses: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. 3rd ed. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National Laboratory 1997; 110-123.

- Ordóñez RM, Espinosa AM, Sánchez-González DJ, Armendáriz-Borunda J, Berumen J. Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol* 2004; 85, 1433-1444.
- Rosales-Ortuño L, Rodríguez-Nieto MT, López-Revilla R. An outbreak of cervical cancer in San Luis Potosí, Mexico. En: Monsonego J (ed) *Proceedings of the 5th International Multidisciplinary Congress Eurogin 2003, Preventing and Controlling Cervical Cancer in the New Millenium*. Monduzzi Editore, Boloña, pp 341-344.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74, 5463-5467.
- Secretaría de Salud. 2004. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/index.html#>
- Seedorf K, Krämmer G, Dürst M, Suhai S, Röwekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virol* 1985; 145, 181-185.
- Stewart ACM, Eriksson AM, Manos MM, Muñoz N, Bosch FX, Peto J, Wheeler CM. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* 1996; 70, 3127-3136.
- Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 1996; 70, 6987-6993.
- Swan DC, Rajeevan M, Tortolero-Luna G, Follen M, Tucker RA, Unger ER. Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecologic Oncology* 2005; 96, 695-700.
- Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M. HPV prevalence among mexican women with neoplastic abnormal cervixes. *Gynecol Oncol* 1998; 70, 115-120.
- Veress G, Szarka K, Dong X, Gergely L, Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 1999; 80, 1035-1043.

- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000; 81, 2959-2968.
- Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virol* 2004; 324, 17-27.
- Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol* 1997; 35, 11-19.
- Willis RA: The spread of tumors in the human body. London, Butterworth & Co., 1952.
- Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89, 796-802.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997; 71, 2463-2472.
- Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart ACM, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* 1995; 69, 7743-7753.
- Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 1998; 58, 829-833.
- zur Hausen H. Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol* 1977; 78, 1-8.

TABLA 1. PAREJAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Pareja	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Amplicón, pb
1	LCRS	AAGGGAGTAACCGAAAACGGT	LCR/E7, 650 pb
	E7AS	TCATCCTCCTCCTCTGAG	
2	E6F	CGTAACCGAAATCGGTTGAAC	E6/E7, 626 pb
	PU-2R16	GAGCTGTCGCTTAATTGCTC	

TABLA 2. MEZCLAS DE PCR

Componente	ml	Concentración
Agua	32.2, 37.7 ^b	---
Buffer PCR 10x	5	1x ^a
MgCl ₂ 50 mM	2.5, 2 ^b	2.5, 2 ^b mM
dNTP (10 mM c/u)	2	0.4 mM
Pareja de oligos (10 μM c/u)	3	0.6 μM
Taq DNA polimerasa (5 U/μl)	0.3	1.5 U
DNA problema	2.5, 1 ^b	0.5 ng/μl

^a Tris HCl 200 mM, KCl 500 mM, pH 8.4

^b Adiciones a la primera y segunda mezclas de PCR, respectivamente.

TABLA 3. CICLOS DE PCR PARA LOS AMPLICONES LCR/E7 Y E6/E7

Etapa	°C	min
<i>Desnaturalización inicial</i>	94	4
<i>40 ciclos:</i>		
Desnaturalización	94	1
Alineación	55	1
Extensión	72	1
<i>Extensión final</i>	72	10

TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DE LAS 50 SECUENCIAS DE E6/E7-HPV16 OBTENIDAS

No.	Muestra	Clave	Amplicón			Variante identificada
			Nt inicial ⁺	Nt final ⁺	Longitud (pb)	
1	NB	—	52	621	567	E-350G
2	MLMR	14	52	620	567	E-350G
3	CMSM	18	52	627	574	E-P
4	DCM	19	66	619	409	E-P
5	LBM	20	54	625	408	E-P
6	MAHH	21	55	626	573	E-P
7	BPA	29	58	627	570	AA-a
8	DMG	38	49	658	610	E-P
9	RMV	40	52	620	566	E-P
10	CLBS	55	69	619	551	E-350G
11	PSA	56	74	659	585	E-350G
12	MTNC	58	52	621	568	E-C188G
13	JLL	63	42	655	614	AA-a
14	LDA	168	58	621	564	E-P
15	2457	181	52	619	565	Indeterminada*
16	ILS	192	59	626	569	E-C188G
17	MICR	200	42	646	605	E-P
18	MLR	248	66	619	554	E-350G
19	GMG	250	137	644	507	E-P
20	JMM	251	47	642	597	E-P
21	TAS	252	63	646	584	E-P
22	TMH	253	64	642	579	E-350G
23	MMHH	254	52	626	574	E-P
24	MRCC	257	52	644	593	E-350G
25	JMM	295	52	645	592	E-P
26	CVP	296	52	643	593	E-P
27	MRLG	299	52	644	595	E-P
28	MDCLP	306	52	630	579	E-P
29	VCM	307	52	655	601	E-P
30	ARM	308	52	626	574	E-P
31	JMP	310	52	642	591	E-P
32	RYA	311	52	641	588	E-P
33	SRR	313	52	644	590	E-P
34	MCH	315	58	621	566	E-P
35	MCBM	316	52	644	593	E-P
36	MRYA	319	69	303	236	E-P
37	SRC	323	65	626	562	E-P
38	ARR	324	52	646	594	E-P
39	LMC	330	52	623	572	E-P
40	AML	331	68	620	459	E-P
41	CLC	332	52	646	592	E-P
42	PSM	338	52	644	592	E-P
43	GYH	346	52	644	593	E-P
44	MC	350	52	640	589	E-P
45	FMT	353	52	621	571	E-P
46	MDH	372	52	644	593	E-P
47	ZRH	374	52	644	593	E-A176G
48	BJMC	390	52	639	585	E-350G
49	PAMA	404	52	644	593	AA-c
50	CMN	405	68	620	553	AA-c

Longitud promedio \pm DE de las secuencias = 563.8 ± 63 pb (CV = 11.17%).

* No se pudo determinar porque no se cuenta con la secuencia completa del amplicón.

+ Las posiciones están indicadas con respecto a la secuencia del gen E6 de referencia.

TABLA 5. VARIANTES DE HPV16 IDENTIFICADAS CON LAS SECUENCIAS DE LOS AMPLICONES

Cambios de nucleótidos y aminoácidos																										
Variante	F	R	R	K	L	Q	Q-H	Q	D-N	D	I-R	E-Q	C	C	R	D	A	A-A	V-V	D	H-Y	L-V	L	S-S	aa	
	109	131	132	135	137	143	145	161	176	178	183	188	255	256	267	269	285	286	289	295	335	350	403	532	nt	
HPV-16R	T	A	G	A	T	C	G	C	G	T	T	G	G	C	G	G	C	T	A	T	C	T	A	A	No. Casos (%)	
E-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31	63%
E-350G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	8	16%
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	3	6%
E-C188G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	2	4%
AA-a	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	-	T	G	-	G	2	4%
AA-c	-	-	-	-	-	-	T	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	G	-	T	G	-	G	2	4%
E-A176G	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	1	2%
Total																								49	100	

Las letras muestran los cambios de los nucleótidos en las posiciones indicadas.

El signo - marca la ausencia de variación en los nucleótidos indicados respecto a la secuencia de referencia (E-P).

La letra N indica ambigüedad en la secuencia obtenida para la posición indicada; sin embargo, esto no impidió la determinación del subtipo.

TABLA 6. MUTACIONES ENCONTRADAS EN LAS VARIANTES

No.	Aislado viral			Cambios de nucleótidos		Cambios de aminoácidos	
	Clave	Subtipo	Variante	Tipo de mutación	Mutación puntual	Sustitución	Frameshift
1	40	E	P	S	C374A	Q91K	--
				D	nt 533	--	144
2	14	E	350G	S	A182T	I27L	--
				D	nt 393, 394	--	97
3	55	E	350G	S	C206T	Q35stop	--
				S	T351A	L83E	--
				I	T entre nt 206-207	--	35
4	29	AA	A	D	nt 484	--	127
5	181	-	-	S	T294A	--	--
				S	C235T	--	--
				I	G entre nt 224-225	--	41
6	20	E	P	I	G entre nt 505-506	--	135
7	192	E	C188G	S	A97G	--	--
8	315	E	P	S	C173A	H24N	--
				S	A330G	--	--
				S	T331A	--	--
				I	TG entre nt 331-332	--	76
				S	A354G	--	--
				S	C360G	--	--
				S	A361G	--	--
9	331	E	P	S	A91C	Q-H	--
				I	C entre nt 121-122	--	6
				I	C entre nt 122-123	--	6

S, sustitución. D, delección. I, inserción.

TABLA 7. ALINEACIÓN DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN E6-HPV16 DE REFERENCIA (E-P) CON LAS DE LOS SUBTIPO IDENTIFICADOS

E6 HPV16 ref	ATGCACAAAAGAGAAGTCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA	60
299 E-P	ATGCACAAAAGAGAAGTCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA	60
168 E-P A334G	ATGCACAAAAGAGAAGTCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA	60
295 E-P A404T	ATGCACAAAAGAGAAGTCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA	60
374 E-A176G	ATGCACAAAAGAGAAGTCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA	60
58 E-C188G	ATGCACAAAAGAGAAGTCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA	60
56 E-350G	ATGCACAAAAGAGAAGTCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA	60
63 AA- a	ATGCACAAAAGAGAAGTCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA	60
405 AA- c	ATGCACAAAAGAGAAGTCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA	60

E6 HPV16 ref	CAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTACTGC	120
299 E-P	CAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTACTGC	120
168 E-P A334G	CAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTACTGC	120
295 E-P A404T	CAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTACTGC	120
374 E-A176G	CAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTACTGC	120
58 E-C188G	CAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTACTGC	120
56 E-350G	CAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTACTGC	120
63 AA- a	CAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTACTGC	120
405 AA- c	CAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTACTGC	120

E6-HPV16 ref	AAGCAACAGTTACTGCGACCTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTA	180
299 E-P	AAGCAACAGTTACTGCGACCTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTA	180
168 E-P A334G	AAGCAACAGTTACTGCGACCTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTA	180
295 E-P A404T	AAGCAACAGTTACTGCGACCTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTA	180
374 E-A176G	AAGCAACAGTTACTGCGACCTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTA	180
58 E-C188G	AAGCAACAGTTACTGCGACCTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTA	180
56 E-350G	AAGCAACAGTTACTGCGACCTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTA	180
63 AA- a	AAGCAACAGTTACTGCGACCTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTA	180
405 AA- c	AAGCAACAGTTACTGCGACCTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTA	180

E6-HPV16 ref	TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATT	240
299 E-P	TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATT	240
168 E-P A334G	TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATT	240
295 E-P A404T	TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATT	240
374 E-A176G	TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATT	240
58 E-C188G	TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATT	240
56 E-350G	TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATT	240
63 AA- a	TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATT	240
405 AA- c	TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATT	240

E6-HPV16 ref	AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC	300
299 E-P	AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC	300
168 E-P A334G	AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC	300
295 E-P A404T	AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC	300
374 E-A176G	AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC	300
58 E-C188G	AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC	300
56 E-350G	AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC	300
63 AA- a	AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC	300
405 AA- c	AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC	300

E6-HPV16 ref	AAACCGTTGTGATTGTTTAAATAGGTTGATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA	360
299 E-P	AAACCGTTGTGATTGTTTAAATAGGTTGATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA	360
168 E-P A334G	AAACCGTTGTGATTGTTTAAATAGGTTGATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA	360
295 E-P A404T	AAACCGTTGTGATTGTTTAAATAGGTTGATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA	360
374 E-A176G	AAACCGTTGTGATTGTTTAAATAGGTTGATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA	360
58 E-C188G	AAACCGTTGTGATTGTTTAAATAGGTTGATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA	360
56 E-350G	AAACCGTTGTGATTGTTTAAATAGGTTGATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA	360
63 AA- a	AAACCGTTGTGATTGTTTAAATAGGTTGATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA	360
405 AA- c	AAACCGTTGTGATTGTTTAAATAGGTTGATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA	360

E6-HPV16 ref	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC	420
299 E-P	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC	420
168 E-P A334G	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC	420
295 E-P A404T	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC	420
374 E-A176G	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC	420
58 E-C188G	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC	420
56 E-350G	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC	420
63 AA- a	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC	420
405 AA- c	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC	420

E6-HPV16 ref	GGTCGATGTATGCTTGTGTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA	477
299 E-P	GGTCGATGTATGCTTGTGTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA	477
168 E-P A334G	GGTCGATGTATGCTTGTGTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA	477
295 E-P A404T	GGTCGATGTATGCTTGTGTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA	477
374 E-A176G	GGTCGATGTATGCTTGTGTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA	477
58 E-C188G	GGTCGATGTATGCTTGTGTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA	477
56 E-350G	GGTCGATGTATGCTTGTGTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA	477
63 AA- a	GGTCGATGTATGCTTGTGTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA	477
405 AA- c	GGTCGATGTATGCTTGTGTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA	477

La primera línea de cada bloque, E6-HPV16 ref, corresponde a la secuencia de los nucleótidos del gen de referencia.

Se tomó sólo una secuencia representativa para cada una de las variantes identificadas.

Explicación de la nomenclatura empleada con el ejemplo de la variante 374 E-A176G: 1) 374, identidad de la muestra; 2) E, subtipo europeo de HPV16; 3) A176G, variante del subtipo indicado con una transición de A por G en el nucleótido 176.

El asterisco (*) en la línea inferior de cada bloque indica identidad de la secuencia de referencia (en este caso E6-HPV16 ref) con todas las variantes identificadas que aparecen en los renglones de cada bloque.

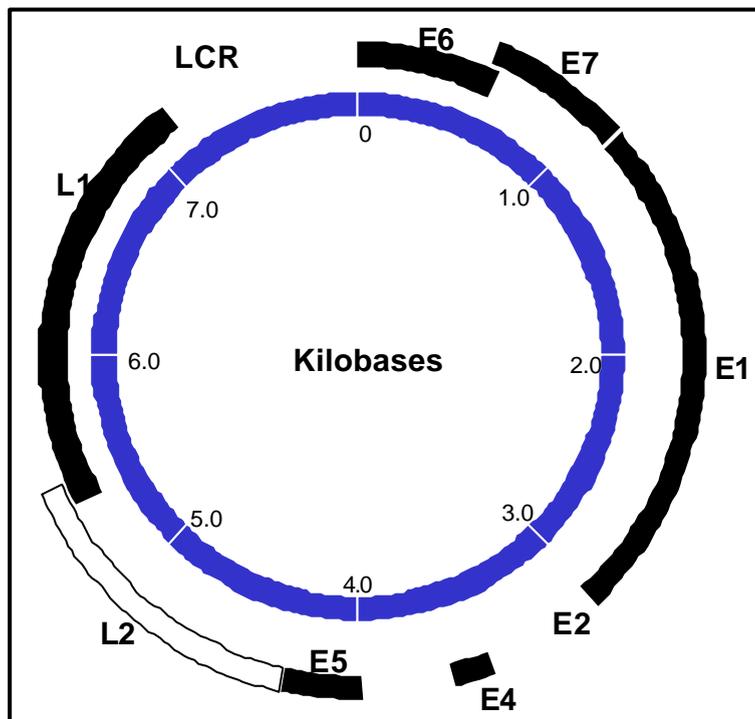


Fig. 1. Mapa del genoma de HPV16.

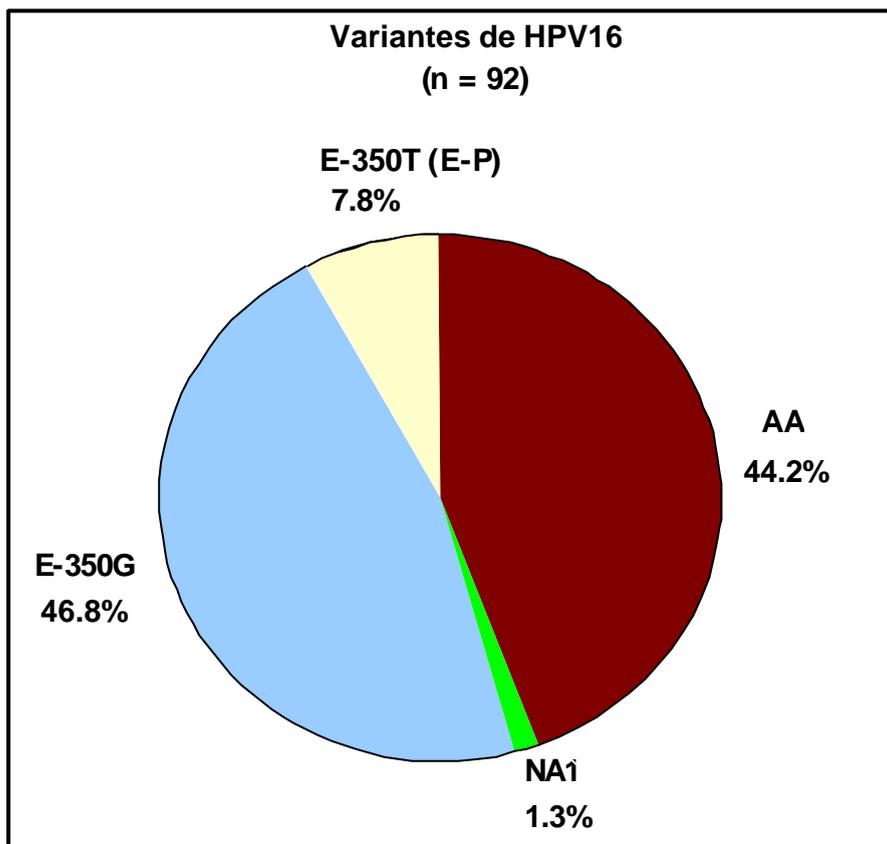


Fig. 2. Variantes de HPV16 encontradas en la ciudad de México. E-350T, europeo de referencia; E-350G, variante de subtipo europeo con sustitución E350G; AA subtipo Asiático-Americano; NA1, Norteamericano. Todas las muestras corresponden a pacientes con cáncer invasor (Berumen et al., 2001).

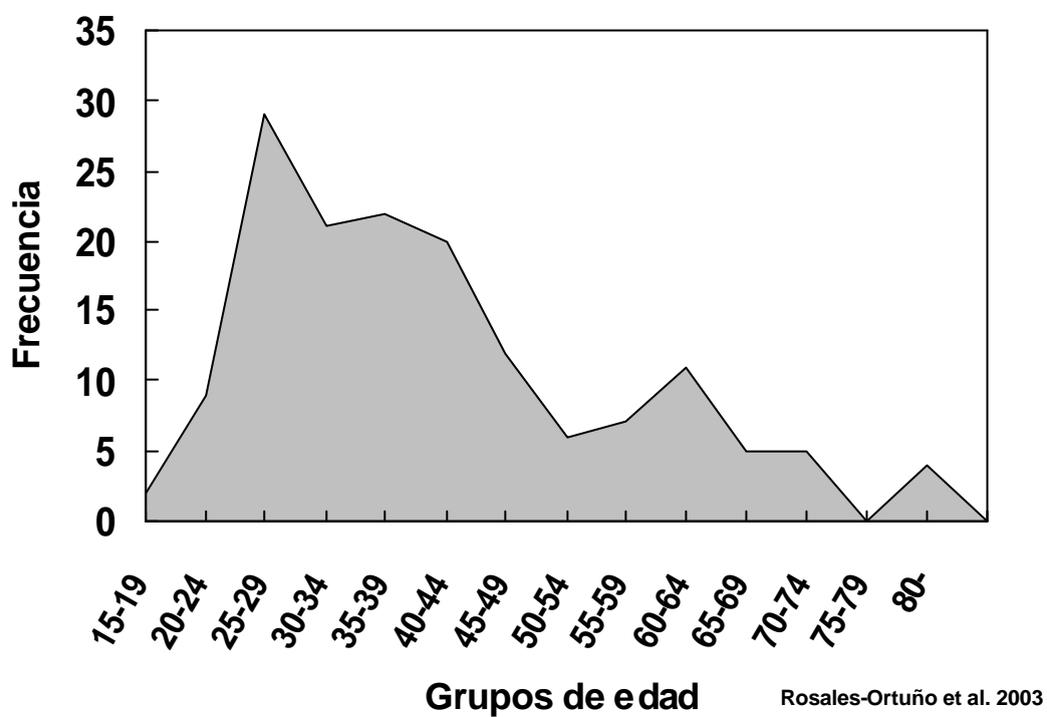


Fig. 3. Frecuencia de los casos de cáncer cervicouterino in situ e invasor por grupos de edad en mujeres de San Luis Potosí.

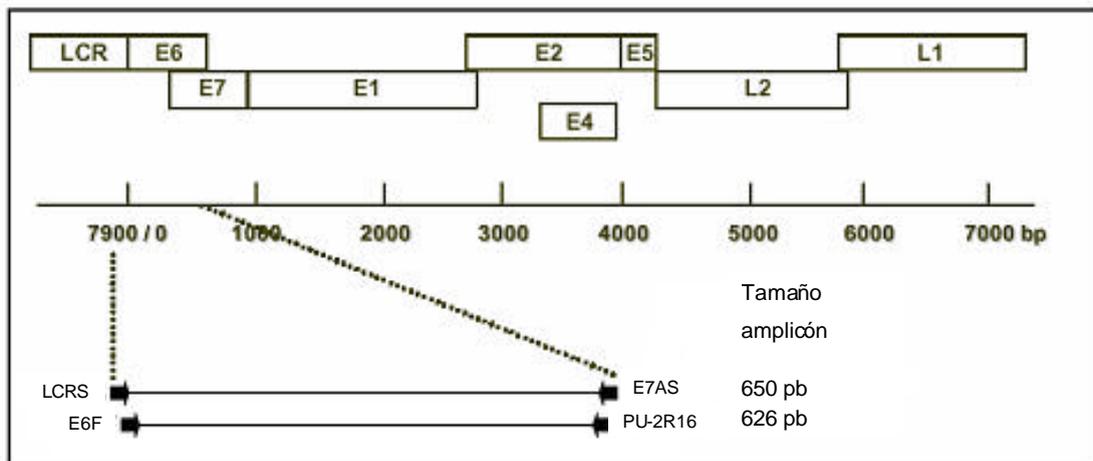


Fig. 4. Productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos LCRS/E7AS y E6F/PU-2R16. (Modificado de Martínez-Contreras, 2005).

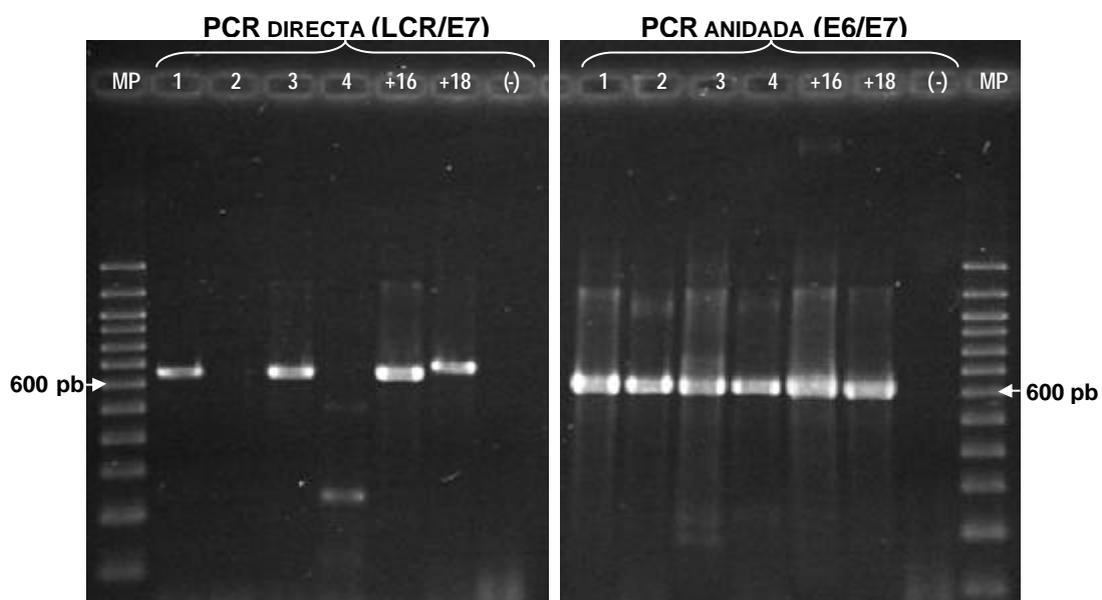


Fig. 5. Amplificación por PCR directa del producto LCR/E7 de ~650 pb y anidada del producto E6/E7 de ~626 pb a partir de cuatro muestras cervicales HPV16-positivas (1 a 4) y dos controles positivos (+16 y +18). El Control negativo (-) consistió en una mezcla maestra sin DNA. MP, Escalera 100 pb.

	E6	L1:MY09/11	LCR	
	11111111111122222223345	666666666666666666	77777777777777777777	
	033334467788556688893503	92025666035679	88902146788123456888923334	
	912573516838567956955032	51364258418504	59671139089490324167264792	
Ref.	TAGATCGCGTGGCGGCTAICTAA	AGACCTCAATCACG	AGTAGATCAACTAATACTCTCGGAAG	
OR.5110	-----	-----	-----	E-P
OR.4724	-----	-----	---A-----	E-P
OR.6311	-----T-----G--	-----	---A-----	E-P
OR.4997	-----AA-----G--	-----	---A-----	E-P
IS. 645	-----G-----	-----A-----	---A-----	E-m
OR.6170	C-----	-----	-----	E-C109T
OR.8329	C-----G-----	-----	---A-----	E-C109G
OR.9237	-G-----G-----	---C---C---	---A-----	E-G131G
OR.0198	-G-----G-----	---C---	---A-----	E-G131G
IS. 105	-----A-----	-----	-----C-----	E-A176T
IS. 244	-----A-----	-----	---A-----	E-A176T
IS. 463	-----A-----A-----	-----	---A-----	E-A176A
IS. 489	-----A-----G-----	-----	---A-----	E-A176G
IS. 925	-----A-----	---T-----	---A-----	E-A178T
IS.1032	-----A-----	---T-----	---C-A-----	E-A178T
IS. 364	-----C-----	-----	-----	E-C188T
IS. 7	-----C-----G-----	-----	---A-----	E-C188G
OR.7574	-----G-----	-----	---A-----C-----C-----A	As
OR.5428	-----G-----	-----	---A-----C-----	A As
OR.7587	--C--GT-----AG-T--	-A--T-----TA	-A--A-----A-----T-T--T--	Af1-a
OR.1905	--C--GT-----AG-T--	-A--T-----TA	-A--A-----AA-----T-T--T--	Af1-a
IS. 393	--C--GT-----AG-T--G	-A--T-----C--TA	-A--AG-----A-----T-T--T--	Af1-b
IS. 845	-G--GT-----C-----AG-T--	-A--T-----TA	-A--A-----A-----T-T--T--	Af1-c
IS. 398	-G--GT-----AGGTG--	-A--T-----TA	-A--A-----A-----T-T--T--	Af1-d
IS. 838	-G--GT-----AGGTG--	-A--T-----TA	-A--A-----A-----T-T-G-T--	Af1-d
IS. 347	----GTG--T--AGGTG--	-A--T--G--TA	-A--A--T--A-----T-T--T--	Af1-e
OR.7145	C-T--GT-----AG-T-G	CA--T-T--TA	CA--A--T-----T-T--ATCG-	Af2-a
OR.3759	C-T--GT-----AG-T-G	CA--T-T--TA	CA--A--T--A-----T-T--ATCG-	Af2-a
IS. 812	C-T--GT-----AG-T-G	CC--T-T--TA	CA--A--T--A-----T-T--A-CG-	Af2-a
IS. 170	----GT-----AG-T-G	CA--T-T-C--TA	CA--A--T--A-----T-T--ATC--	Af2-b
IS. 808	----GT-----AG-T--	CA--T-T--T-TA	CA--A--T--A-----T-T--ATC--	Af2-b
IS. 846	----GT-----AG-T--	CA--T-T--TA	CA--A--GT--A-----T-T--AATC--	Af2-b
IS. 177	----GT-----AG-T--	CA--T-T--TA	CA--A--T--GA-----T-T--ATC--	Af2-b
IS. 825	----GT-----AG-T--	CA--T-T--TA	CA--A--T--GA-----T-T--ATC--	Af2-b
IS. 830	--C--GT-----AG-T--	CA--T-T--TA	CA--A--GT--A-----T-T--ATC--	Af2-b
IS. 811	----AGT-----GAG-T--	CA--T-T--TA	CA--A--TG-A-----T-T--ATC--	Af2-c
IS. 815	----AGT-----GAG-T--	CA--T-T--TA	CA--A--TG-A-----T-T--ATC--	Af2-c
OR.3136	----T-----AG-TG--	CA--T-T--TA	CA--A--T--A-C--T-T--AT--	NA1
IS. 42	----T-----AG-TG--	CA--T-T--TA	CA--A--T--A-C--T-T--T--	NA1
OR.8160	----T-----AG-TG-G	CAT--T-T--TA	CA--A--T--A-C-G-T-T-----	AA-a
OR.4541	----T-----AG-TG-G	CAT--T-T--TA	CA--A--T--A-C-GCT-T-----	AA-a
IS. 545	----T-A-----AG-TG-G	CAT--T-T--TA	CA--A--T--A-C-G-T-T-----	AA-a
IS. 21	----T-----AG--G-G	C--T-T--TA	CA--A--T--A-C-G-T-T-----	AA-b
IS. 53	----T--G-----AG-TG-G	CA--TCT--TA	CA--GA--T--A-C--T-T-----	AA-c
IS. 111	----T-----AG-TG-G	CA--TCT--TA	CA--GA--T--A-C--T-T-----	AA-c

Fig. 6. Posiciones de los nucleótidos en la secuencia del gen E6 que permiten la identificación de subtipos y variantes de HPV16. En la parte superior se indican el gen y las posiciones de nucleótidos analizadas (en sentido vertical. nótese que no son secuencias consecutivas); Ref. es la variante de referencia europea; IS y OR indican los patrones de variación de la región E6-L1 previos y resultantes, respectivamente, seguidos del número de aislado; la columna derecha indica el subtipo y la variante separados por un guión. (Tomado de Yamada et. al. 1997).

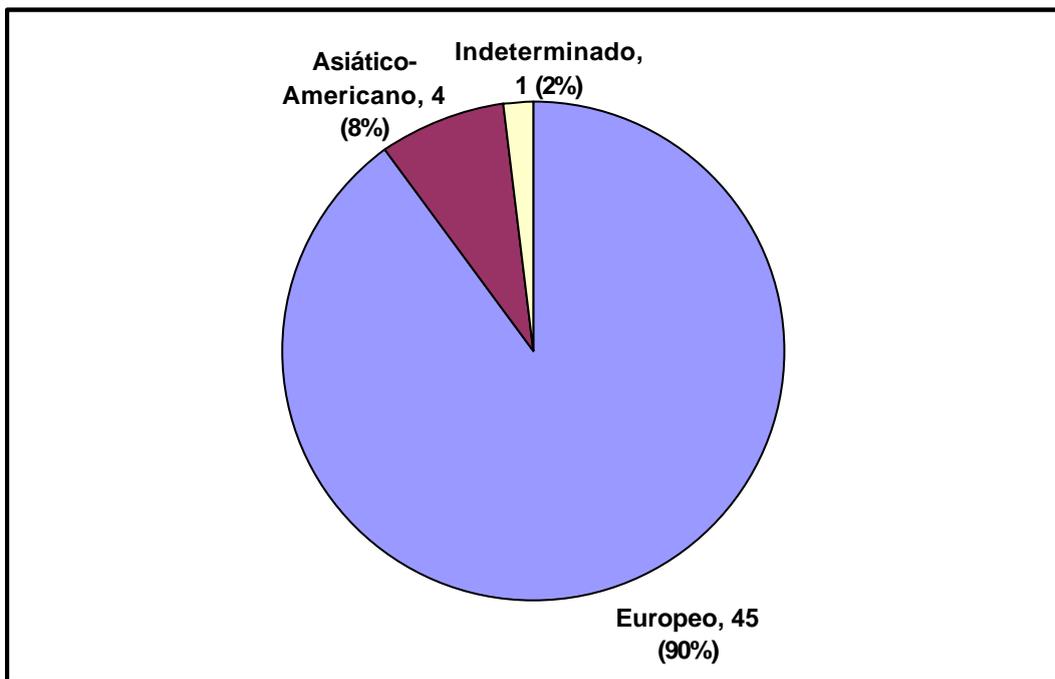


Fig. 7. Subtipos de HPV16 identificados en las 50 muestras secuenciadas en este trabajo. Solamente el subtipo de una muestra no pudo ser identificado (“indeterminado”) por no haberse podido obtener la secuencia completa del gen E6.

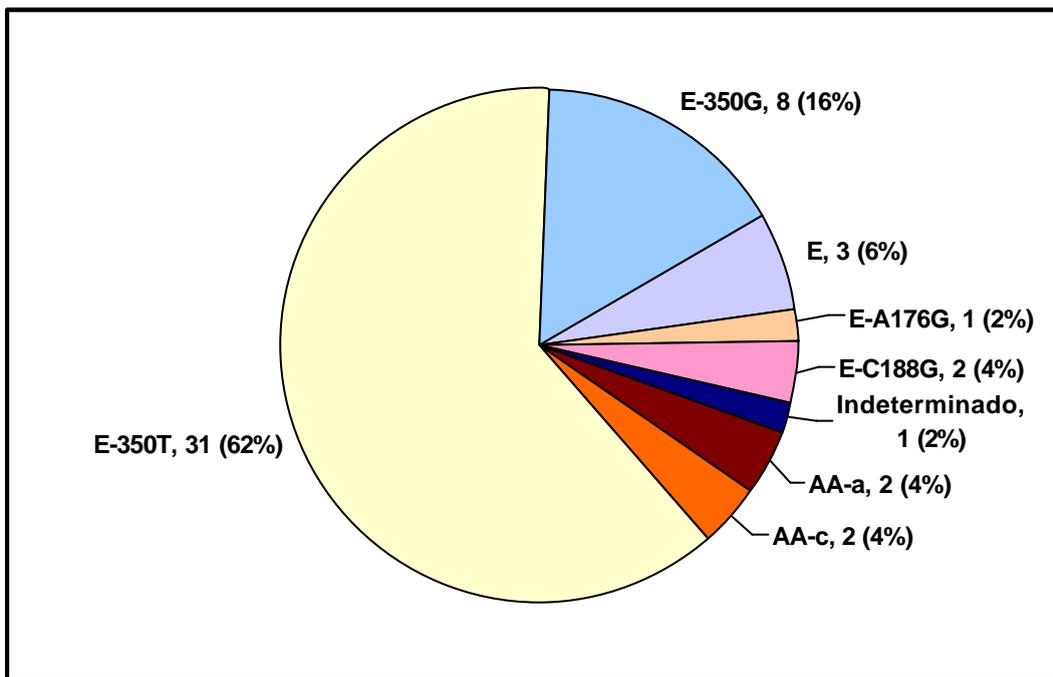


Fig. 8. Variantes de HPV16 identificadas en las 50 muestras secuenciadas en este trabajo. E-350G, variante del subtipo europeo con la sustitución T350G; E-C188G, variante del subtipo europeo con la sustitución C188G; E-A176G, variante del subtipo europeo con la sustitución A176G; E, en tres muestras se determinó el subtipo europeo pero no pudo establecerse la variante por no contar con la secuencia completa del amplicón. En esta figura el subtipo E-P ha sido redesignado como E-350T para poder comparar las variantes identificadas en este trabajo con las descritas por Berumen et al. (2001), mostradas en la Fig. 2.

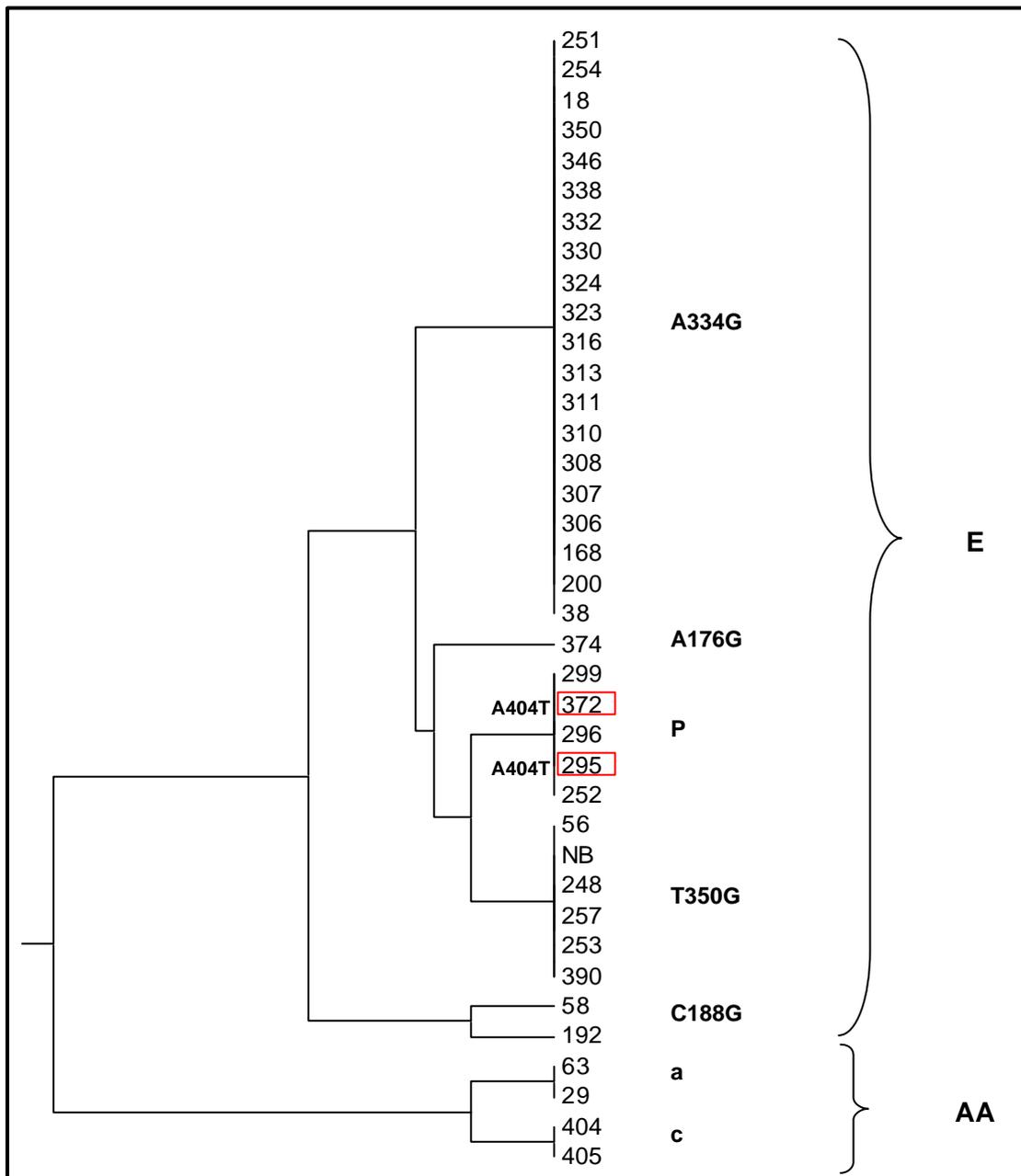


Fig. 9. Árbol filogenético con todas las variantes de HPV16 identificadas a partir de las 38 secuencias completas del ORF E6. La construcción se hizo con el método UPGMA usando el programa MEGA. Los números a la derecha de las ramas indican la identidad de las muestras; las claves en la columna a la derecha de cada grupo de muestras indican los nombres de las variantes identificadas. La columna de la derecha indica el subtipo de HPV16 europeo (E) o Asiático-americano (AA) agrupadas. Los números enmarcados en rojo corresponden a las muestras con la mutación no sinónima A404T agrupadas en la misma rama del subtipo Europeo de referencia (E-P). La mutación A334G se agrupa como una rama independiente.

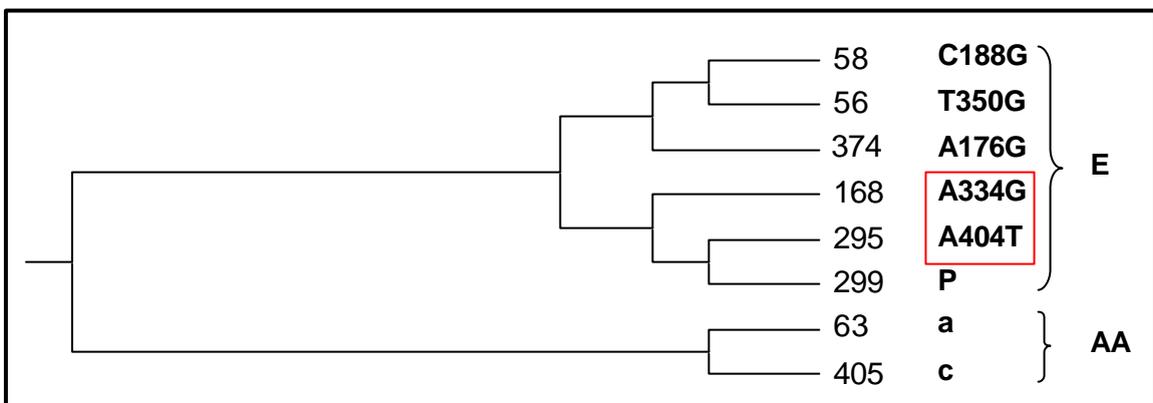


Fig. 10. Árbol filogenético de las variantes de HPV16 identificadas, formado con ocho muestras representativas del ORF E6. Construido con el método UPGMA usando el programa MEGA. Los números a la derecha de cada rama indican la identidad de las muestras representativas; las claves en la columna a la derecha de cada muestra indica el nombre de la variante identificada. La columna de la derecha indica el subtipo de HPV16 europeo (E) o Asiático-americano (AA) al que pertenecen las variantes agrupadas. Las mutaciones A404T y A334G, enmarcadas en rojo, se resuelven como grupos independientes de la secuencia E-P.

ANEXO 1 SECUENCIAS DEL GEN E6 DE LOS SUBTIPOS DE HPV16

(Todas fueron obtenidas de la base de datos de NCBI)

Europeo de referencia (E-P). Clave NC_001526.

1	actacaataa	tccatgtata	aaactaaggg	cgtaaccgaa	atcggttgaa	ccgaaaccgg
61	ttagtataaaa	agcagacatt	ttatgcacca	aaagagaact	gcaatgtttc	aggaccaca
121	ggagcgaccc	agaaagttac	cacagttatg	cacagagctg	caaacaacta	tacatgat
181	aatattagaa	tgtgtgtact	gcaagcaaca	gttactgcga	cgtgaggtat	atgactttgc
241	ttttcgggat	ttatgcatag	tatatagaga	tgggaatcca	tatgctgtat	gtgataaatg
301	tttaaagttt	tattctaaaa	ttagttagta	tagacattat	tggtatagtt	tgtatggaac
361	aacattagaa	cagcaatata	acaaaccggt	gtgtgatttg	ttaattaggt	gtattaactg
421	tcaaaaagcca	ctgtgtcctg	aagaaaagca	aagacatctg	gacaaaaagc	aaagattcca
481	taatataagg	ggtcggtgga	ccggtcgatg	tatgtcttgt	tgcatatcat	caagaacacg
541	tagagaacc	cagctgtaat	c			

Africano 1 (Af-1). Clave AF472508.

1	actacaataa	tccatgtata	aaactaaggg	tgtaaccgaa	atcggttgaa	ccgaaaccgg
61	ttagtataaaa	agcagacatt	ttctgcacca	aaagagaact	gcaatgtttc	aggaccaca
121	ggagcgaccc	acaaagttac	cagatttatg	cacagagctg	caaacaacta	tacatgat
181	aatattagaa	tgtgtgtact	gcaagcaaca	gttactgcga	cgtgaggtat	atgactttgc
241	ttttcgggat	ttatgcatag	tatatagaga	tgggaatcca	tatgctgtat	gtgataaatg
301	tttaaagttt	tattctaaaa	ttagttagta	tagatattat	tggtatagtt	tgtatggaac
361	aacattagaa	cagcaatata	acaaaccggt	gtgtgatttg	ttaattaggt	gtattaactg
421	tcaaaaagcca	ctgtgtcctg	aagaaaagca	aagacatctg	gacaaaaagc	aaagattcca
481	taatataagg	ggtcggtgga	ccggtcgatg	tatgtcttgt	tgcatatcat	caagaacacg
541	tagagaacc	cagctgtaat	c			

Africano 2 (Af-2). Clave AF472509.

1	actacaataa	tccatgtata	aaactaaggg	tgtaaccgaa	atcggttgaa	ccgaaaccgg
61	ttagtataaaa	agcagacatt	ttatgcacca	aaagagaact	gcaatgtttc	aggaccaca
121	ggagcgaccc	ataaagttac	cagatttatg	cacagagctg	caaacaacta	tacatgat
181	aatattagaa	tgtgtgtact	gcaagcaaca	gttactgcga	cgtgaggtat	atgactttgc
241	ttttcgggat	ttatgcatag	tatatagaga	tgggaatcca	tatgctgtat	gtgataaatg
301	tttaaagttt	tattctaaaa	ttagttagta	tagatattat	tggtatagtt	tgtatggaac
361	aacattagaa	cagcaatata	acaaaccggt	gtgtgatttg	ttgattaggt	gtattaactg
421	tcaaaaagcca	ctgtgtcctg	aagaaaagca	aagacatctg	gacaaaaagc	aaagattcca
481	taatataagg	ggtcggtgga	ccggtcgatg	tatgtcttgt	tgcatatcat	caagaacacg
541	tagagaacc	cagctgtaat	c			

Asiático (As). Clave AF534061.

1	actacaataa	tccatgtata	aaattaaggg	cgtaaccgaa	atcggttgaa	ccgaaaccgg
61	ttagtataaaa	agcagacatt	ttatgcacca	aaagagaact	gcaatgtttc	aggaccaca
121	ggagcgaccc	agaaagttac	cacagttatg	cacagagctg	caaacaacta	tacatgat
181	aatattagaa	tgtgtgtact	gcaagcaaca	gttactgcga	cgtgaggtat	atgactttgc
241	ttttcgggat	ttatgcatag	tatatagaga	tgggaatcca	tatgctgtat	gtgataaatg
301	tttaaagttt	tattctaaaa	ttagttagta	tagacattat	tggtatagtt	tgtatggaac
361	aacattagaa	cagcaatata	acaaaccggt	gtgtgatttg	ttaattaggt	gtattaactg
421	tcaaaaagcca	ctgtgtcctg	aagaaaagca	aagacatctg	gacaaaaagc	aaagattcca
481	taatataagg	ggtcggtgga	ccggtcgatg	tatgtcttgt	tgcatatcat	caagaacacg
541	tagagaacc	cagctgtaat	c			

Asiático-americano (AA). Clave AF402678.

1	actacaataa	tccatgtata	aaactaaggg	cgtaaccgaa	atcggttgaa	ccgaaaccgg
61	ttagtataaaa	agcagacatt	ttatgcacca	aaagagaact	gcaatgtttc	aggaccaca
121	ggagcgaccc	agaaagttac	cacatttatg	cacagagctg	caaacaacta	tacatgat
181	aatattagaa	tgtgtgtact	gcaagcaaca	gttactgcga	cgtgaggtat	atgactttgc
241	ttttcgggat	ttatgcatag	tatatagaga	tgggaatcca	tatgctgtat	gtgataaatg
301	tttaaagttt	tattctaaaa	ttagttagta	tagatattat	tggtatagtt	tgtatggaac
361	aacattagaa	cagcaatata	acaaaccggt	gtgtgatttg	ttaattaggt	gtattaactg
421	tcaaaaagcca	ctatgtcctg	aagaaaagca	aagacatctg	gacaaaaagc	aaagattcca
481	taatataagg	ggtcggtgga	ccggtcgatg	tatgtcttgt	tgcatatcat	cgagaacacg
541	tagagaacc	cagctgtaat	c			

ANEXO 2
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA E6-HPV16 DE REFERENCIA

1-23	M	H	Q	K	R	T	A	M	F	Q	D	P	Q	E	R	P	R	K	L	P	Q	L	C	T	E	L	Q	T	T	I
24-53	H	D	I	I	L	E	C	V	Y	C	K	Q	Q	L	L	R	R	E	V	Y	D	F	A	F	R	D	L	C	I	V
54-83	Y	R	D	G	N	P	Y	A	V	C	D	K	C	L	K	F	Y	S	K	I	S	E	Y	R	H	Y	C	Y	S	L
84-113	Y	G	T	T	L	E	Q	Q	Y	N	K	P	L	C	D	L	L	I	R	C	I	N	C	Q	K	P	L	C	P	E
114-143	E	K	Q	R	H	L	D	K	K	Q	R	F	H	N	I	R	G	R	W	T	G	R	C	M	S	C	C	R	S	S
144-173	R	T	R	R	E	T	Q	L	-																					

El codón de inicio ATG en las posiciones 104-106 del gen E6-HPV16 es considerado el primer aminoácido de la oncoproteína E6 y corresponde al segundo aa Met (señalado en rojo) codificado en la secuencia de dicho gen (Myers et al, 1997).