



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

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Detección e identificación de los tipos 16 y 18 del
virus del papiloma humano por desnaturalización
térmica de los amplicones E6**

Tesis que presenta

Soraya Maricela Méndez Tenorio

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis

Dr. Rubén López-Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., noviembre de 2022



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Detección e identificación de los tipos 16 y 18 del virus del papiloma humano por desnaturalización térmica de los amplicones E6” presentada para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Soraya Maricela Méndez Tenorio y aprobada el 19 de septiembre de 2022 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

Dra. Fabiola Jaimes Miranda
Miembro del Comité Tutorial

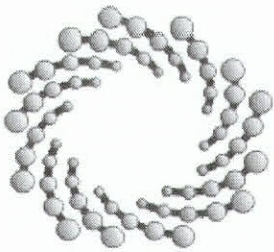
Dr. J. Sergio Casas Flores
Miembro del Comité Tutorial



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 la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 191192) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

La Secretaría Académica del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 239 del Libro Segundo 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 4 días del mes de noviembre del año 2022, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. J. Sergio Casas Flores

Dra. Fabiola Jaimes Miranda

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

Presidente

Secretaria

Sinodal

IPICYT

IPICYT

IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Soraya Maricela Méndez Tenorio

sobre la Tesis intitulada:

Detección e identificación de los tipos 16 y 18 del virus del papiloma humano por desnaturalización térmica de los amplicones E6

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 17:53 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe la Secretaria Académica del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de noviembre de 2022.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Secretaria Académica



IPICYT

SECRETARÍA ACADÉMICA
INSTITUTO POTOSINO DE
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA, A.C.

Dedicatorias

Con amor para mis hijos Luisa Lizette y Santiago, mi esposo Sergio, mi nieta Luciana y mi mamá.

Muchas gracias por siempre estar para mí.

Agradecimientos

Al CONACYT por haberme otorgado una beca y darme la oportunidad y todas las facilidades para realizar la Maestría en Biología Molecular.

Al IPICYT por darme la oportunidad y todas las facilidades para realizar la Maestría.

Al Dr. Rubén López Revilla por sus enseñanzas, su paciencia y su guía para mi aprendizaje, que ha sido más amplio que aprender biología molecular.

A la Biol. Mireya Sánchez Garza por su apoyo técnico y sus enseñanzas en el laboratorio.

A todos los docentes de la División de Biología Molecular que han contribuido a mis conocimientos.

A mis compañeros de la maestría por su amabilidad a la hora de brindarme su apoyo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta del examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Introducción	1
<i>Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano</i>	1
<i>Tamizaje para la detección oportuna del cáncer cervicouterino</i>	2
<i>Detección y genotipificación de VPH</i>	3
Captura de híbridos	3
Genotipificación	3
PCR en tiempo real	6
<i>Justificación</i>	7
<i>Objetivo</i>	7
Material y métodos	8
<i>pHPV16 y pHPV18</i>	8
<i>DNA de raspados cervicales</i>	8

<i>Iniciadores</i>	9
<i>PCR de punto final</i>	9
<i>Electroforesis en geles de agarosa</i>	11
<i>qPCR directa o anidada</i>	11
Resultados	13
<i>PCR de punto final para los amplicones E6 de VPH 16 y 18 con los iniciadores de Dictor y Warenholt (D)</i>	13
<i>qPCR directa y desnaturalización térmica de los amplicones E6 de VPH 16 y 18 generados con iniciadores D</i>	16
<i>Perfiles de desnaturalización del amplicon E6 de VPH 16 generado con los iniciadores D (VPH 16-D) y de VPH 18 generado con los iniciadores de Sotlar (VPH 18-S)</i>	19
<i>qPCR directa y anidada de los amplicones E6 de VPH 18 a partir del raspado cervical APCG con iniciadores VPH 18-D o -S</i>	21
<i>qPCR anidada de APCG con iniciadores VPH 18-S y 40 ciclos de preamplificación / amplificación</i>	23
<i>qPCR anidada de dos raspados cervicales VPH 18 positivos con preamplificación / amplificación por 30/25 ciclos, iniciadores VPH 18-S y annealing a 40 °C en la preamplificación</i>	25
<i>qPCR anidada para VPH 18 del raspado cervical MC18</i>	27
<i>qPCR directa para los amplicones E6 de VPH 16 y 18 en mezclas con pHPV16, pHPV18 y ambos plásmidos</i>	29
<i>Preamplificación y qPCR para el diagnóstico preliminar de infección por VPH</i>	31
Discusión	32
Referencias	36

Anexo 1 Iniciadores para VPH	43
<i>Iniciadores consenso o universales</i>	43
<i>Iniciadores degenerados</i>	43
<i>Iniciadores no degenerados</i>	44
Anexo 2 Amplicones E6 de VPH 16 y 18 de Sotlar et al. (2004)	45
<i>VPH 16 (457 pb; 141-597)</i>	45
<i>VPH 18 (322 pb; 170-491)</i>	45
Anexo 3 Amplicones E6 de VPH 16 y 18 de Dictor y Warenholt (2011)	46
<i>VPH 16 (209 pb; 496-704)</i>	46
<i>VPH 18 (98 pb; 514-611)</i>	46

Lista de tablas

Tabla 1. Longitud de pHPV16 y pHPV18 y copias por nanogramo	8
Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los iniciadores generales GP-E6/E7 (Sotlar et al., 2004)	9
Tabla 3. Secuencias nucleotídicas de las parejas de iniciadores D de Dictor y Warenholt (2011), y S de Sotlar et al. (2004), para VPH 16 y 18	9
Tabla 4. Mezclas de PCR de punto final	10
Tabla 5. Termociclado para PCR de punto final con touchdown en mezclas con iniciadores D	10
Tabla 6. Termociclado para PCR de punto final sin touchdown en mezclas con iniciadores D	10
Tabla 7. Mezclas de qPCR directa o anidada	12
Tabla 8. Termociclado para qPCR directa con iniciadores D o S	12
Tabla 9. Programa de desnaturalización térmica	12
Tabla 10. Programa de termociclado de Dictor y Warenholt (2011) con o sin touchdown	14
Tabla 11. Valores de T _m de los picos principales de los amplicones E6 de VPH 16 y 18 generados en mezclas de qPCR directa con pHPV16, pHPV18 o ambos plásmidos	30

Lista de figuras

Fig. 1. Detección y tipificación de VPH por PCR multiplex anidada (Sotlar et al., 2004)	4
Fig. 2. Electroferograma de la PCR multiplex en infección múltiple (Dictor y Warenholt, 2011)	5
Fig. 3. Electroferograma de mezclas de PCR con pHPV18 e iniciadores VPH 18-D amplificadas 30 ciclos con o sin touchdown	15
Fig. 4. Electroferograma de las mezclas de PCR con pHPV16 o pHPV18 e iniciadores D para VPH 16 o 16 y 18	15
Fig. 5. Amplificación de las mezclas con pHPV16 e iniciadores VPH 16-D	17
Fig. 6. Amplificación de las mezclas con pHPV18 e iniciadores VPH 18-D	17
Fig. 7. Perfiles de desnaturalización térmica de las mezclas con pHPV16 o pHPV18 e iniciadores D para VPH 16 y 18, respectivamente	18
Fig. 8. Perfiles de desnaturalización térmica de las mezclas de qPCR para pHPV16 con la pareja VPH 16-D, o pHPV18 con la pareja VPH 18-S, o con ambas parejas.	20
Fig. 9. qPCR directa o anidada (preamplificación por 30 ciclos con iniciadores GP E6/E7) a partir de 100 ng de DNA de APCG con iniciadores VPH 18-D o -S	22
Fig. 10. Perfiles de desnaturalización térmica de mezclas de qPCR anidada de APCG, amplificadas con iniciadores VPH 18-D o -S	22
Fig. 11. Perfiles de desnaturalización térmica de mezclas de qPCR anidada de APCG sujetas a 40 ciclos de preamplificación / amplificación con iniciadores VPH 18-S o VPH 16/18-S	24
Fig. 12. qPCR anidada de los raspados APCG con los iniciadores VPH 16/18-S, termociclado de Sotlar et al. (2004)	26

Fig. 13. Perfiles de desnaturalización térmica de mezclas de qPCR anidada de APCG sujetas a 30/25 ciclos de preamplificación / amplificación con iniciadores VPH 16/18-S.	26
Fig. 14. Perfiles de desnaturalización térmica de mezclas de qPCR anidada del raspado cervical MC18, con iniciadores VPH 18-S o el coctel VPH 16/18-S y 30 ciclos de preamplificación, annealing a 56 °C o 40 °C, seguidos de 25 ciclos de amplificación anidada	28
Fig. 15. Perfil de desnaturalización de los amplicones E6 generados a partir de mezclas con pHPV16, pHPV18 y ambos plásmidos	30
Fig. 16. qPCR de mezclas con DNA de APCG e iniciadores GP E6/E7	31
Fig. 17. Algoritmo para la identificación de VPH 16 y 18 por desnaturalización térmica de los productos de qPCR dúplex anidada en presencia de EvaGreen	34

Resumen

Detección e identificación de los tipos 16 y 18 del virus del papiloma humano por desnaturalización térmica de los amplicones E6

En este trabajo exploramos la posibilidad de identificar los genotipos 16 y 18 del virus del papiloma humano (VPH) por los perfiles de desnaturalización térmica de los amplicones del oncogén E6 generados por PCR en tiempo real (qPCR) anidada en presencia de EvaGreen, mediante preamplificación con los iniciadores consenso GP E6/E7 de Sotlar et al. (2004), seguida de amplificación con parejas de iniciadores tipo-específicos de Sotlar et al. 'S', o de Dictor y Wahrenholt (2011) 'D'. Mediante PCR de punto final establecimos las condiciones para generar los amplicones E6 con iniciadores S tipo-específicos a partir de los plásmidos pHPV16 y pHPV18. Los valores de T_m en los perfiles de desnaturalización térmica de los amplicones de VPH 16 y 18 generados por qPCR directa con los iniciadores D fueron 84.2 °C y 84.3 °C y con los iniciadores S fueron 83.5 °C y 81.5 °C, respectivamente. En mezclas de qPCR directa y anidada con DNA del raspado cervical APCG (VPH 18 positivo) se mantuvo el valor de T_m del amplicón y en la qPCR anidada el rendimiento fue mayor, pero máximo con los iniciadores S. El perfil de desnaturalización térmica de los productos de qPCR directa en la mezcla con pHPV16 y pHPV18 dio un pico único, intermedio entre los de VPH 16 y 18. Concluimos que los iniciadores S y D para VPH 16 y 18 individuales o mezclados generan los amplicones E6 esperados, pero los dos genotipos pueden distinguirse por su perfil de desnaturalización térmica solamente en mezclas con iniciadores VPH 16-D/18-S o VPH 16-S/18-S. La preamplificación de raspados cervicales con iniciadores GP E6/E7 podría usarse como prueba preliminar de infección, porque daría una señal de fluorescencia mayor que el control sin DNA.

Palabras clave: Virus del papiloma humano, VPH 16, VPH 18, genotipificación, PCR en tiempo real anidada, desnaturalización térmica, EvaGreen.

Abstract

Detection and identification of human papillomavirus types 16 and 18 by thermal denaturation of E6 amplicons

In this work we explored the possibility of identifying human papillomavirus (HPV) genotypes 16 and 18 through the thermal denaturation profiles of their E6 oncogene amplicons generated by nested real-time PCR (qPCR) in the presence of EvaGreen. Pre-amplification was performed with the GP E6/E7 consensus primers of Sotlar et al. (2004), followed by amplification with the type-specific primer pairs 'S' from Sotlar et al., or 'D' from Dictor and Warenholt (2011). Using endpoint PCR, we established the conditions to generate E6 amplicons with S-type-specific primers from plasmids pHPV16 and pHPV18; T_m values in the thermal denaturation profiles of the HPV 16 and 18 amplicons generated by direct qPCR with D primers were 84.2 °C and 84.3 °C and with S primers 83.5 °C and 81.5 °C, respectively. In direct and nested qPCR mixtures with DNA from the APCG cervical scraping (HPV 18 positive), the T_m value of the amplicon was the same, but the yield was higher in nested qPCR and highest with S primers. The thermal denaturation profile of the direct qPCR products in the mixture with pHPV16 and pHPV18 gave a single peak, intermediate between those of HPV 16 and 18. We conclude that individual or mixed S and D primers for HPV 16 and 18 generate the expected E6 amplicons. However, the two genotypes can be distinguished by their thermal denaturation profile only in mixtures with HPV 16-D/18-S or HPV 16-S/18-S primers. Pre-amplification of cervical scrapings with GP E6/E7 primers could be used as a preliminary test for infection because it would give a higher fluorescence signal than the control without DNA.

Keywords: Human papillomavirus, HPV 16, HPV 18, genotyping, nested real-time PCR, thermal denaturation, EvaGreen.

.

Introducción

Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano

Los virus del papiloma humano (VPH) son virus epiteliotrópicos que causan tumores benignos y malignos entre los cuales destaca el cáncer cervicouterino (CC). Los VPH son virus sin envoltura, con cápside icosaédrica formada por 72 capsómeros y genoma de DNA circular de cadena doble con cerca de 8,000 pares de bases que codifican seis genes tempranos (E, por *early* en inglés) y dos genes tardíos (L, por *late* en inglés). Los VPH pertenecen a la familia Papillomaviridae y su clasificación se basa en la secuencia del marco de lectura abierto del gen L1, altamente conservado, que codifica la principal proteína estructural de los viriones (zur Hausen 1996; Bernard et al 2010).

Los genomas de los diferentes tipos de VPH son designados con números y están formado por tres regiones. La región temprana incluye seis genes que codifican proteínas no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) entre las que destacan las oncoproteínas E6 y E7, asociadas a la transformación neoplásica. La región tardía codifica las dos proteínas estructurales L1 y L2 que forman la cápside de los viriones. La región larga de control se encuentra entre el final de la región L y el principio de la región E; es no codificante y regula la replicación y la transcripción de todos sus genes (Burd 2016; zur Hausen 1996; de Villiers et al. 2004).

El CC invasor es la cuarta causa de muerte por cáncer entre las mujeres del mundo, especialmente en los países menos desarrollados. Cada minuto muere una mujer por CC en alguna parte del mundo. En México la tasa nacional de mortalidad por CC en 202 fue de 14.63 defunciones por 100,000 mujeres de 25 o más años y segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres, después del cáncer de mama; en el estado de San Luis Potosí la tasa de mortalidad por CC en 2020 fue de 13.85, ligeramente menor a la tasa nacional (InMujeres, 2022).

Los tipos de VPH presentes y persistentes en el epitelio del cuello uterino son la causa de prácticamente todos los casos de cáncer cervicouterino. Hay 40 tipos de VPH anogenitales que se transmiten por contacto sexual. Los 14 tipos asociados a CC invasor y a cáncer de vagina, vulva, pene, piel, orofaringe, esófago y ano se consideran de alto riesgo (VPH-AR). Los tipos de bajo riesgo (VPH-BR) se asocian a tumores benignos como condilomas, verrugas y papilomas (Liyange et al., 2013; Walboomers et al., 1999).

El genotipo viral y la persistencia de la infección son los dos factores más relevantes para la progresión neoplásica de la infección inicial por VPH-AR, que avanza desde las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL, NIC1) a las de alto grado (HSIL, NIC2/3) y al cáncer invasor (Bonde et al., 2020).

Tamizaje para la detección oportuna del cáncer cervicouterino

En México la prueba de tamizaje para CC incluye el análisis citológico de los raspados cervicales ('Papanicolaou') y la detección de VPH. Se realizan a toda mujer que haya tenido relaciones sexuales. El Papanicolaou a mujeres de 25 a 34 años, que en caso de ser normal por 2 años consecutivos debe seguir realizándose cada 3 años. La detección de VPH a mujeres de 35 a 64 años que en caso de resultar negativa debe repetirse cada 5 años y en caso de ser positiva debe complementarse con el Papanicolaou (CENETEC, 2018).

El tamizaje para DNA de VPH-AR es más sensible que la citología para detectar neoplasias intraepiteliales del cérvix (NIC) de bajo grado, por lo que protege mejor del CC que el Papanicolaou y también sirve para el triaje de pacientes con citología equívoca, para el seguimiento postratamiento y para el monitoreo de la eficacia de las vacunas contra VPH. Australia y Holanda ya han hecho la transición de la citología a pruebas de VPH-AR para el tamizaje de CC (Valenčak et al., 2020).

Detección y genotipificación de VPH

La presencia de VPH puede inferirse por hallazgos clínicos y morfológicos, pero el diagnóstico preciso es molecular. Hay más de 254 ensayos cuyos blancos son los genes L1 (el más frecuente), E6, E7 y E1 (Qu et al., 1997). La PCR es el estándar de oro para la detección y genotipificación de VPH con diferentes tipos de iniciadores (Abreu et al., 2012).

Captura de híbridos

Es un método de hibridación molecular en el que el DNA del VPH es desnaturalizado y en forma monocatenaria hibrida con una mezcla de sondas de RNA específicas para VPH de alto riesgo. Los híbridos RNA-DNA son capturados en la superficie de una placa de microtitulación recubierta por anticuerpos anti híbridos. Los híbridos inmovilizados se detectan con la adición de anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina seguida de la adición de un sustrato quimioluminiscente que emite luz a medida que es hidrolizado por la fosfatasa alcalina. Un luminómetro mide de forma semicuantitativa la emisión de luz como unidades relativas de luz (RLU). Este método detecta diversos tipos de VPH, pero no los identifica individualmente (Arney y Bennett, 2010; Clavel et al., 1998).

Genotipificación

La genotipificación de los 14 tipos de VPH anogenitales de alto riesgo puede ser limitada, extensa o completa. En la limitada se identifican solamente VPH 16 y 18 de forma individual y los 12 tipos restantes se detectan en un solo grupo. La genotipificación extensa detecta individualmente seis genotipos y los ocho restantes en un solo grupo. La completa identifica cada tipo individual (Bonde et al., 2020).

Sotlar et al. (2004) desarrollaron un método para la identificación de 19 tipos de VPH (13 de alto riesgo, seis de bajo riesgo) mediante PCR multiplex anidada de punto final basada en la preamplificación del ORF E6 con iniciadores generales, seguida de amplificación tipo-específica con cuatro cocteles de iniciadores. La electroforesis en geles de agarosa de los amplicones generados en cada coctel permite identificar los genotipos por el tamaño de los amplicones. La Figura 1 muestra la organización

de los genes linealizados de VPH; la región LCR se localiza entre L1 y E6; los iniciadores GP E6/E7 amplifican principalmente el gen E6; los iniciadores My 11/09, GP5+/6+ amplifican el gen L1

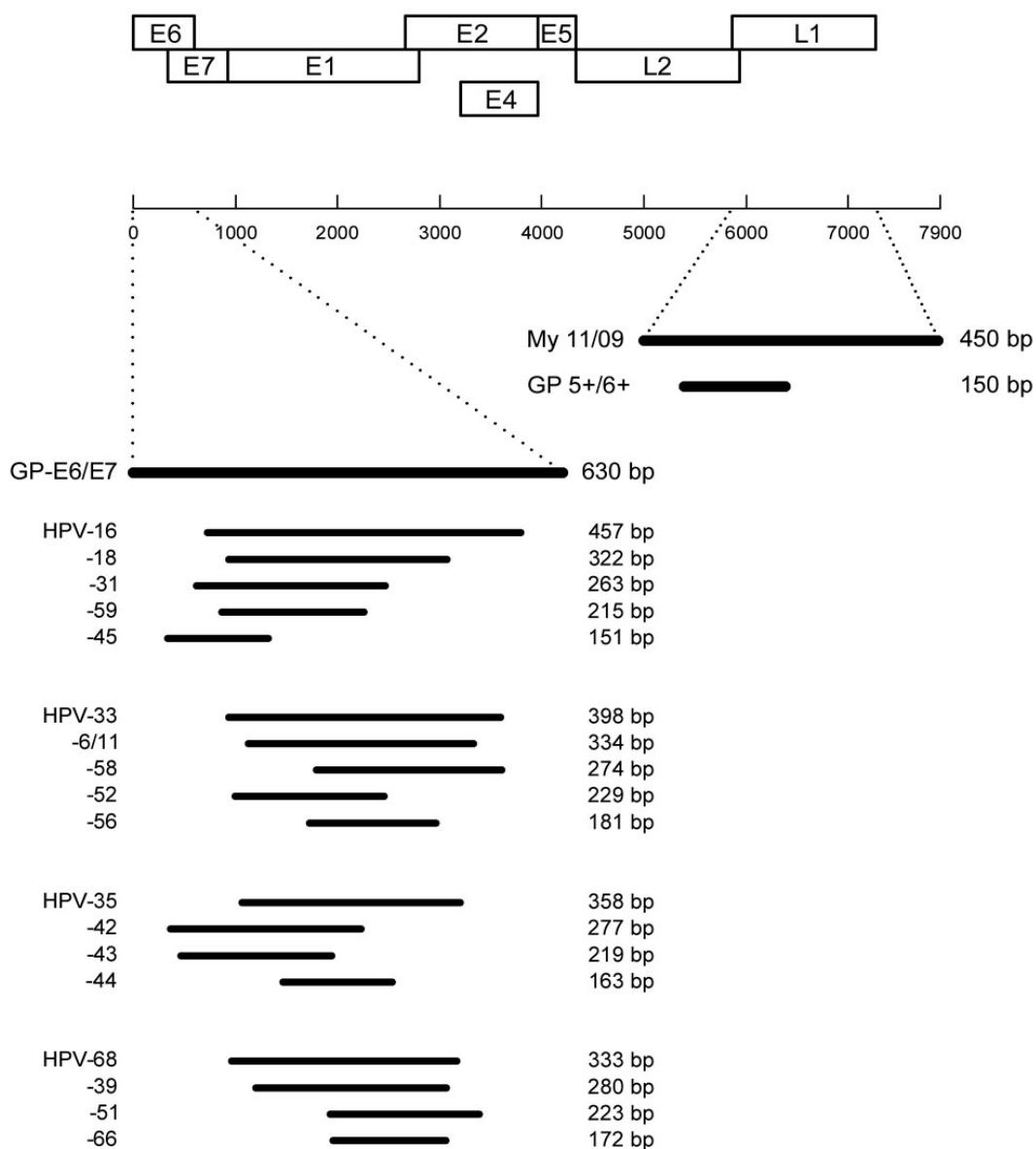


Fig. 1. Detección y tipificación de VPH por PCR multiplex anidada (Sotlar et al., 2004)

Diagrama de las posiciones y tamaño de los amplicones en el genoma de VPH 16. Los iniciadores de PCR anidada tipo específicos están organizados en cuatro cocteles.

Por su parte, Dictor y Warenholt (2011) desarrollaron un método de PCR multiplex en un solo tubo para la amplificación de segmentos del ORF E6 de 21 genotipos de VPH (dos de bajo riesgo, 19 de alto riesgo) con iniciadores fluorescentes tipo-específicos e identificaron los amplicones resultantes por su tamaño en electroforesis capilar de alta resolución (Fig. 2).

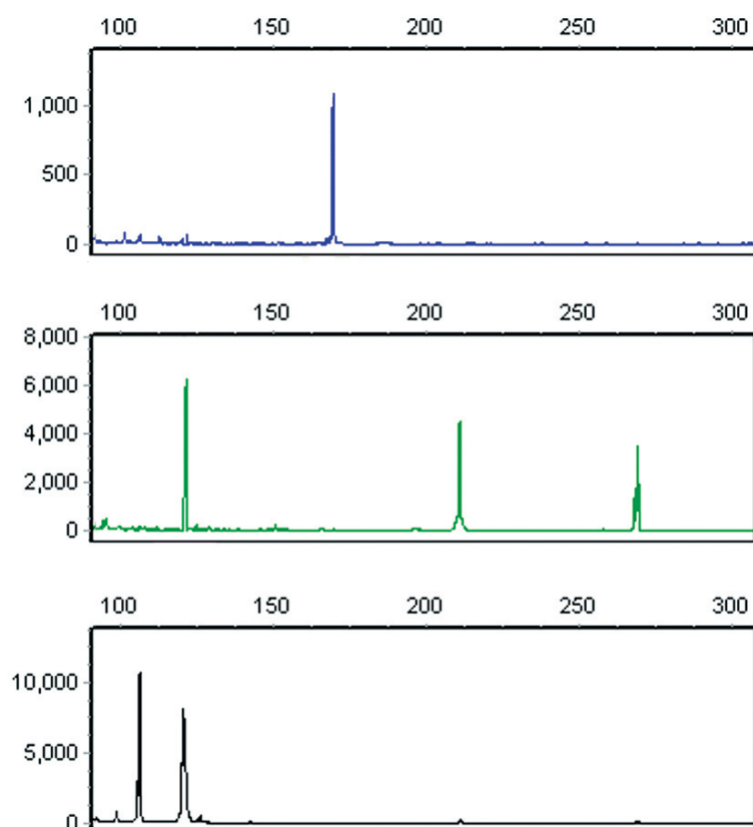


Fig. 2. Electroferograma de la PCR multiplex en infección múltiple (Dictor y Warenholt, 2011)

Electroferograma autoescalado de una sola muestra NIC 3 con amplicones E6 de VPH 16, 31, 45, 59 y 66 resuelto en tres paneles, cada uno representando un canal de color separado. El eje horizontal indica el tamaño del producto en nucleótidos (nt) y el vertical la intensidad de la fluorescencia en unidades arbitrarias. El panel superior contiene un solo pico azul (169 nt) correspondiente a VPH 59. En el panel central, los picos verdes (121, 210 y 268 nt) confirman VPH 31, 16 y el control de β -globina, respectivamente. El pico negro del panel inferior (106 nt) indica VPH 45 y el segundo pico (121 nt) coincide con VPH 66. En el electroferograma de rutina con canales compuestos los picos de los tipos 31 y 66 se superponen, pero se identifican fácilmente por su color.

PCR en tiempo real

Los blancos de los oligonucleótidos iniciadores para VPH son secuencias específicas para un solo genotipo. Algunos están diseñados para amplificar regiones de los ORF E6 o E7 y no son afectados por la integración viral debido a que los oncogenes son necesarios para mantener la transformación neoplásica. Una variación en la secuencia blanco puede causar un resultado falso negativo, e identificar cada genotipo requiere bastante DNA y es muy laborioso (Brink et al., 2007).

Pueden emplearse múltiples parejas de iniciadores tipo-específicos combinados en una sola mezcla de PCR para obtener la amplificación simultánea de múltiples ORFs para cada tipo de VPH. Esto disminuye la probabilidad de falsos negativos asociados a variantes genéticas o a la integración del DNA viral al genoma del huésped, así como el riesgo de falsos positivos de un grupo definido de VPH (Gautam et al., 2019; Karlsen et al., 1996).

Las curvas de desnaturalización térmica de los productos de PCR son generadas por la caída de la fluorescencia al aumentar la temperatura y los perfiles de desnaturalización térmica (“melting”) resultan de la derivada negativa de la curva de caída de la fluorescencia. El análisis de los picos de los perfiles de desnaturalización puede servir para identificar diferentes amplicones (Khan et al., 2011). Los productos espurios usualmente se desnaturalizan a temperaturas menores e incrementan al aumentar el número de ciclos (Pryor y Wittwer, 2006). La molécula fluorescente intercalante EvaGreen supera a SYBR Green, molécula de naturaleza similar, para la PCR en tiempo real debido a que se puede usar en un rango mayor de concentraciones sin afectar negativamente la reacción de PCR; esto permite una cuantificación más precisa y al generar picos más altos y nítidos genera curvas de fusión de mayor resolución (Eischeid 2011). Ha sido usado ampliamente en nuestro laboratorio en estudios de VPH y tuberculosis (Domínguez-Zepahua et al., 2018; Hernández-Arteaga y López-Revilla, 2008).

Para determinar la carga de VPH 16, Hernández-Arteaga y López-Revilla (2008) cuantificaron los amplicones E6 de VPH 16 mediante qPCR en presencia de EvaGreen. Luego desarrollaron un método de qPCR anidada con 15 ciclos de preamplificación y 35 ciclos de amplificación con el cual cuantificaron las secuencias del oncogén E6 y encontraron que la detección de VPH 16 es 10,750 veces más sensible por qPCR anidada que por qPCR directa (Hernández-Arteaga y López-Revilla, 2010).

Justificación

Los VPH causan prácticamente todos los casos de CC, por lo cual es relevante detectar la presencia de los genotipos de alto riesgo, principalmente VPH 16 y 18 (asociados al 70% de los casos de CC en el mundo) en las muestras cervicales de forma específica, sensible, rápida y económica.

La PCR en tiempo real anidada en presencia de EvaGreen dirigida al marco de lectura abierto del oncogén E6 de VPH 16 y 18 para identificar ambos genotipos por sus perfiles de desnaturalización térmica sería menos laboriosa, más rápida y más barata que la identificación con la PCR multiplex anidada seguida de electroforesis en geles de agarosa de Sotlar et al. (2004) o que la PCR en tiempo real multiplex seguida de electroforesis capilar de Dictor y Wahrenholt (2011).

Objetivo

Desarrollar un método de PCR en tiempo real (qPCR) dúplex en presencia de EvaGreen para identificar los tipos de VPH 16 y 18 en muestras de DNA de raspados de cérvix por los perfiles de desnaturalización térmica de los amplicones E6 tipo-específicos.

Material y métodos

pHPV16 y pHPV18

Ambos plásmidos fueron donados por el Dr. Alejandro García Carrancá (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) y luego propagados y purificados en nuestro laboratorio. pHPV16 tiene 12,267 pares de bases (pb): 4,361 pb del vector pbR322 (Watson 1988) y 7,906 pb del genoma completo de VPH 16 (Chen et al., 2015); pHPV18 tiene 12,218 pb: las del vector pbR322 y 7,857 pb el genoma completo de VPH 18 (Chen et al., 2015). Con el espectrofotómetro Epoch (BioTek Instruments, Vermont, EE. UU.) determinamos la densidad óptica a 260 (A_{260}) y 280 nm (A_{280}); valores de pHPV16: $A_{260} = 0.300$, $A_{280} = 0.017$, $A_{260}/A_{280} = 1.9$; valores de pHPV18: $A_{260} = 0.600$, $A_{280} = 0.030$, $A_{260}/A_{280} = 2.0$. Con el calculador de Staroscik (2004) estimamos el número de copias por ng de cada plásmido (Tabla 1).

Tabla 1. Longitud de pHPV16 y pHPV18 y copias por nanogramo

Plásmido	Longitud (pb)			Copias/ng
	Vector	Genoma viral	Total	
pHPV16	4,361	7,906	12,267	7.55×10^7
pHPV18	4,361	7,857	12,218	7.58×10^7

DNA de raspados cervicales

La Ing. Mariana Azanza purificó el DNA de los raspados cervicales APCG y MC 18-1 y diagnosticó la infección por VPH 18 en ambos con el método de PCR multiplex anidada de Sotlar et al. (2004). Valores de APCG: $A_{260} = 0.100$, $A_{280} = 0.060$, $A_{260}/A_{280} = 1.73$. Valores de MC 18-1: $A_{260} = 0.400$, $A_{280} = 0.200$, $A_{260}/A_{280} = 1.84$.

Iniciadores

Los iniciadores generales GP-E6/E7 (Sotlar et al., 2004) y los iniciadores específicos para los amplicones E6 de VPH 16 y 18, D (Dictor y Warenholt, 2011) y S (Sotlar et al., 2004), fueron sintetizados y provistos por T4 Oligo (México). Sus secuencias nucleotídicas se detallan en las tablas 2 y 3. Sus valores de temperatura de desnaturalización (T_m) se calcularon con una herramienta en línea (EndMemo, 2020). Las soluciones madre de cada iniciador (100 μ M) se prepararon en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), a partir de los iniciadores liofilizados.

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los iniciadores generales GP-E6/E7 (Sotlar et al., 2004)

Iniciador	Secuencia
GP-E6-3F	5'-GGGWGKKACTGAAATCGGT-3'
GP-E7-5B	5'-CTGAGCTGTCARNTAATTGCTCA-3'
GP-E7-6B	5'-TCCTCTGAGTYGYCTAATTGCTC-3'

Tabla 3. Secuencias nucleotídicas de las parejas de iniciadores D de Dictor y Warenholt (2011), y S de Sotlar et al. (2004), para VPH 16 y 18

VPH	Pareja	Polaridad	Secuencia
16	D	Forward	5'-GTGGACCGGTCGATGTATGTCT-3'
		Reverse	5'-TCCGGTTCTGCTTGTCCAGC-3'
	S	Forward	5'-CACAGTTATGCACAGAGCTGC-3'
		Reverse	5'-CATATATTCATGCAATGTAGGTGTA-3'
18	D	Forward	5'-AGTGCCATTCGTGCTGCAAC-3'
		Reverse	5'-ATGTTGCCTTAGGTCCATGCAT-3'
	S	Forward	5'-CACTTCACTGCAAGACATAGA-3'
		Reverse	5'-GTTGTGAAATCGTCGTTTTTCA-3'

PCR de punto final

La composición de las mezclas de PCR de punto final se detalla en la Tabla 4 y los programas de termociclado correspondientes en las tablas 5 y 6.

Tabla 4. Mezclas de PCR de punto final

Componente	μL	Concentración
Agua	19	--
Buffer PCR 10× ^a	2.5	1×
dNTP (10 mM c/u)	0.5	200 nM c/u
Pareja de iniciadores (10 μM c/u)	1	400 nM
Taq DNA polimerasa (1 U/μL)	1	1 U/25 μL
DNA (pHPV16 y pHPV18)	1	20 ng/μL

^a Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, pH 8.0.

Tabla 5. Termociclado para PCR de punto final con touchdown en mezclas con iniciadores D

Etapa	Ciclos 1-8 a		Ciclos 9-30	
	°C	Tiempo	°C	t
Desnaturalización inicial	95	15 min	95	7 min
Desnaturalización	95	30 s	95	30 s
Alineamiento	65-57.5 ^a	90 s	57.5	90 s
Extensión	72	45 s	72	45 s
Extensión final			68	15 min
Conservación			25	∞

^a Ciclos 1-8 (touchdown), alineamiento a partir de 65 °C; 1 °C menos por ciclo. Ciclos 9-30 constantes; alineamiento a 57.5 °C.

Tabla 6. Termociclado para PCR de punto final sin touchdown en mezclas con iniciadores D

Etapa	°C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	7 min	1
Desnaturalización	95	30 s	30
Alineamiento	57	90 s	
Extensión	72	45 s	
Extensión final	68	15 min	
Guardar	25	∞	

Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR de punto final fueron analizados en geles de agarosa (Invitrogen UltraPure) al 2% con borato de sodio (Brody et al., 2004). A cada carril se aplicaron 6 μ L de cada mezcla de PCR y 2 μ L de Orange G 6x. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara Subcell GT (Bio-Rad Mod. 96) a 70 V por 90 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 μ g/mL) por 40 min y visualizados por transiluminación ultravioleta en un fotodocumentador Gel-Chemidoc (Bio-Rad, CA).

qPCR directa o anidada

La composición de las mezclas de PCR en tiempo real (qPCR) directa o anidada se detalla en la Tabla 7; el programa de termociclado en la Tabla 8 y el de desnaturalización térmica en la Tabla 9.

La qPCR directa se llevó a cabo en mezclas con 100 ng de APCG por 30 ciclos, con iniciadores D o S para VPH 18.

La qPCR anidada se llevó a cabo después de la preamplificación con iniciadores GP E6/E7 por 30 ciclos y alineamiento a 57 °C o 40 °C, seguida de 30 ciclos con iniciadores D o S para VPH 18 en una nueva mezcla a la que se añadió 1 μ L de la mezcla de qPCR preamplificada.

Tabla 7. Mezclas de qPCR directa o anidada

Componente	μL	Concentración
Agua	16.5	--
Buffer PCR 10 $\times$ ^a	2.5	1 $\times$
dNTP (10 mM c/u)	0.5	200 nM
Iniciadores ^b	1	200-400 nM
Taq DNA polimerasa (1 U/ μL)	1	0.04 U/ μL
EvaGreen 10 $\times$	2.5	1x
DNA (cervical, pHPV16, pHPV18 o pHPV16/18)	1	

^a Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, pH 8.0.

^b Iniciadores generales (10 mM c/u), pareja VPH 16-S (10 nM); pareja 18-S (10 mM c/u); pareja VPH 16-D (7.5 mM); pareja VPH 18-D (5 mM)

Tabla 8. Termociclado para qPCR directa con iniciadores D o S

Etapas	$^{\circ}\text{C}$	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	7 min	1
Desnaturalización	95	30 s	30
Alineamiento	57	90 s	
Extensión	72	45 s	
Extensión final	68	15 min	
Guardar	25	∞	

Tabla 9. Programa de desnaturalización térmica

Rango de temperatura	67-99 $^{\circ}\text{C}$
Aumento en cada paso	1 $^{\circ}\text{C}$
Tiempo de acondicionamiento pre-melting en el primer paso	90 s
Tiempo de espera en cada paso	5 s

Resultados

PCR de punto final para los amplicones E6 de VPH 16 y 18 con los iniciadores de Dictor y Warenholt (D)

Nos propusimos verificar si las parejas de iniciadores D para VPH 16 o 18, o un coctel con ambas (VPH 16/18), generan los amplicones E6 esperados de VPH 16 (209 pb) y VPH 18 (98 pb) a partir de pHPV16 o pHPV18 mediante amplificación con o sin touchdown.

Utilizamos mezclas de PCR de punto final con 20 ng de pHPV16 o pHPV18 y la pareja de iniciadores D para VPH 16 (500 nM), VPH 18 (800 nM) o ambos (VPH-16/18), sujetas al programa de termociclado de D (8 ciclos de touchdown, 22 ciclos idénticos) o de 30 ciclos idénticos (Tabla 10).

Las mezclas con pHPV18 y la pareja VPH 18-D amplificadas con o sin touchdown generaron una banda de 98 pb (Fig. 3). Mezclas con pHPV16 o pHPV18 y la pareja VPH 16-D o el coctel VPH 16/18-D, amplificadas con touchdown, generaron las bandas de los tamaños esperados para el amplicón VPH 16 (Fig. 4).

Concluimos que los iniciadores D para VPH 16 o VPH 18 solos o combinados generan los amplicones E6 esperados de VPH 16 y 18 mediante PCR de punto final con el programa de termociclado de D, con o sin touchdown.

Con estos resultados positivos decidimos montar la qPCR y la desnaturalización térmica de los amplicones E6 de VPH 16 y 18 generados a partir de pHPV16 y pHPV18 con iniciadores D.

Tabla 10. Programa de termociclado de Dictor y Warenholt (2011) con o sin touchdown

Etapa	Ciclos 1-8 ^a		Ciclos 9-30	
	°C	t	°C	t
Desnaturalización inicial	95	15 min	95	7 min
Desnaturalización	95	30 s	95	30 s
Alineamiento	65	90 s	57.5	90 s
Extensión	72	45 s	72	45 s
Extensión final			68	15 min
Conservación			25	∞

^a La temperatura de alineamiento disminuye 1 °C por ciclo, los ciclos 1-8).

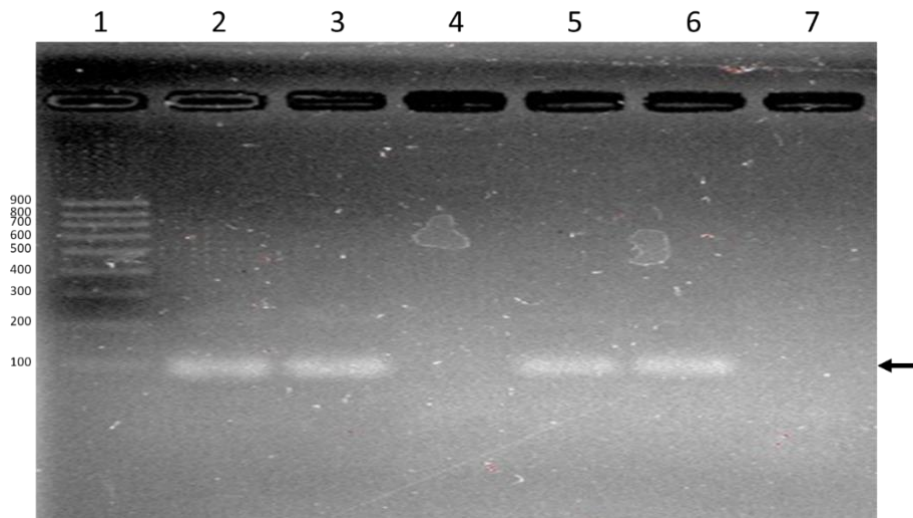


Fig. 3. Electroferograma de mezclas de PCR con pHPV18 e iniciadores VPH 18-D amplificadas 30 ciclos con o sin touchdown

Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, pHPV18-iniciadores VPH 18, touchdown. Carril 3, pHPV18-iniciadores VPH 18, touchdown. Carril 4, Agua. Carril 5, pHPV18-iniciadores VPH 18 sin touchdown. Carril 6, pHPV18-iniciadores VPH 18 sin touchdown. Carril 7, Agua

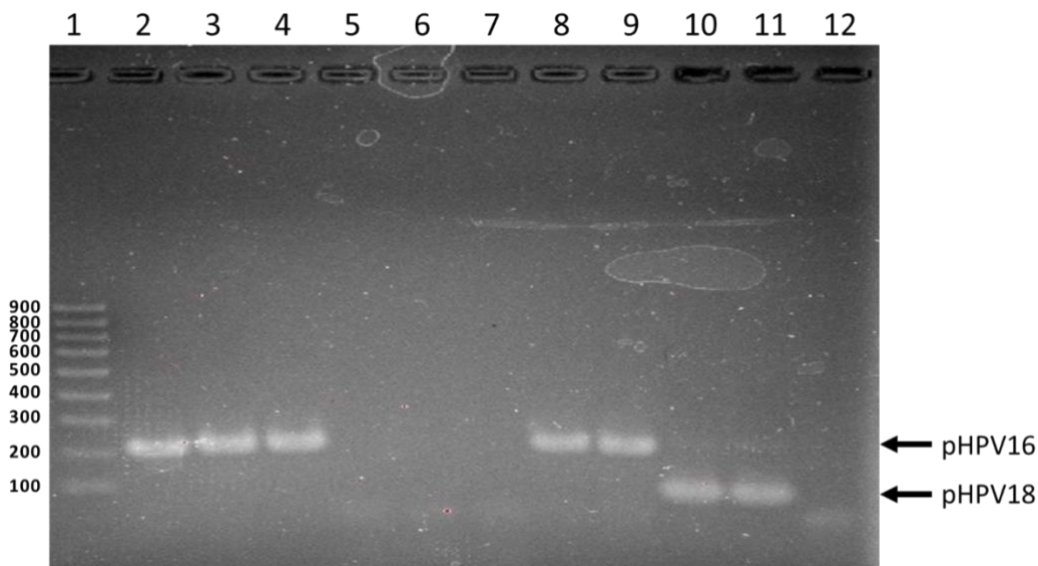


Fig. 4. Electroferograma de las mezclas de PCR con pHPV16 o pHPV18 e iniciadores D para VPH 16 o 16 y 18

Carril 1, Escalera 100 pb. Carriles 2, 3 y 4, pHPV16-iniciadores VPH 16. Carril 5, 6 y 7, Agua. Carriles 8 y 9, pHPV16-iniciadores VPH 16/18. Carriles 10 y 11, pHPV18-iniciadores VPH 16/18. Carril 12, Agua.

qPCR directa y desnaturalización térmica de los amplicones E6 de VPH 16 y 18 generados con iniciadores D

En este experimento probamos si pueden diferenciarse los perfiles de desnaturalización térmica de los amplicones E6 de VPH 16 y 18 generados con las parejas de iniciadores D correspondientes por qPCR tiempo real a partir de pHPV16 y pHPV18.

Empleamos mezclas de qPCR directa por duplicado, con 20 ng de pHPV16 o pHPV18 y las parejas de iniciadores D para VPH 16 (300 nM) o VPH 18 (200 nM), amplificadas por 30 ciclos sin touchdown.

Obtuvimos curvas de amplificación logísticas, asintóticas y reproducibles en las mezclas con pHPV16 (Fig. 5) y pHPV18 (Fig. 6). En la Figura 5 la fase inicial del amplicón de VPH 16 empieza en el ciclo 9, seguida de la fase logarítmica, en el ciclo 19 llega a la fase lineal y alcanza la asíntota en el ciclo 23. En la Figura 6 el amplicón de VPH 18 alcanza la asíntota en el ciclo 21.

Los perfiles de desnaturalización térmica de las mezclas con pHPV16 o pHPV18 fueron reproducibles (Fig. 7). El eje de las x corresponde a la temperatura en grados Celsius y el eje de las y la derivada negativa de la fluorescencia en función de la temperatura. El perfil del amplicón generado a partir de pHPV16 fue simétrico, con un hombro a la izquierda y un pico en 84.2 °C; el de pHPV18 estuvo sesgado a la izquierda con un pico en 84.3 °C.

Concluimos que los genotipos de VPH 16 y 18 no pueden diferenciarse por desnaturalización térmica de los amplicones E6 generados con los iniciadores D, porque la diferencia en sus valores de T_m es casi nula (0.1 °C).

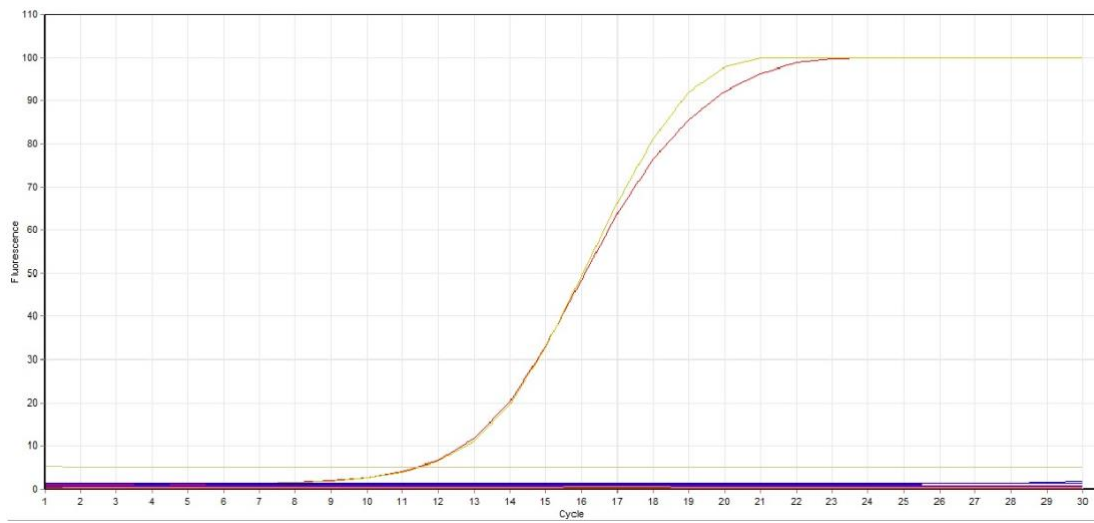


Fig. 5. Amplificación de las mezclas con pHPV16 e iniciadores VPH 16-D

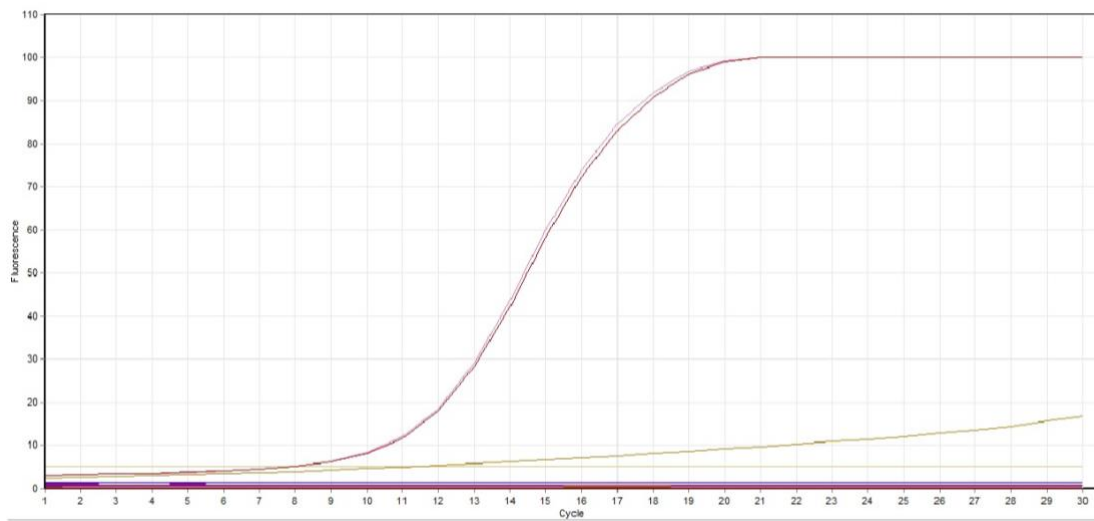


Fig. 6. Amplificación de las mezclas con pHPV18 e iniciadores VPH 18-D

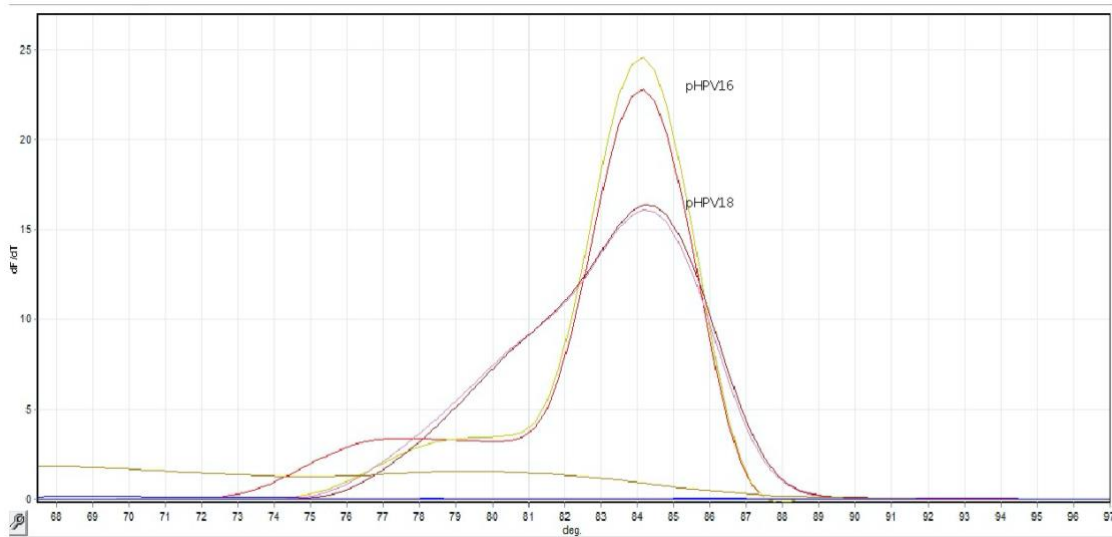


Fig. 7. Perfiles de desnaturalización térmica de las mezclas con pHPV16 o pHPV18 e iniciadores D para VPH 16 y 18, respectivamente

Perfiles de desnaturalización del amplicon E6 de VPH 16 generado con los iniciadores D (VPH 16-D) y de VPH 18 generado con los iniciadores de Sotlar (VPH 18-S)

Para probar si el perfil de desnaturalización térmica del amplicón E6 de VPH 16 generado con la pareja de iniciadores VPH 16-D puede diferenciarse del perfil del amplicón de VPH 18 generado con la pareja de iniciadores VPH 18-S utilizamos mezclas de PCR en tiempo real con 10 ng de pHPV16 o pHPV18 y la pareja VPH 16-D (300 nM), la pareja VPH 18-S (400 nM), o ambas parejas S (400 nM cada una).

Los perfiles de desnaturalización térmica de las mezclas con pHPV16 y pHPV18 fueron simétricos, reproducibles, con picos de T_m en 83.4 °C y 81.5 °C, respectivamente (Fig. 8).

Concluimos que los perfiles de desnaturalización térmica de los amplicones E6 de VPH 16 y 18 generados con las parejas de iniciadores VPH 16-D, VPH 18-S o el coctel VPH 16/18-S, permiten identificar los genotipos de VPH 16 y 18, porque sus valores de T_m difieren 1.9 °C.

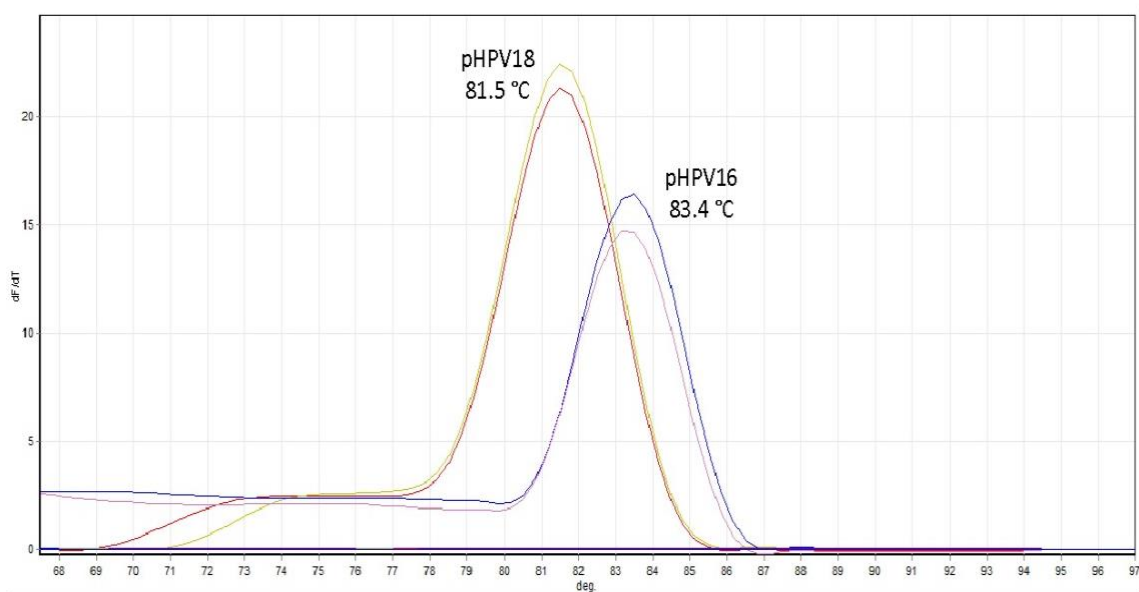


Fig. 8. Perfiles de desnaturalización térmica de las mezclas de qPCR para pHPV16 con la pareja VPH 16-D, o pHPV18 con la pareja VPH 18-S, o con ambas parejas.

qPCR directa y anidada de los amplicones E6 de VPH 18 a partir del raspado cervical APCG con iniciadores VPH 18-D o -S

Comparamos la eficiencia de la PCR en tiempo real (qPCR) directa y anidada de un raspado cervical APCG (VPH 18 positivo) preamplificado con iniciadores GP E6/E7. Las mezclas de qPCR directa fueron amplificadas 30 ciclos a partir de 100 ng de DNA APCG con iniciadores VPH 18-D o -S. Las de qPCR anidada contenían 100 ng de DNA APCG preamplificados 30 ciclos con iniciadores consenso GP E6/E7, seguidos de 30 ciclos con iniciadores VPH 18-D o -S y temperatura de alineamiento de 56 °C.

En la PCR directa los productos de amplificación alcanzaron 5 unidades de fluorescencia relativa (UFR) con los iniciadores D y 10 UFR con los iniciadores S; en la PCR anidada alcanzaron 45 UFR con iniciadores D y 80 UFR con los iniciadores S (Fig. 9).

Los perfiles de desnaturalización generados con iniciadores VPH 18-D y -S fueron simétricos y reproducibles, con picos de T_m de 83.4 °C y 81.5 °C; respectivamente (Fig. 10). El perfil de desnaturalización con iniciadores S alcanzó 18 UFR y con iniciadores D solamente 7 UFR

Por lo tanto, el rendimiento de los amplicones de VPH 18 por qPCR directa y anidada es mayor con iniciadores S. La preamplificación aumenta el rendimiento y podría servir como prueba diagnóstica preliminar.

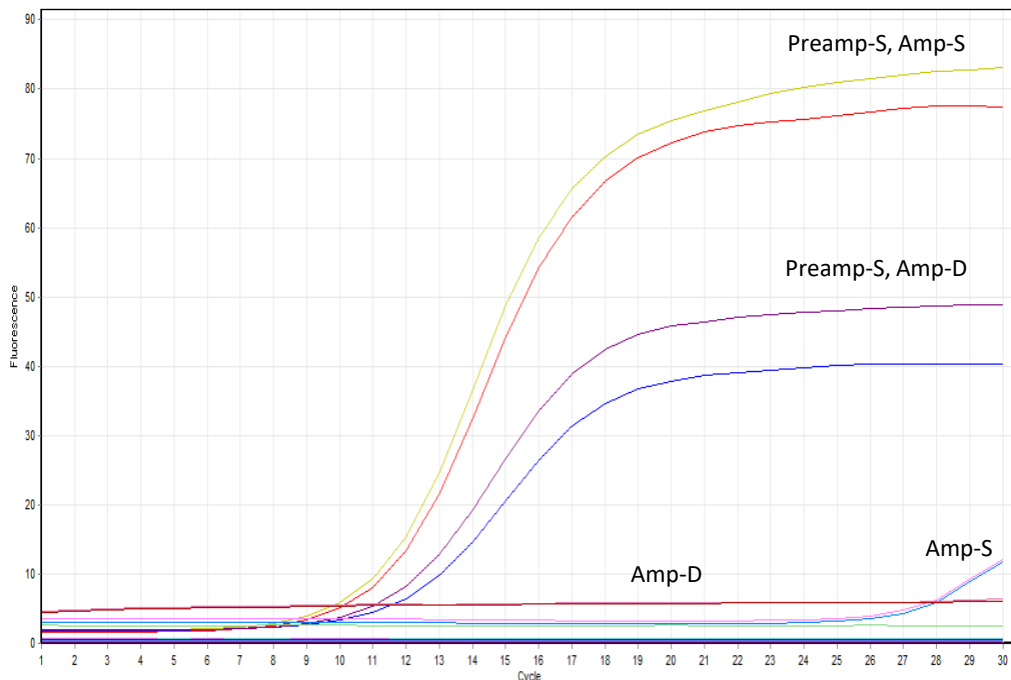


Fig. 9. qPCR directa o anidada (preamplificación por 30 ciclos con iniciadores GP E6/E7) a partir de 100 ng de DNA de APCR con iniciadores VPH 18-D o -S

Preamp-S, preamplificación con iniciadores S. Amp-S, amplificación con iniciadores S. Amp-D, amplificación con iniciadores D.

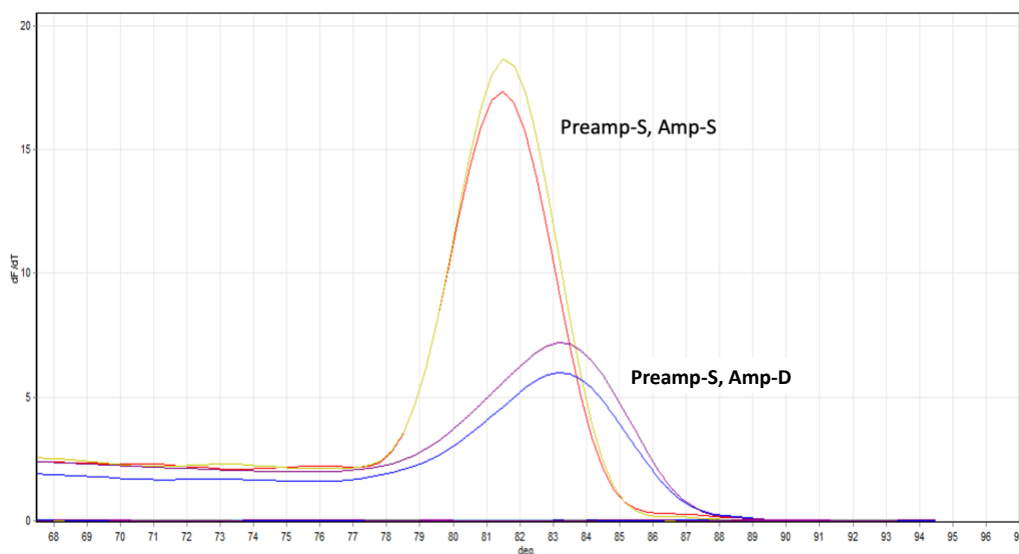


Fig. 10. Perfiles de desnaturalización térmica de mezclas de qPCR anidada de APCR, amplificadas con iniciadores VPH 18-D o -S

Preamp-S, preamplificación con iniciadores S. Amp-S, amplificación con iniciadores S. Amp-D, amplificación con iniciadores D.

qPCR anidada de APCG con iniciadores VPH 18-S y 40 ciclos de preamplificación / amplificación

En este experimento probamos si el aumento a 40 ciclos de preamplificación y de amplificación del raspado cervical APCG en la qPCR anidada con iniciadores VPH 18-S o el coctel VPH 16/18-S mejora el rendimiento y el perfil de desnaturalización.

Las mezclas de qPCR contenían 152 ng de DNA APCG preamplificado 40 ciclos con iniciadores GP E6/E7, seguidas de amplificación anidada por 40 ciclos con iniciadores VPH 18-S o el coctel VPH 16/18-S.

Los amplicones generados con iniciadores de VPH 18-S y el coctel VPH 16/18-S con 40/40 ciclos de preamplificación / amplificación llegaron a 13 UFR en la asíntota, en tanto que en el experimento previo (30/30 ciclos) llegaron a 80 UFR.

Los perfiles de desnaturalización térmica fueron idénticos y reproducibles con los iniciadores VPH 18-S o el coctel VPH 16/18-S, con un pico en 81.6 °C, equivalente al del experimento anterior, pero con un hombro en 87.2 °C (Fig. 11).

Concluimos que el aumento de 30 a 40 ciclos preamplificación / amplificación no aumenta el rendimiento y genera un producto principal con la misma T_m (81.6 °C) pero con un hombro espurio que tiene un valor máximo a 87 °C.

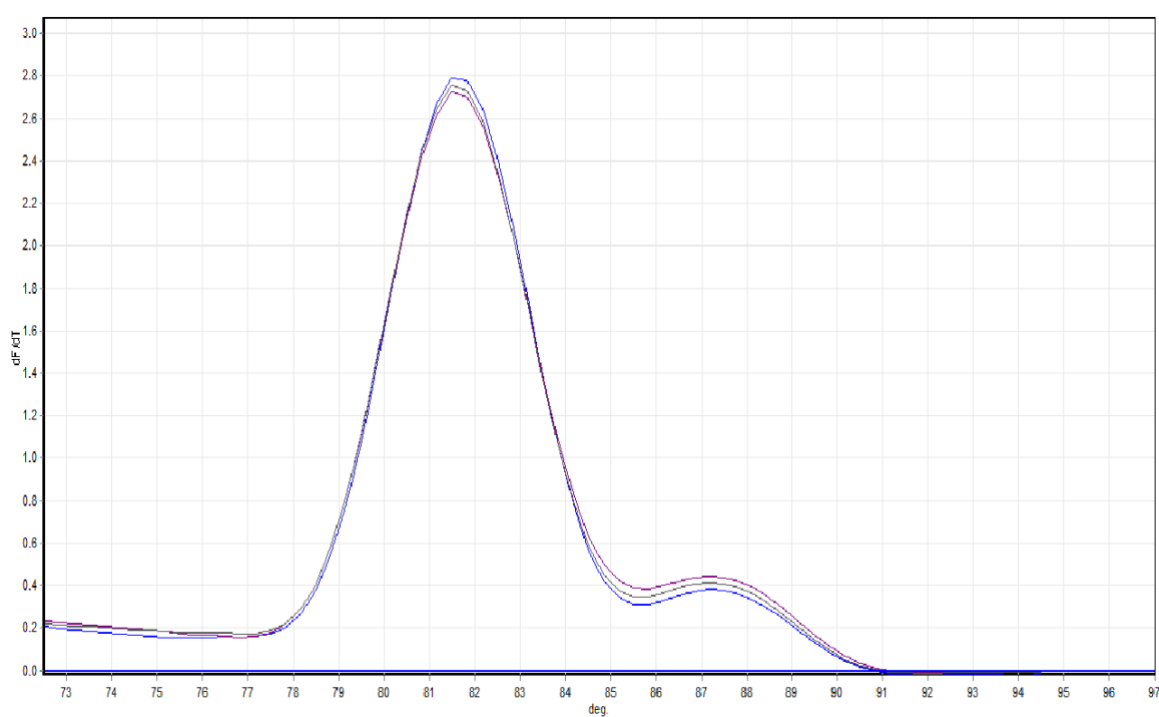


Fig. 11. Perfiles de desnaturalización térmica de mezclas de qPCR anidada de APCG sujetas a 40 ciclos de preamplificación / amplificación con iniciadores VPH 18-S o VPH 16/18-S

qPCR anidada de dos raspados cervicales VPH 18 positivos con preamplificación / amplificación por 30/25 ciclos, iniciadores VPH 18-S y annealing a 40 °C en la preamplificación

En vista de los resultados anteriores, probamos si la disminución simultánea de los ciclos y la temperatura de alineamiento en la preamplificación previene la aparición del hombro del amplicón E6 de VPH 18 en la qPCR anidada del raspado cervical APCG.

Utilizamos mezclas de qPCR anidada con 152 ng de DNA cervical APCG, 30 ciclos de preamplificación con iniciadores GP E6/E7 y 25 ciclos de amplificación anidada con el coctel VPH 16/18-S y alineamiento a 40 °C.

La amplificación de APCG fue asintótica y máxima (100%); la fase inicial ocurrió en el ciclo 6 y en el ciclo 18 alcanzó la asíntota (Fig. 12). El perfil de desnaturalización tuvo un pico principal, único, simétrico y reproducible (81.7 °C, 82.0 °C), sin el hombro observado antes (Fig. 13).

Concluimos que la qPCR anidada con 30/25 ciclos de preamplificación / amplificación genera un amplicón E6 de VPH 18 con perfil de desnaturalización simétrico, sin el producto espurio.

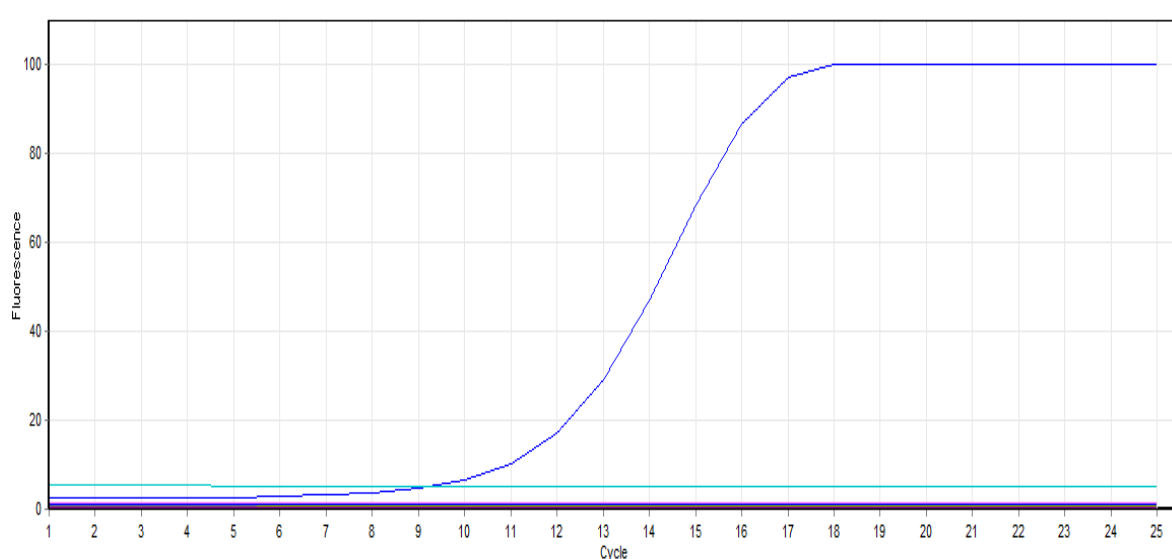


Fig. 12. qPCR anidada de los raspados APCG con los iniciadores VPH 16/18-S, termociclado de Sotlar et al. (2004)

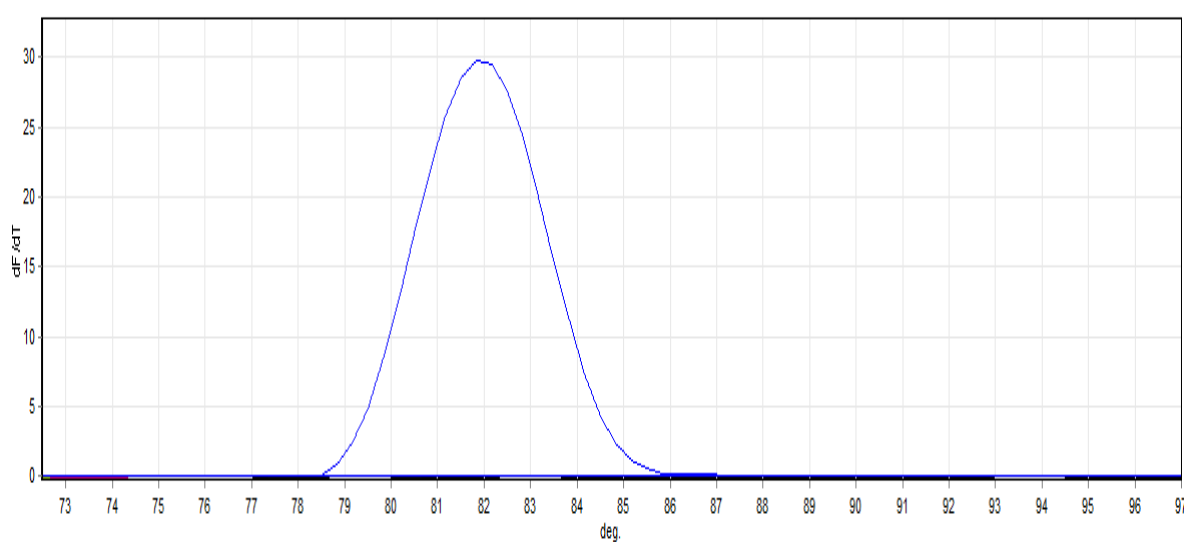


Fig. 13. Perfiles de desnaturalización térmica de mezclas de qPCR anidada de APCG sujetas a 30/25 ciclos de preamplificación / amplificación con iniciadores VPH 16/18-S.

qPCR anidada para VPH 18 del raspado cervical MC18

Decidimos investigar si la disminución de la temperatura de alineamiento de 56 °C a 40 °C en la preamplificación también previene la aparición del hombro en el perfil de desnaturalización térmica del amplicón E6 de VPH 18 generado a partir del raspado cervical MC18.

Preparamos mezclas de PCR anidada con 100 ng de DNA MC18, iniciadores VPH 18-S o coctel VPH 16/18-S y las sujetamos a 30 ciclos de preamplificación con alineamiento a 56 °C o 40 °C seguidos con 25 ciclos de amplificación anidada.

Los valores de T_m de los duplicados de las mezclas del amplicón E6 de VPH 18 del raspado MC18 fueron 81.5 °C y 82.0 °C. El hombro apareció con alineamiento a 56 °C pero no a 40 °C (Fig. 14). El perfil de desnaturalización simétrico con mayor fluorescencia fue obtenido con alineamiento a 40 °C en la preamplificación.

Concluimos que la temperatura de alineamiento a 40 °C en la preamplificación previene la aparición del producto espurio del amplicón E6 de VPH 18 y que el uso del coctel de iniciadores VPH 16/18-S no afecta los resultados de la amplificación ni de la desnaturalización térmica.

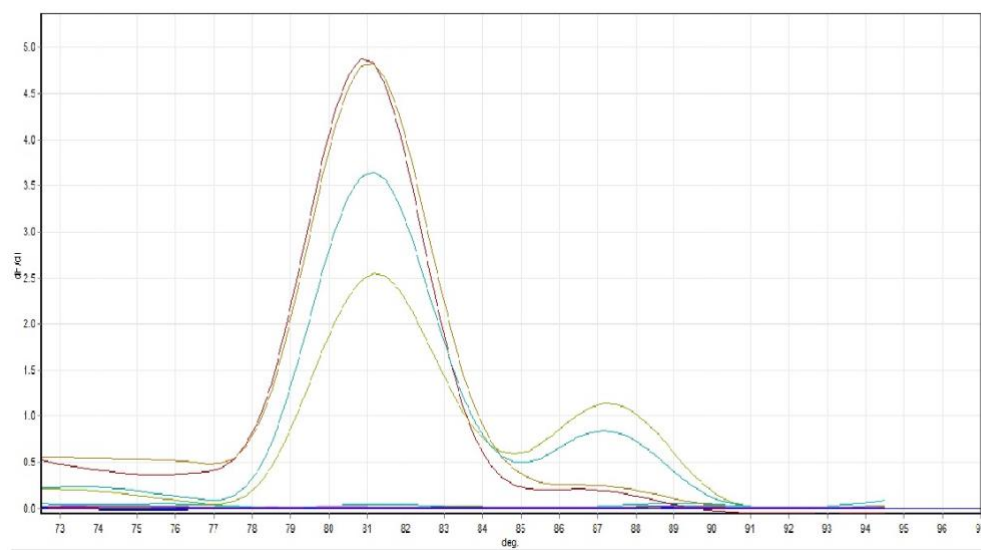


Fig. 14. Perfiles de desnaturalización térmica de mezclas de qPCR anidada del raspado cervical MC18, con iniciadores VPH 18-S o el coctel VPH 16/18-S y 30 ciclos de preamplificación, annealing a 56 °C o 40 °C, seguidos de 25 ciclos de amplificación anidada

qPCR directa para los amplicones E6 de VPH 16 y 18 en mezclas con pHPV16, pHPV18 y ambos plásmidos

Llevamos a cabo experimentos de qPCR directa con pHPV16, pHPV18 o ambos (pHPV16/18), con iniciadores VPH 16-S, VPH 18-S o un coctel con ambas parejas, para determinar los perfiles de desnaturalización térmica de los amplicones E6 de VPH 16 y 18 generados en mezclas con un número equivalente de copias de pHPV16 y pHPV18.

Los picos principales de los amplicones E6, únicos y reproducibles en las mezclas de qPCR, fueron los siguientes: pHPV16, 83.3 °C y 83.5 °C; pHPV18, 81.3 °C y 81.5 °C; pHPV16/18, 82.3 °C, 82.5 °C. (Fig. 15, Tabla 11).

Los amplicones generados en la mezcla con ambos plásmidos (pHPV16 y pHPV18) no dieron los dos picos principales esperados sino un pico único, con un valor de 82.4 °C, intermedio entre los valores de la mezcla con pHPV16 (83.4 °C) y pHPV18 (81.4 °C).

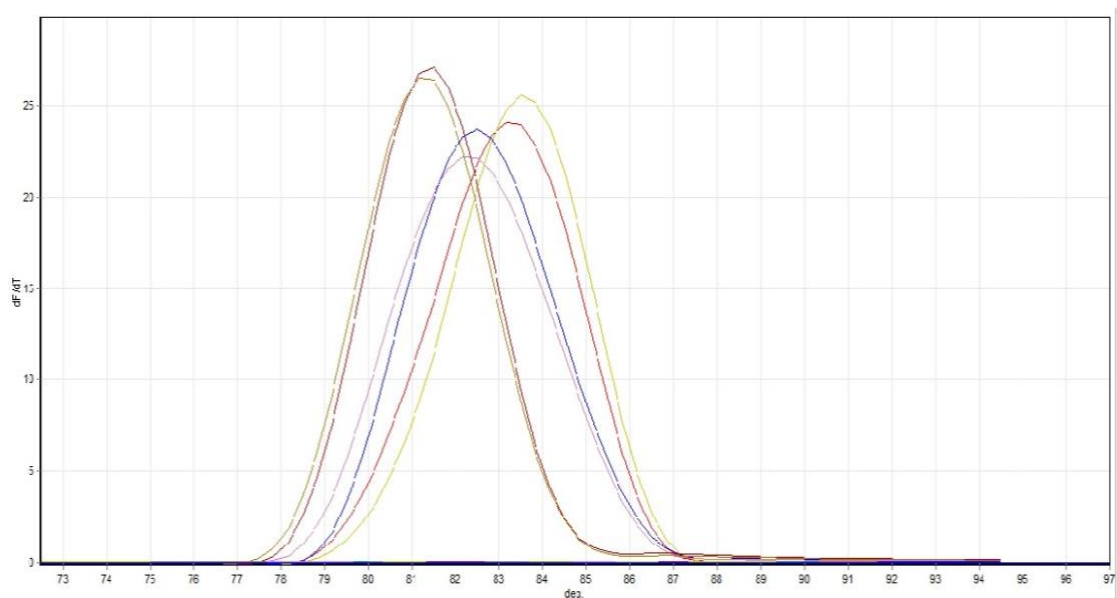


Fig. 15. Perfil de desnaturalización de los amplicones E6 generados a partir de mezclas con pHPV16, pHPV18 y ambos plásmidos

Tabla 11. Valores de Tm de los picos principales de los amplicones E6 de VPH 16 y 18 generados en mezclas de qPCR directa con pHPV16, pHPV18 o ambos plásmidos

DNA	Tm (°C)
pHPV16a	83.3
pHPV16b	83.5
pHPV18a	81.3
pHPV18b	81.5
pHPV16/pHPV18	82.5
pHPV16/pHPV18	82.3

Preamplificación y qPCR para el diagnóstico preliminar de infección por VPH

Finalmente probamos si la preamplificación de raspados cervicales con los iniciadores GP E6/E7 permite realizar el diagnóstico preliminar de infección con el método de Sotlar et al. (2004) en mezclas de qPCR con 100 ng de DNA APCG preamplificado 40 ciclos con iniciadores GP E6/E7 400 nM y alineamiento a 56 °C.

Las mezclas empezaron a emitir fluorescencia detectable alrededor del ciclo 25, antes que el control negativo (Fig. 16), por lo cual concluimos que la qPCR directa de raspados cervicales con el protocolo de preamplificación por qPCR con los iniciadores GP E6/E7 podría servir para el diagnóstico preliminar de infección por cualquiera de los 19 tipos de VPH identificados con el método de Sotlar et al. (2004).

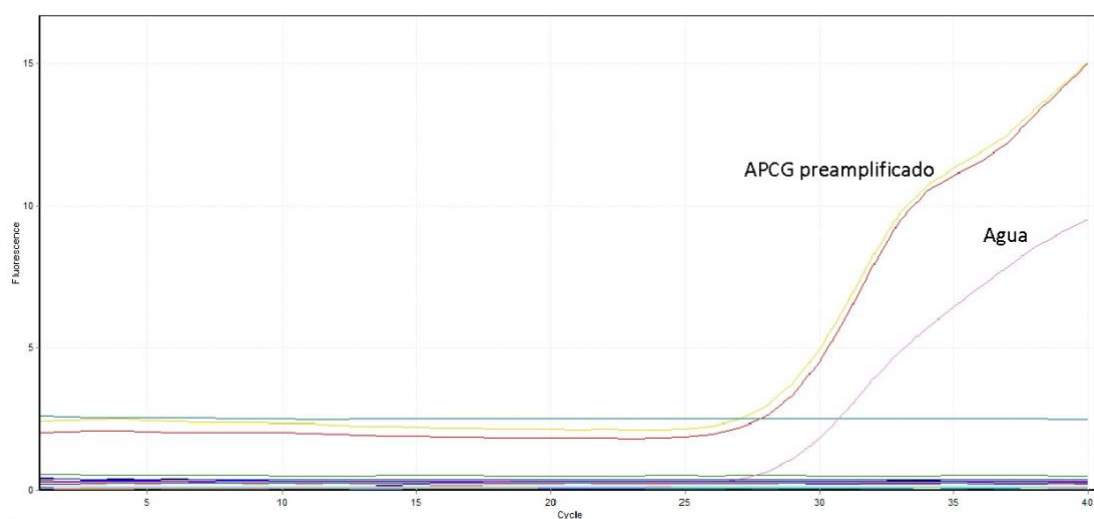


Fig. 16. qPCR de mezclas con DNA de APCG e iniciadores GP E6/E7

Discusión

En este trabajo nos propusimos desarrollar un método de qPCR dúplex anidada en presencia de EvaGreen para diagnosticar la infección por VPH 16 y 18 basada en el análisis de los perfiles de desnaturalización térmica de los amplicones correspondientes de los oncogenes E6 generados con iniciadores tipo-específicos, que sería menos laborioso, más rápido y barato que la electroforesis en geles de agarosa empleada por Sotlar et al. (2004) o la electroforesis capilar empleada por Dictor y Warenholt (2011). Encontramos que los perfiles de desnaturalización pueden diferenciar los amplicones E6 de VPH 16 y 18 generados con los iniciadores tipo-específicos de Sotlar et al (2004) 'S', pero no con los de Dictor y Warenholt (2011) 'D'.

Mediante PCR directa de punto final uniplex o dúplex con o sin touchdown a partir de pHPV16 y pHPV18 generamos los amplicones del tamaño esperado para VPH 16 y 18 las parejas de iniciadores D aisladas o mezcladas (Figs. 3 y 4). En mezclas similares de qPCR directa obtuvimos los amplicones de VPH 16 y 18 con valores de T_m en sus perfiles de desnaturalización térmica de 84.2 y 84.3, respectivamente (Figs. 5 y 6). Descartamos el uso simultáneo de estas parejas de iniciadores porque la diferencia en los valores de T_m (ΔT_m) de 0.1 °C en los valores de T_m no permitiría diferenciar los genotipos de VPH 16 y 18.

Probamos entonces diferentes mezclas de qPCR directa con pHPV16 y pHPV18 y las parejas D y S para ver si alguna combinación de parejas permitía diferenciar los amplicones de VPH 16 de 18 por la ΔT_m . Encontramos una $\Delta T_m = 1.9$ °C entre los amplicones VPH 16-D y VPH 18-S, pero el rendimiento con la pareja D fue menor que con la S. Este efecto se repitió al comparar ambas parejas de iniciadores en qPCR directa y anidada en una muestra cervical, principalmente en PCR anidada (Figs. 9 y 10).

El aumento de copias en el molde de ADN en la etapa de preamplificación de la PCR anidada mejoró el rendimiento, pero el aumento indiscriminado de ciclos en las etapas de preamplificación y amplificación no mejoró el rendimiento y favoreció la formación de productos espurios con valores de T_m promedio mayores que el del amplicón (Fig. 11), probablemente por la interacción de los iniciadores. La disminución de la temperatura de annealing de 56 °C a 40 °C en la preamplificación permitió generar amplicones con perfiles de desnaturalización térmica simétricos en las muestras cervicales (Figs. 13 y 14).

La qPCR anidada con parejas de iniciadores S únicas o mezcladas generó amplicones que alcanzaron la asíntota (Fig. 12) y tuvieron perfiles de desnaturalización térmica simétricos, con un pico único y reproducible (Fig. 13). En mezclas de qPCR con cargas (i.e., número de copias) similares de pHPV16 y pHPV18 y las dos parejas de iniciadores, el perfil de desnaturalización térmica fue único y el valor de T_m intermedio entre el de los amplicones de VPH 16 y 18 (Fig. 15). No sabemos cuál sería el comportamiento de los valores de T_m de ambos amplicones en muestras cervicales con infección doble por VPH 16 y 18 pero con diferencias notables en las cargas virales de ambos genotipos.

Este trabajo sienta las bases para continuar el desarrollo de un método de qPCR multiplex anidada rápido y barato para detectar genotipos adicionales a VPH 16 y 18 en muestras cervicales (Fig. 16). Este método permitiría identificar en un paso las muestras con infección por VPH y continuar los análisis subsecuentes solamente con las positivas para minimizar el tiempo y los recursos que identifiquen a las pacientes en riesgo de desarrollar cáncer cervical (Fig. 17).

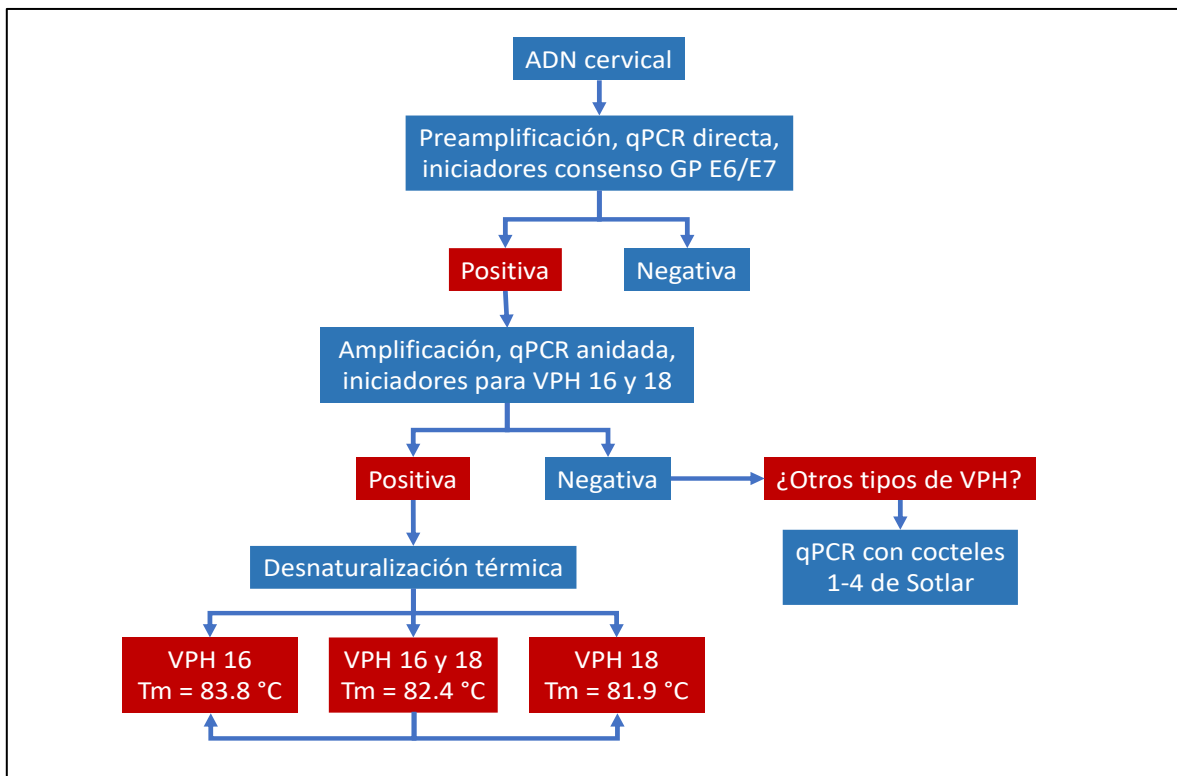


Fig. 17. Algoritmo para la identificación de VPH 16 y 18 por desnaturalización térmica de los productos de qPCR dúplex anidada en presencia de EvaGreen

El DNA de un raspado cervical se preamplifica 20 ciclos por qPCR directa en presencia de EvaGreen con los iniciadores GP E6/E7 (Sotlar et al., 2004). Si el resultado es positivo, la misma muestra se amplifica por 40 ciclos mediante qPCR con las parejas de iniciadores S tipo-específicos para VPH 16 y 18 y se determina el perfil de desnaturalización térmica. Si no se generan amplicones de VPH 16, 18 o ambos, podrían llevarse a cabo pruebas de qPCR anidada adicionales con los cocteles 1-4 de Sotlar et al. (2004) para identificar otros genotipos de VPH.

El gen E6 de VPH del DNA cervical se preamplificaría mediante qPCR con iniciadores GP E6/E7 (Sotlar et al., 2004). Las muestras presuntamente positivas, con fluorescencia por encima del control negativo, serían amplificadas con los iniciadores S para VPH 16 y 18. En caso de amplificación positiva se analizarían los perfiles de desnaturalización térmica; la Tm de 83.8 °C correspondería a VPH 16 y la de 81.9 °C a VPH 18 y el valor intermedio 82.4°C indicaría una infección doble por VPH 16 y 18.

En caso de amplificación negativa la muestra se sometería a qPCR con los cocteles de iniciadores 1-4 de Sotlar et al. (2004); del coctel 1 se excluirían las parejas para VPH 16 y 18.

Referencias

- Abreu, A.L.P., Souza, R.P., Gimenes, F., Consolaro, M.E.L., 2012. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Viol. J.* 9, 262. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-262>
- Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., de Sanjosé, S., Saraiya, M., Ferlay, J., Bray, F., 2020. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob. Heal.* 8, e191–e203. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30482-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30482-6)
- Arney, A., Bennett, K.M., 2010. Molecular Diagnostics of Human Papillomavirus. *Lab. Med.* 41, 523–530. <https://doi.org/10.1309/LM75WGJSVMI7VVEF>
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C., Boyer, H.W., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2, 75–93. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(77\)90074-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(77)90074-9)
- Bonde, J.H., Sandri, M.-T., Gary, D.S., Andrews, J.C., 2020. Clinical Utility of Human Papillomavirus Genotyping in Cervical Cancer Screening: A Systematic Review. *J. Low. Genit. Tract Dis.* 24, 1–13. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000494>
- Brink, A.A.T.P., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M., 2007. HPV Detection Methods. *Dis. Markers* 23, 273–281. <https://doi.org/10.1155/2007/147429>
- Brody, J.R., Kern, S.E., Brody, J.R., 2004. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36, 1–2. <https://doi.org/10.2144/04362bm02>
- CENETEC, 2018. Prevención, Detección, Diagnóstico y Tratamiento de Lesiones Precursoras del Cáncer de Cuello Uterino en Primer y Segundo Nivel de Atención, Guía de Práctica Clínica, Secretaria de Salud, México.
- Chen, Z., de Freitas, L.B., Burk, R.D., 2015. Evolution and Classification of Oncogenic Human Papillomavirus Types and Variants Associated with Cervical Cancer, en: *Cervical Cancer: Methods and Protocols*. pp. 3–26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2013-6_1
- Clavel, C., Masure, M., Putaud, I., Thomas, K., Bory, J.P., Gabriel, R., Quereux, C., Birembaut, P., 1998. Hybrid capture II, a new sensitive test for human

- papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J. Clin. Pathol.* 51, 737–740. <https://doi.org/10.1136/jcp.51.10.737>
- De Roda Husman, A.M., Walboomers, J.M.M., Van den Brule, A.J.C., Meijer, C.J.L.M., Snijders, P.J.F., 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J. Gen. Virol.* 76, 1057–1062. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-1057>
- Dictor, M., Warenholt, J., 2011. Single-tube multiplex PCR using type-specific E6/E7 primers and capillary electrophoresis genotypes 21 human papillomaviruses in neoplasia. *Infect. Agent. Cancer.* <https://doi.org/10.1186/1750-9378-6-1>
- Domínguez-Zepahua, M., Hernández-Arteaga, S., López-Revilla, R., 2018. Genotyping based on thermal denaturation of amplification products identifies species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Med. Microbiol.* 67, 1310–1320. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000816>
- EndMemo, 2020. DNA Melting Temperature (Tm) Calculator [WWW Document]. EndMemo Online Convert. URL www.endmemo.com/bio/tm.php \$59.99
- Gautam, A., Gedda, M.R., Rai, M., Sundar, S., Chakravarty, J., 2019. Human Papillomavirus Genome based Detection and Typing: A Holistic Molecular Approach. *Curr. Mol. Med.* 19, 237–246. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190405120441>
- Hernández-Arteaga, S., López-Revilla, R., 2010. Ultrasensitive quantitation of human papillomavirus type 16 E6 oncogene sequences by nested real time PCR. *Infect. Agent. Cancer* 5, 3–9. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-5-9>
- Hernández-Arteaga, S., López-Revilla, R., 2008. Quantitation of human papillomavirus type 16 E6 oncogene sequences by real-time or quantitative PCR with EvaGreen. *Anal. Biochem.* 380, 131–133. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.05.012>
- InMujeres, 2022. Sistema de indicadores de género. Panorámica territorial [WWW Document]. Inst. Nac. las Mujeres. URL <http://estadistica-sig.inmujeres.gob.mx/formas/pgeneral.php> (consultado 9.9.22).

- Karlsen, F., Kalantari, M., Jenkins, A., Pettersen, E., Kristensen, G., Holm, R., Johansson, B., Hagmar, B., 1996. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2095–2100. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.9.2095-2100.1996>
- Khan, S.A., Sung, K., Nawaz, M.S., 2011. Detection of *aacA-aphD*, *qacE δ 1*, *marA*, *floR*, and *tetA* genes from multidrug-resistant bacteria: Comparative analysis of real-time multiplex PCR assays using EvaGreen® and SYBR® Green I dyes. *Mol. Cell. Probes* 25, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.01.004>
- Kleter, B., van Doorn, L.-J.J., ter Schegget, J., Schrauwen, L., Van Krimpen, K., Burger, M.M., Ter Harmsel, B., Quint, W., 1998. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am. J. Pathol.* 153, 1731–1739. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65688-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65688-X)
- Liyanage, S.S., Rahman, B., Ridda, I., Newall, A.T., Tabrizi, S.N., Garland, S.M., Segelov, E., Seale, H., Crowe, P.J., Moa, A., MacIntyre, C.R., 2013. The Aetiological Role of Human Papillomavirus in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *PLoS One* 8, e69238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069238>
- Pryor, R.J., Wittwer, C.T., 2006. Real-Time Polymerase Chain Reaction and Melting Curve Analysis, en: *Clinical Applications of PCR*. Humana Press, New Jersey, pp. 19–32. <https://doi.org/10.1385/1-59745-074-X:19>
- Qu, W., Jiang, G., Cruz, Y., Chang, C.J., Ho, G.Y.F., Klein, R.S., Burk, R.D., 1997. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1304–1310. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.6.1304-1310.1997>
- Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S., Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R., Bültmann, B., 2004. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3176–84. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004>
- Staroscik, A., 2004. Calculator for determining the number of copies of a template [WWW Document]. *URI Genomics Seq. Cent.* URL

- <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> (consultado 4.7.21).
- Valenčak, A.O., Šterbenc, A., Seme, K., Poljak, M., 2020. Alinity m HR HPV assay fulfills criteria for human papillomavirus test requirements in cervical cancer screening settings. *J. Clin. Microbiol.* 58. <https://doi.org/10.1128/JCM.01120-19>
- Walboomers, J.M., Jacobs, M. V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K. V., Snijders, P.J.F., Peto, J., Meijer, C.J.L.M., Muñoz, N., 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189, 12–19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F)
- Watson, N., 1988. A new revision of the sequence of plasmid pBR322. *Gene* 70, 399–403. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90212-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90212-0)
- Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., de Sanjosé, S., Saraiya, M., Ferlay, J., Bray, F., 2020. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob. Heal.* 8, e191–e203. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30482-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30482-6)
- Arney, A., Bennett, K.M., 2010. Molecular Diagnostics of Human Papillomavirus. *Lab. Med.* 41, 523–530. <https://doi.org/10.1309/LM75WGJSVMI7VVEF>
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C., Boyer, H.W., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2, 75–93. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(77\)90074-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(77)90074-9)
- Bonde, J.H., Sandri, M.-T., Gary, D.S., Andrews, J.C., 2020. Clinical Utility of Human Papillomavirus Genotyping in Cervical Cancer Screening: A Systematic Review. *J. Low. Genit. Tract Dis.* 24, 1–13. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000494>
- Brink, A.A.T.P., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M., 2007. HPV Detection Methods. *Dis. Markers* 23, 273–281. <https://doi.org/10.1155/2007/147429>
- Brody, J.R., Kern, S.E., Brody, J.R., 2004. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36, 1–2. <https://doi.org/10.2144/04362bm02>
- CENETEC, 2018. Prevención, Detección, Diagnóstico y Tratamiento de Lesiones

- Precursoras del Cáncer de Cuello Uterino en Primer y Segundo Nivel de Atención, Guía de Práctica Clínica, Secretaria de Salud, México.
- Chen, Z., de Freitas, L.B., Burk, R.D., 2015. Evolution and Classification of Oncogenic Human Papillomavirus Types and Variants Associated with Cervical Cancer, en: *Cervical Cancer: Methods and Protocols*. pp. 3–26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2013-6_1
- Clavel, C., Masure, M., Putaud, I., Thomas, K., Bory, J.P., Gabriel, R., Quereux, C., Birembaut, P., 1998. Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J. Clin. Pathol.* 51, 737–740. <https://doi.org/10.1136/jcp.51.10.737>
- De Roda Husman, A.M., Walboomers, J.M.M., Van den Brule, A.J.C., Meijer, C.J.L.M., Snijders, P.J.F., 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J. Gen. Virol.* 76, 1057–1062. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-1057>
- Dictor, M., Wahrenholt, J., 2011. Single-tube multiplex PCR using type-specific E6/E7 primers and capillary electrophoresis genotypes 21 human papillomaviruses in neoplasia. *Infect. Agent. Cancer*. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-6-1>
- Domínguez-Zepahua, M., Hernández-Arteaga, S., López-Revilla, R., 2018. Genotyping based on thermal denaturation of amplification products identifies species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Med. Microbiol.* 67, 1310–1320. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000816>
- EndMemo, 2020. DNA Melting Temperature (Tm) Calculator [WWW Document]. EndMemo Online Convert. URL www.endmemo.com/bio/tm.php \$59.99
- Gautam, A., Gedda, M.R., Rai, M., Sundar, S., Chakravarty, J., 2019. Human Papillomavirus Genome based Detection and Typing: A Holistic Molecular Approach. *Curr. Mol. Med.* 19, 237–246. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190405120441>
- Hernández-Arteaga, S., López-Revilla, R., 2010. Ultrasensitive quantitation of human papillomavirus type 16 E6 oncogene sequences by nested real time

- PCR. *Infect. Agent. Cancer* 5, 3–9. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-5-9>
- Hernández-Arteaga, S., López-Revilla, R., 2008. Quantitation of human papillomavirus type 16 E6 oncogene sequences by real-time or quantitative PCR with EvaGreen. *Anal. Biochem.* 380, 131–133. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.05.012>
- Karlsen, F., Kalantari, M., Jenkins, A., Pettersen, E., Kristensen, G., Holm, R., Johansson, B., Hagmar, B., 1996. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2095–2100. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.9.2095-2100.1996>
- Khan, S.A., Sung, K., Nawaz, M.S., 2011. Detection of *aacA-aphD*, *qacE δ 1*, *marA*, *floR*, and *tetA* genes from multidrug-resistant bacteria: Comparative analysis of real-time multiplex PCR assays using EvaGreen® and SYBR® Green I dyes. *Mol. Cell. Probes* 25, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.01.004>
- Kleter, B., van Doorn, L.-J.J., ter Schegget, J., Schrauwen, L., Van Krimpen, K., Burger, M.M., Ter Harmsel, B., Quint, W., 1998. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am. J. Pathol.* 153, 1731–1739. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65688-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65688-X)
- Liyanage, S.S., Rahman, B., Ridda, I., Newall, A.T., Tabrizi, S.N., Garland, S.M., Segelov, E., Seale, H., Crowe, P.J., Moa, A., MacIntyre, C.R., 2013. The Aetiological Role of Human Papillomavirus in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *PLoS One* 8, e69238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069238>
- Pryor, R.J., Wittwer, C.T., 2006. Real-Time Polymerase Chain Reaction and Melting Curve Analysis, en: *Clinical Applications of PCR*. Humana Press, New Jersey, pp. 19–32. <https://doi.org/10.1385/1-59745-074-X:19>
- Qu, W., Jiang, G., Cruz, Y., Chang, C.J., Ho, G.Y.F., Klein, R.S., Burk, R.D., 1997. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1304–1310. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.6.1304-1310.1997>
- Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S.,

- Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R., Bültmann, B., 2004. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3176–84. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004>
- Staroscik, A., 2004. Calculator for determining the number of copies of a template [WWW Document]. URI Genomics Seq. Cent. URL <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> (consultado 4.7.21).
- Valenčak, A.O., Šterbenc, A., Seme, K., Poljak, M., 2020. Alinity m HR HPV assay fulfills criteria for human papillomavirus test requirements in cervical cancer screening settings. *J. Clin. Microbiol.* 58. <https://doi.org/10.1128/JCM.01120-19>
- Walboomers, J.M., Jacobs, M. V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K. V., Snijders, P.J.F., Peto, J., Meijer, C.J.L.M., Muñoz, N., 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189, 12–19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F)
- Watson, N., 1988. A new revision of the sequence of plasmid pBR322. *Gene* 70, 399–403. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90212-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90212-0)

Anexo 1

Iniciadores para VPH

Iniciadores consenso o universales

Su blanco es una región conservada específica en el genoma de VPH, como L1 y E2. El inconveniente es que sólo coincide completamente con pocos genotipos de VPH. Bajando la temperatura de alineamiento pueden aparearse con el DNA molde. Un ejemplo son GP5/GP6, con la limitación de que puede darse enmascaramiento en caso de infecciones múltiples con otros genotipos presentes en bajas concentraciones y (De Roda Husman et al., 1995).

La región E6/E7 del genoma de VPH codifica los oncogenes que participan en la transformación neoplásica. Su uso es más específico que el del gen L1 como blanco, que puede deletarse durante o después de la integración del genoma viral al genoma celular (Sotlar et al., 2004). Para la detección y diferenciación de 19 genotipos de VPH, la PCR anidada de Sotlar et al. (2004) utiliza iniciadores E6/E7 consenso en la preamplificación y tipo-específicos en la amplificación, es más sensible que la PCR directa (Hernández-Arteaga y López-Revilla, 2008) e incrementa la detección de infecciones únicas y múltiples (Sotlar et al., 2004).

Dictor y Warenholt (2011) diseñaron un método de PCR en tiempo real multiplex para E6 con iniciadores tipo-específicos con marcadores fluorescentes para generar productos de tamaño y color específico para cada genotipo de VPH en electroforesis capilar. Este método es confiable, sencillo y evita procesos posteriores como secuenciación o hibridación.

Iniciadores degenerados

Contienen uno o más nucleótidos que no coinciden. Con ellos no se requiere bajar la temperatura de alineamiento para compensar las variaciones de la secuencia intertípica de los sitios de unión. Un ejemplo es la pareja MY09/11 que amplifica 450 pb del ORF L1 (De Roda Husman et al., 1995).

Iniciadores no degenerados

Contienen inosina que puede unirse a cualquier nucleótido. Se incuban a temperatura adecuada y son muy reproducibles. Un ejemplo es el método SPF10-PCR-DEIA para L1 (Gautam et al., 2019; Kleter et al., 1998).

Anexo 2

Amplicones E6 de VPH 16 y 18 de Sotlar et al. (2004)

VPH 16 (457 pb; 141-597)

121	GGAGCGACCC	AGAAAGTTAC	CACAGTTATG	CACAGAGCTG	CAAACAAC	CTA	TACATGATAT
181	AATATTAGAA	TGTGTGTACT	GCAAGCAACA	GTTACTGCGA	CGTGAGGTAT	ATGACTTTGC	
241	TTTTCGGGAT	TTATGCATAG	TATATAGAGA	TGGGAATCCA	TATGCTGTAT	GTGATAAATG	
301	TTTAAAGTTT	TATTCTAAAA	TTAGTGAGTA	TAGACATTAT	TGTTATAGTG	TGTATGGAAC	
361	AACATTAGAA	CAGCAATACA	ACAAACCGTT	GTGTGATTG	TTAATTAGGT	GTATTAAGT	
421	TCAAAAGCCA	CTGTGTCCTG	AAGAAAAGCA	AAGACATCTG	GACAAAAAGC	AAAGATTCCA	
481	TAATATAAGG	GGTCGGTGGA	CCGGTCGATG	TATGTCTTGT	TGCAGATCAT	CAAGAACACG	
541	TAGAGAAACC	CAGCTGTAAT	CATGCATGGA	GA	TACACCTA	CATTGCATGA	ATATATGTTA

VPH 18 (322 pb; 170-491)

121	ATCCAACACG	GCGACCCTAC	AAGCTACCTG	ATCTGTGCAC	GGAAGTGAAC	ACTTCACTGC	
181	AAGACATAGA	AATAACCTGT	GTATATTGCA	AGACAGTATT	GGAAGTGAAC	ACTTCACTGC	
241	AATTTGCATT	TAAAGATTTA	TTTGTGGTGT	ATAGAGACAG	TATACCGCAT	GCTGCATGCC	
301	ATAAATGTAT	AGATTTTTAT	TCTAGAATTA	GAGAATTAAG	ACATTATTCA	GAATCTGTGT	
361	ATGGAGACAC	ATTGGAAAAA	CTAACTAACA	CTGGGTTATA	CAATTTATTA	ATAAGGTGCC	
421	TGCGGTGCCA	GAAACCGTTG	AATCCAGCAG	AAAAACTTAG	ACACCTTAA	T	GAAAAACGAC
481	GATTTACAAA	CATAGCTGGG	CACTATAGAG	GCCAGTGCCA	TTCGTGCTGC	AACCGAGCAC	

INICIADORES FORWARD. *INICIADORES REVERSE.*

Anexo 3

Amplicones E6 de VPH 16 y 18 de Dictor y Warenholt (2011)

VPH 16 (209 pb; 496-704)

481	TAATATAAGG GGTCGGT GGA CCGGTCGATG TATGTCTTGT TGCAGATCAT CAAGAACACG
541	TAGAGAAACC CAGCTGTAAT CATGCATGGA GATACACCTA CATTGCATGA ATATATGTTA
601	GATTTGCAAC CAGAGACAAC TGATCTCTAC TGTTATGAGC AATTAAATGA CAGCTCAGAG
661	GAGGAGGATG AAATAGATGG TCCA GCTGGA CAAGCAGAAC CGGAC CAGAGC CCATTACAAT

VPH 18 (98 pb; 514-611)

481	GATTCCACAA CATAGCTGGG CACTATAGAG GCCAGTGCCA TTCGTGCTGC AACCGAGCAC
541	GACAGGAAAG ACTCCAACGA CGCAGAGAAA CACAAGTATA ATATTAAGTA TGCATGGACC
601	TAAGGCAACA TTGCAAGACA TTGTATTGCA TTTAGAGCCC CAAAATGAAA TTCCGGTTGA

INICIADORES FORWARD. *INICIADORES REVERSE.*