



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

Posgrado en Biología Molecular

“PCR en tiempo real anidada para cuantificar los genes E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16”

Tesis que presenta

Ana Patricia Eréndhira Campillo Devora

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.

Marzo de 2011

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS

La tesis “**PCR en tiempo real anidada para cuantificar los genes E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16**” presentada para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ana Patricia Eréndhira Campillo Devora** y aprobada el 2 de Marzo de 2011 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

Dr. Sergio Casas Flores

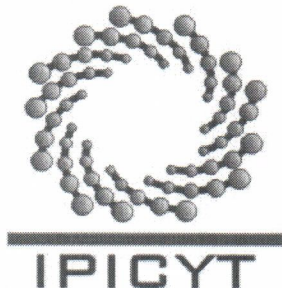
Asesor

Dr. Gerardo Alfonso Anguiano Vega

Asesor

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue realizada en la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla. Durante la realización del trabajo la autora recibió la beca 223332 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.



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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 078 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 2 días del mes de marzo del año 2011, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. J. Sergio Casas Flores	Presidente	IPICYT
Dr. Gerardo Alfonso Anguiano Vega	Secretario	IPICYT
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Ana Patricia Eréndhira Campillo Devora

sobre la Tesis intitulada:

PCR en tiempo real anidada para cuantificar los genes E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

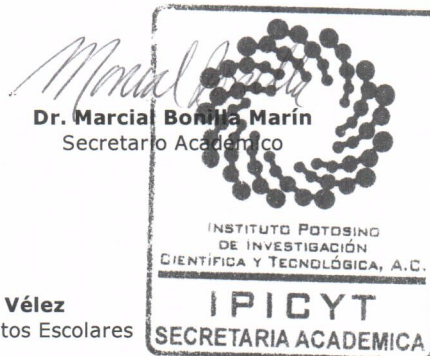
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico 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 2 días del mes de marzo de 2011.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

DEDICATORIAS

“La investigación científica se aprende como cualquier otro oficio”

Dr. Rubén López-Revilla

A mis padres Zenaida y Chuy.

A mis hermanos Valentina, Arturo, Carlos y Karla.

A mis sobrinos Iván, Adrián, Arturito, Frida, Arnulfo y Gabriela.

Al Dr. Rafael Borrego.

AGRADECIMIENTOS

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

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

A *Mireya Sánchez* por su paciencia y el apoyo que siempre me dio en el laboratorio.

Al *Dr. Gerardo Anguiano* y el *Dr. Sergio Casas Flores* por sus consejos teórico-prácticos para la realización de la parte experimental.

A *Coco Hernández, Raúl de la Rosa, Claudia Magaña, Juan Manuel Mendoza, y Emmanuel Valdez* por su guía y aportaciones.

A mis maestros: *Dr. Ángel Alpuche, Dr. Gerardo Argüello, Dr. Carlos Barajas, Dra. Ana Paulina Barba, Dr. Sergio Casas, Dra. Irene Castaño, Dr. Alejandro de las Peñas, Dr. Antonio de León, Dr. Francisco Jiménez Bremont, Dra. Lina Riego, Dr. Luis Salazar, Dra. Leticia Santos, Dra. Concepción García Luján, Dra. Aurora Martínez Romero, Dr. Sigfredo Esparza* por sus enseñanzas.

A *Javier, Lupita, Verónica Espericueta, Rosy Espinosa, Salvador Ambriz, Aurora Londoño, Marce, Candy, Mayté, Alex, Emmanuel, Jacky, Raúl Loera y Claudia Peresson* por sus consejos en los experimentos.

A *Verónica Zárate y Tere Rosales* por su apoyo y consejo técnico.

A *Zerelda, Estela, Julio, Luis, José, Marbella, Guadalupe, Paul y Gloria* por los gratos momentos.

ÍNDICE

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	iii
COPIA DEL ACTA DEL EXAMEN	iv
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
MATERIAL Y MÉTODOS	4
Condiciones para la amplificación de E6-339, E7-252, E6-152 y E7-170	4
Construcción de pPC301 (E6-339) y pCA401 (E7-252) y obtención de transformantes	6
PCR de E6-339 y E7-252 y selección de clonas transformantes de <i>E. coli</i> TOP10.....	6
Purificación de pPC301 y pCA401.....	6
Restricción de pPC301 y pCA401	8
Pureza y concentración del DNA plasmídico	8
Secuenciación de los insertos de pPC301 y pCA401	8
Calibración de la qPCR anidada de E6-152.....	9
Calibración de la qPCR anidada de E7-170.....	9
RESULTADOS	11
Amplificación optimizada de los genes E6 y E7 de VPH16.....	11
Construcción de pPC301 y pCA401	11
PCR de las clonas transformantes.....	12
Purificación y número de copias de pPC301 y pCA401.....	13
Patrones de restricción de pPC301 y pCA401	14
Secuencias de los insertos E6-339 (de pPC301) y E7-252 (de pCA401)	14
DISCUSIÓN	22
REFERENCIAS	24
ANEXOS	25
Clonación de los amplicones E6-339 y E7-252 generados a partir de DNA de células SiHa	26
Calibración de la qPCR anidada	27

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados.....	4
Tabla 2. Programa del termociclador para amplificar E6-339 y E7-252.....	5
Tabla 3. Diluciones logarítmicas seriadas de pPC301 ($C_0 = 120 \text{ ng}/\mu\text{L}$).....	9
Tabla 4. Diluciones logarítmicas seriadas de pCA401 ($C_0 = 58 \text{ ng}/\mu\text{L}$).....	10
Tabla 5. Condiciones óptimas para amplificar E6 y E7 de VPH16.....	11
Tabla 6. Moléculas por nanogramo de pPC301 y pCA401.....	14
Tabla 7. Calibración de la qPCR anidada de E6-152.....	17
Tabla 8. Picos del perfil de fusión térmica de E6-152.....	18
Tabla 9. Calibración de la qPCR anidada de E7-170.....	19
Tabla 10. Picos del perfil de fusión térmica de E7-170.....	21

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Oligonucleótidos empleados: localización en el genoma de VPH16 y amplicones generados.....	4
Fig. 2. Amplificación de E6-339 y E7-252 para generar los insertos.....	12
Fig. 3. Transformantes de <i>E. coli</i> obtenidas con las mezclas de ligación.....	12
Fig. 4. Amplificación de E6-339 a partir de las siete clonas transformantes.....	13
Fig. 5. Amplificación de E7-252 a partir de cinco de las seis clonas transformantes.....	13
Fig. 6. Liberación de los insertos de pPC301 (E6-339) y pCA401 (E7-252) con <i>Eco</i> RI.....	14
Fig. 7. Secuencia del inserto E6-339.....	15
Fig. 8. Secuencia del inserto E7-252.....	15
Fig. 9. Alineación del inserto E6-339.....	16
Fig. 10. Alineación del inserto E7-252.....	16
Fig. 11. Familia de curvas de qPCR anidada para E6-152.....	17
Fig. 12. Regresión lineal de qPCR anidada de E6-152.....	18
Fig. 13. Perfil de fusión de E6-152.....	18
Fig. 14. Familia de curvas de qPCR anidada de E7-170.....	20
Fig. 15. Regresión lineal de qPCR anidada de E7-170.....	20
Fig. 16. Perfil de fusión de E7-170.....	21

RESUMEN

CONTEXTO. El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres del mundo y la primera en la mayoría de los países en desarrollo. En México mueren cada año cerca de 4,500 mujeres por CaCu. La infección persistente por virus del papiloma humano (VPH) de “alto riesgo”, principalmente por el VPH tipo 16 (VPH16) es uno de los principales factores de riesgo para la progresión de las lesiones neoplásicas, aunque no todas las mujeres infectadas con VPH-AR desarrollan cáncer. La integración del genoma viral con delección parcial del gen viral E2 parece determinante en la progresión hacia el cáncer cervical invasor. La prueba primaria de tamizaje del CaCu es el análisis citológico (Papanicolaou), de sensibilidad y especificidad limitadas para evaluar la progresión de las lesiones neoplásicas, por lo cual es deseable desarrollar marcadores moleculares más objetivos de la progresión neoplásica. Un marcador molecular propuesto es la carga viral (número de copias de genes virales); otro es la integración del genoma viral mediante cuantificación del gen viral regulador E2 y de los oncogenes E6 y E7 para calcular los cocientes E2/E6 y E2/E7, cuyos valores tienden a cero en el estado de integración pura. La mayoría de los estudios de integración se han realizado con PCR en tiempo real (qPCR) de los genes E2 y E6 en presencia del fluorocromo SYBRGreen. En nuestro laboratorio fue desarrollado recientemente un método de qPCR anidada ultrasensible para E6 y E2 con EvaGreen como fluorocromo. **MÉTODOS.** La estrategia de este trabajo incluyó la generación de las construcciones control pPC301 y pCA401, con los insertos de los genes E6 y E7 de 339 y 252 pares de bases (E6-339 y E7-252) respectivamente, amplificados a partir del genoma de VPH16 y ligados en el vector de clonación pCR4-TOPO, con los cuales obtuvimos transformantes de *Escherichia coli* TOP10 cuyos plásmidos purificamos. La calibración de la qPCR anidada se llevó a cabo en dos etapas: 1) preamplificación de E6-339 o E7-252 por 15 ciclos mediante PCR de punto final con diluciones logarítmicas seriadas de las construcciones control (10^4 - 10^7 moléculas de pPC301 o pCA401 por mezcla) y 2) qPCR anidada de los amplicones internos E6-152 y E7-170 con 1/50 de volumen de cada mezcla preamplificada para generar las familias de las curvas tipo y determinar los perfiles de desnaturalización térmica de los amplicones anidados. **RESULTADOS.** El rango útil fue de 10^4 - 10^7 moléculas de pPC301 o pCA401 por mezcla de preamplificación; los amplicones internos E6-152 y E7-170 sintetizados en las mezclas de qPCR anidada dieron familias de curvas reproducibles y valores de ciclos umbrales consistentes con el número de copias iniciales de las secuencias blanco y tuvieron perfiles de extinción térmica con picos a 87.34 °C y 86.76 °C, respectivamente. **CONCLUSIONES.** Con este trabajo determinamos las condiciones para cuantificar los genes E6 y E7 de VPH16 de manera reproducible y consistente mediante qPCR anidada en presencia de EvaGreen calibrada con diluciones logarítmicas seriadas de las secuencias blanco insertadas en las construcciones pPC301 (E6-339) o pCA401 (E7-252), y demostramos que los perfiles de fusión de los amplicones anidados E6-152 y E7-170 son específicos.

ABSTRACT

BACKGROUND. Cervical cancer (CC) is the second cause of death by cancer among women worldwide and the first one in most developing countries. In Mexico around 4,500 women die each year by CC. Persistent infection with "high risk" human papillomavirus (HR-HPV), mostly of the HPV type 16 (HPV16), is one of the major risk factors for the progression of precancerous and cancerous lesions, although not all infected women develop cancer. Integration of the viral genome with partial deletion of the viral E2 gene appears to be a decisive event in the progression to invasive CC. Since the Pap smear (Papanicolaou), primary screening test for CC, is known to have limited sensitivity and specificity to evaluate the progression of neoplastic lesions, it is desirable to develop more objective molecular markers of progression. A proposed molecular marker is the viral load (number of viral genes copies); another one is the integration of the viral genome estimated through quantitation of the viral E2 repressor and the E6 and E7 oncogene sequences to calculate the E2/E6 and E2/E7 ratios, whose values approach zero in the state of pure integration. Most integration studies have been performed using real-time PCR (qPCR) of the E2 and E6 genes in the presence of the SYBRGreen intercalating fluorochrome. In our laboratory an ultrasensitive nested qPCR method for E6 and E2 was developed recently using EvaGreen as fluorochrome. **METHODS.** Our strategy for this work included the generation of the pPC301 and pCA401 control constructs with E6- and E7-HPV16 inserts of 339 and 252 base pairs (E6-339 and E7-252) respectively, ligated to the pCR4-TOPO cloning vector, with which we obtained *Escherichia coli* TOP10 transformants and purified their plasmids. Nested qPCR calibration was carried out in two steps: 1) preamplification of the E6-339 or E7-252 amplicons for 15 cycles by end-point PCR using serial logarithmic dilutions of the control constructs (10^4 - 10^7 pCA401 or pPC301 molecules per mixture), and 2) nested qPCR of the E6-152 and E7-170 internal amplicons in mixtures containing 1/50 volume from each preamplified mixture to generate the type curves and to determine the thermal denaturation profiles of the nested amplicons. **RESULTS.** The useful range of constructs was 10^4 - 10^7 molecules of pPC301 or pCA401 molecules per preamplification mixture; the internal E6-152 and E7-170 amplicons synthesized in nested qPCR mixtures yielded reproducible curve families and threshold cycle values consistent with the initial copy number of the target sequences and had thermal extinction profiles with peaks at 87.34 ° C and 86.76 ° C, respectively. **CONCLUSIONS.** In this work we determined the conditions to quantify the E6- and E7-HPV16 gene sequences in a reproducible and consistent manner by nested qPCR with EvaGreen calibrated with serial logarithmic dilutions of the pPC301 (E6-339) or pCA401 (E7-252) constructs, and demonstrated that the denaturation profiles of the nested E6-152 and E7-170 amplicons are specific.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres a nivel mundial y la primera en los países en desarrollo. En México mueren cerca de 4,500 mujeres cada año (Arrossi et al. 2003). La infección persistente con virus del papiloma humano (VPH) denominados de “alto riesgo” (VPH-AR), principalmente el VPH tipo 16 (VPH16), es uno de los principales factores de riesgo para la progresión de las lesiones precancerosas y cancerosas del cuello uterino, aunque no todas las mujeres infectadas con VPH-AR desarrollan cáncer (Walboomers et al. 1999, Muñoz et al. 1993, zur Hausen 2002).

Las proteínas tempranas E1 y E2 de los VPH son importantes para la regulación transcripcional, la replicación y la segregación del DNA viral. La proteína E2 es un represor de la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7, responsables de la transformación maligna de las células (Dyson et al. 1989).

La integración del genoma viral parece ser un evento importante en la progresión de las lesiones cervicales hacia el cáncer cervical invasor (Hudelist et al. 2004, Tonon et al. 2001). Algunos investigadores han reportado integración temprana del DNA de VPH en lesiones de bajo grado y en infecciones asintomáticas (Andersson et al. 2005, Gallo et al. 2003, Kulmala et al. 2006, Peitsaro et al. 2002) mientras que otros han observado integración del DNA de VPH casi exclusivamente en lesiones de alto grado y carcinoma invasor (Hudelist et al. 2004, Klaes et al. 1999, Tonon et al. 2001). En el evento de integración del genoma viral al genoma celular asociado a la malignización por VPH-AR usualmente hay una interrupción del gen E2 con pérdida de la actividad del represor y sobreexpresión potencial de las oncoproteínas E6 y E7 que así promueven más eficientemente el desarrollo neoplásico (Dyson et al. 1989, Swan et al. 1999).

La prueba primaria de tamizaje del cáncer cervicouterino es el análisis microscópico de los raspados del cérvix o prueba de Papanicolaou que tiene una sensibilidad y especificidad limitada para determinar el grado o progresión de las lesiones precancerosas y cancerosas (Kitchener et al. 2006).

Entre los marcadores moleculares de la progresión de las lesiones neoplásicas del CaCu destaca la “carga viral” que consiste en la cuantificación del número de copias de los

genes virales por masa de DNA en los raspados cervicales que correlaciona con el grado de las lesiones (Andersson et al. 2005).

Otro marcador de progresión es la integración o “estado físico” del genoma viral que parece ser más sensible que la carga viral. La mayoría de los investigadores han determinado el estado físico del genoma viral por PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) de los genes E2 y E6 con SYBRGreen como agente intercalante; a partir del número de copias de ambos genes calculan los cocientes E2/E6 para correlacionar la carga viral y el estado físico del genoma viral con la progresión de las lesiones precancerosas y cancerosas (Tonon et al. 2001, Nagao et al. 2002, Peitsaro et al. 2002, Gallo et al. 2003, Fujii et al. 2005, Kulmala et al. 2006, Li et al. 2008).

El método se basa en que la integración del genoma viral se acompaña de interrupción del gen viral E2 que implica la pérdida de secuencias amplificables del gen E2. En el caso extremo de integración de todos los genomas virales el número de copias de E2 sería nulo y por lo tanto el valor del cociente E2/E6 sería cero. En el caso extremo de ausencia de integración, todos los genomas virales se encontrarían en la forma episomal por lo cual el número de copias de los genes E2, E6 y E7 serían iguales y el cociente E2/E6 sería 1. En caso de coexistir formas concomitantes (episomales e integradas) del genoma viral el número de copias del gen E2 sería menor que el de E6 y E7 y el cociente E2/E6 tendría un valor intermedio entre 0 y 1 (Nagao et al. 2002).

EvaGreen, nuevo fluorocromo intercalante del DNA, es más eficiente y más barato que SYBRGreen para determinar el contenido de DNA y cuantificar secuencias específicas mediante qPCR. En nuestro laboratorio desarrollamos un método para cuantificar el número de copias de E6 de VPH16 mediante qPCR en presencia de EvaGreen (López-Revilla y Hernández-Arteaga 2009) y más recientemente un método de qPCR anidada ultrasensible en el cual la preamplificación de las secuencias blanco mediante PCR de punto final previa a la qPCR en presencia del fluorocromo aumenta la sensibilidad alrededor de 10,000 veces (Valdez-Morales 2007, López-Revilla y Hernández Arteaga 2009, Hernández-Arteaga et al. 2010).

El propósito de este trabajo fue optimizar el método de qPCR anidada en presencia de EvaGreen para cuantificar los oncogenes virales E6 y E7 de VPH16 y poder utilizarlo en el futuro para determinar el número de copias de los genes y sus transcritos con el objeto de determinar la carga viral y la expresión de ambos oncogenes mediante la cuantificación

simultánea de las secuencias de DNA y de sus transcritos, así como la integración del genoma viral.

Nuestra estrategia incluyó la generación de dos construcciones derivadas del vector pCR4-TOPO con insertos de las secuencias de los oncogenes E6 y E7 de VPH16 amplificadas a partir de la línea celular SiHa: pPC301 (inserto: E6-339) y pCA401 (inserto: E7-252). Ambas construcciones fueron clonadas en *Escherichia coli* TOP10, purificadas y empleadas para calibrar la qPCR anidada.

La calibración de la qPCR anidada se llevó a cabo en dos etapas: 1) preamplificación de los insertos E6-339 y E7-252 completos por 15 ciclos mediante PCR de punto final en mezclas con diluciones logarítmicas seriadas de las clonas para obtener $10^4 - 10^7$ moléculas de pPC301 o pCA401 y 2) amplificación interna para generar los amplicones anidados (E6-152 y E7-170) mediante qPCR en mezclas que incluían EvaGreen y 1/50 de volumen de la mezcla de preamplificación correspondiente y obtener la familia de curvas tipo y los perfiles de desnaturalización térmica de los productos finales.

Las familias de curvas tipo obtenidas con las mezclas de calibración para cuantificar el número de copias de E6 y E7 fueron confiables y reproducibles y la preamplificación por 15 ciclos confirmó la sensibilidad de la qPCR anidada. El rango útil en las mezclas de preamplificación fue de 10^4 a 10^7 moléculas de pPC301 y pCA401. Los perfiles de desnaturalización térmica fueron específicos de los amplicones E6-152 y E7-170 con picos a 86.8 °C y 87.3 °C respectivamente.

Con este trabajo afinamos y optimizamos las condiciones para cuantificar las secuencias de los oncogenes E6 y E7 de VPH16 mediante qPCR anidada con EvaGreen. Con los métodos desarrollados hasta ahora en el laboratorio pretendemos cuantificar los genes E6, E7 y E2 simultáneamente en lesiones precancerosas y cancerosas causadas por VPH16 para determinar la carga de los dos oncogenes y del gen represor y luego cuantificar la transcripción simultánea de los tres genes virales. Esperamos que estos estudios futuros sirvan para encontrar marcadores moleculares cuantitativos de la progresión de las lesiones neoplásicas del cérvix más objetivos que los morfológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Condiciones para la amplificación de E6-339, E7-252, E6-152 y E7-170

Los iniciadores específicos para cada uno de los amplicones fueron diseñados a partir de la secuencia del genoma de VPH16 (GenBank No. Acc. NC_001526.1) (Tabla 1, Fig 1). Para obtener los amplicones de 339 pb del gen E6 y de 252 pb del gen E7 usamos como molde DNA de la línea celular SiHa, donada por el Dr. Alejandro García-Carrancá (Instituto Nacional de Cancerología).

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados

Longitud Amplicón (pb)	Ubicación (nt) VPH16	Nombre	Secuencia (5'→3')	T_m (°C)
E6-339	(103...441)	LPE6 RPE6	aatgtttcaggaccacagg caaaagccactgtgtcctga	60 60
E6-152	(104...256)	LPNTE6 RPNTE6	tgtttcaggaccacagga tgctttcgggattatgc	60 60
E7-252	(564...816)	LPE7 RPNT3	catggagatacacctacattgcat tggaagacctgtaatgggc	60 60
E7-170	(646...816)	SCHE7F RPNT3	atgacagctcagaggaggatg tggaagacctgtaatgggc	65 60

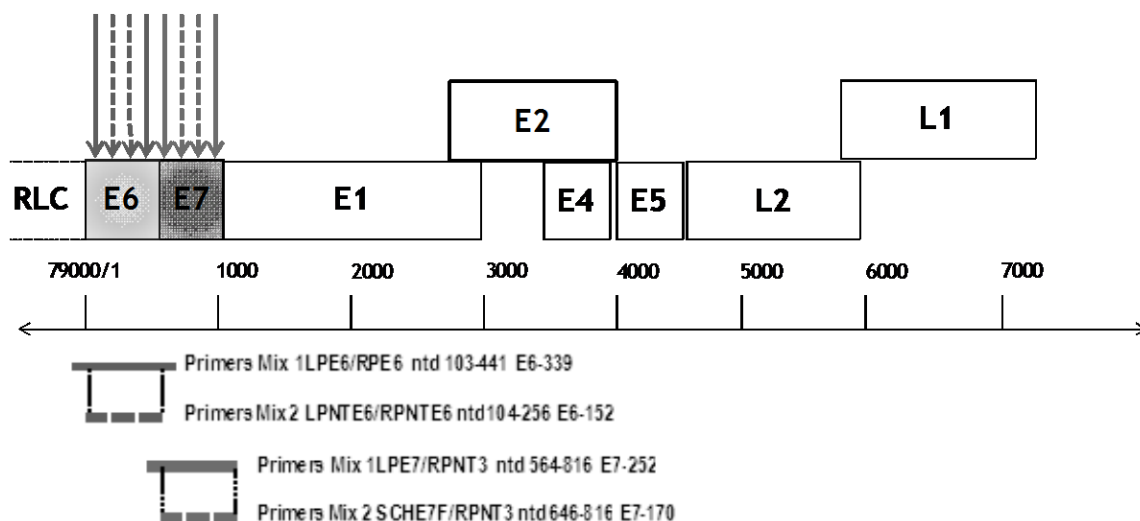


Fig. 1. Oligonucleótidos empleados: localización en el genoma de VPH16 y amplicones generados

Las parejas de oligonucleótidos LPE6/RPE6 y LPNTE6/RPNTE6 fueron diseñadas para generar los dos amplicones del gen E6, el mayor de 339 pb (nt 103-441) y el menor de 152 pb (nt 104-256), cuya secuencia está incluida en el primero. Las parejas de oligonucleótidos LPE7/RPNT3 y SCHE7F/RPNT3 fueron diseñadas para generar los dos amplicones del gen E7, el mayor de 252 pb (nt 564-816) y el menor de 170 pb (nt 646-816), cuya secuencia está incluida en el primero.

La temperatura de annealing de la pareja de iniciadores LPE6/RPE6 (E6-339) fue optimizada por medio de un gradiente de temperatura de 57.1 a 59.3 °C y para la pareja de iniciadores Fw-RPNT3/Re-LPE7 (E7-252) fue determinada probando el rango de 53.8 a 58.8 °C. Adicionalmente se optimizó la concentración de MgCl₂ mediante un gradiente de concentración (1-4 mM) con temperatura de annealing de 57 °C.

Para optimizar las condiciones de síntesis del amplicón de 152 pb del gen E6 y el de 170 pb del gen E7 (Tabla 1) empleamos 1 µL de la mezcla de amplificación previa de los amplicones E6-339 y E7-252 respectivamente. Hicimos amplificaciones en gradientes de temperatura, de concentración de MgCl₂ y de concentración de las parejas de iniciadores correspondientes (LPE7/ RPNT3 y SCHE7F/RPNT3). Las mezclas de amplificación fueron preparadas en 50 µL basándonos inicialmente en las condiciones utilizadas por Hernández-Arteaga et al. (2010). El programa de amplificación incluyó tres pasos: 1) desnaturalización inicial. 2) 35 ciclos de desnaturalización, annealing y extensión. 3) extensión final (Tabla 2).

Tabla 2. Programa del termociclador para amplificar E6-339 y E7-252

	Paso	Temperatura	Tiempo
1	<i>Desnaturalización inicial</i>	94 °C	4 min
2	<i>35 ciclos</i>		
	Desnaturalización	94 °C	30 seg
	Annealing	TO	60 seg
	Extensión	72 °C	60 seg
3	<i>Extensión final</i>	72 °C	5 min
4	Final	25 °C	∞

TO, temperatura óptima de annealing para cada pareja de iniciadores.

Amplificación de E6-339 y E7-252 para clonación

Para clonar los amplicones E6-339 y E7-252 preparamos mezclas de amplificación bajo las siguientes condiciones. La mezcla para E6-339 contenía 50 ng de DNA de SiHa y los siguientes componentes: agua MilliQ, buffer de PCR 1× (Invitrogen, Brasil), MgCl₂ 2 mM (Invitrogen, Brasil), dNTPs 0.05 µM c/u (Invitrogen, Brasil), mezcla de iniciadores Fw-RPE6/Re-LPE6 0.15 µM (Invitrogen) y Taq DNA polimerasa 2.5 U/µL (Invitrogen, Brasil) en volumen final de 50µL. La mezcla para E7-252 contenía los mismos componentes excepto por la mezcla de iniciadores Fw-RPNT3/Re-LPE7 0.15 µM (Invitrogen).

Construcción de pPC301 (E6-339) y pCA401 (E7-252) y obtención de transformantes

Los amplicones E6-339 y E7-252 fueron ligados al vector pCR4-TOPO (Invitrogen) y las construcciones resultantes fueron empleadas para obtener transformantes de *E. coli* TOP10 (Promega). Las mezclas de ligación de cada amplicón fueron preparadas en un volumen total de 6 μ L e incluían 2 μ L de cada amplicón, 1 μ L de la solución de sales pCR4-TOPO (Invitrogen) diluida 1:4, 2 μ L de agua MilliQ estéril y 1 μ L del vector pCR4-TOPO (Invitrogen). Las mezclas fueron incubadas 5 min a 23 °C en un termoblock (AccuBlock LabNet, D1100) y luego colocadas en hielo.

Añadimos 2 μ L de cada mezcla de ligación a un stock de 50 μ L de células de *E. coli* TOP10 electrocompetentes; mezclamos y transferimos la suspensión a una cubeta de 0.2 cm para electroporación (BioRad, Micro Pulser) que mantuvimos en hielo por 5 min y luego dimos un pulso de 25 μ F y 200 Ω a 2.5 kV. Inoculamos la mezcla electroporada en un tubo con 1 mL de medio Luria-Bertani (LB) con 30 μ g/mL de kanamicina (LB/Kn) que incubamos con agitación a 37 °C por 45 min para permitir la recuperación celular; después centrifugamos 1 min a 12,000 \times g en la microcentrífuga Hettich, decantamos el sobrenadante, mezclamos la pastilla celular con la gota remanente y sembramos 30 μ L en una caja de agar LB/Kn con un triángulo de vidrio estéril.

PCR de E6-339 y E7-252 y selección de clones transformantes de *E. coli* TOP10

De cada colonia transformante preparamos suspensiones celulares con 50 μ L de agua MilliQ estéril y las incubamos a 95 °C por 5 min. Preparamos mezclas de PCR de 50 μ L para E6-339 y E7-252 a las que añadimos 1 μ L de suspensión de cada colonia. Las mezclas para E6-339 y E7-252 contenían los componentes optimizados y fueron incubadas con el programa de termociclado apropiado. Las colonias que generaron los fragmentos correspondientes a E6-339 (PC301) y E7-252 (CA401) fueron sembradas nuevamente en agar LB/Kn a 37 °C.

Purificación de pPC301 y pCA401

La purificación (“midiprep”) de pPC301 (E6-339) y pCA401 (E7-252) fue realizada con el Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI). De las cepas PC301 y CA401 inoculamos la asada tomada de la colonia de una cepa transformante que

había sido clonada (mediante dos pases sucesivos de colonias aisladas en agar selectivo) en 3 mL de caldo LB/Kn. Incubamos en un tubo con agitación a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 2-4 unidades (celda de cuarzo de 1 mL, con vía óptica de 1 cm). Añadimos este preinóculo a un matraz con 250 mL de caldo LB/Kn que incubamos con agitación a 37 °C hasta alcanzar una turbiedad adecuada. Para cada plásmido centrifugamos el cultivo a $10,000\times g$ por 10 min a 20 °C, decantamos el sobrenadante y drenamos el caldo remanente invirtiendo el tubo sobre una toalla de papel. Resuspendimos la pastilla celular en 6 mL de medio para resuspensión (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, RNasa A 100 $\mu g/mL$, pH 7.5) y mezclamos el contenido del tubo suavemente por inversión. Agregamos 6 mL de solución de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1%) y mezclamos suavemente por inversión. Dejamos reposar la mezcla 4 min para asegurar la lisis y agregamos 10 mL de solución neutralizante (clorhidrato de guanidina 4.09 M, acetato de potasio 759 mM, ácido acético glacial 2.12 M, pH 4.8) y mezclamos suavemente por inversión. Mantuvimos el tubo 2-3 min en posición vertical hasta que apareció un precipitado blanquecino floculante. Colocamos una columna azul del Wizard System en un tubo Falcon de 50 mL, agregamos el lisado dentro de la columna e incubamos 2 min. Centrifugamos la columna azul a $1,500\times g$ por 5 min y colocamos una columna de unión blanca en un tubo Falcon de 50 mL. Añadimos el filtrado de la columna azul a la blanca y la centrifugamos a $1,500\times g$ por 3 min. A la columna de unión blanca añadimos 5 mL de solución de lavado y centrifugamos a $1,500\times g$ por 5 min. La solución de lavado fue descartada. Añadimos 20 mL de la solución para lavado de columna con etanol 95% y centrifugamos a $1,500\times g$ por 5 min. Descartamos el sobrenadante y volvimos a centrifugar a $1,500\times g$ por 10 min y nos aseguramos de haber eliminado todo el etanol tocando la punta de la columna con una toalla de papel. Entonces procedimos a la elución colocando la columna de unión blanca en un tubo Falcon nuevo de 50 mL, añadimos a la columna 600 μL de agua libre de nucleasas y esperamos 3 min, y colectamos en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Finalmente añadimos a la columna 400 μL de agua libre de nucleasas, centrifugamos a $1,500\times g$ por 5 min y colectamos en otro tubo Eppendorf de 1.5 mL.

Restricción de pPC301 y pCA401

Preparamos mezclas de restricción de 20 μ L para cada plásmido en tubos Eppendorf de 1.5 mL con 9 μ L de agua MilliQ estéril, 8 μ L de pPC301 o pCA401, 2 μ L de amortiguador # 3 para restricción (Tris-HCl 500 mM, MgCl₂ 100 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0 a 25 °C) (Invitrogen, Brasil) y 1 μ L de *EcoR* I (10 U/ μ L) (Invitrogen, Brasil). Incubamos las mezclas de restricción en el termoblock durante 90 min a 37 °C. Analizamos pPC301 y pCA401 intactos y restringidos mediante electroforesis en TAE-Agarosa 1% seguida de tinción con bromuro de etidio (1 mg/mL) por 15 min.

Pureza y concentración del DNA plasmídico

La pureza y concentración del DNA fue determinada con el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop, Thermo Scientific) empleando agua MilliQ estéril como blanco y 1 μ L de cada solución problema por triplicado. Calculamos el número de moléculas por nanogramo de plásmido con la fórmula del Genomics & Sequencing Center (<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>).

$$\text{No. de copias} = (\text{Masa} * 6.022 \times 10^{23}) / (\text{No. pb} * 10^9 * 650)$$

En donde:

No. de copias = número de copias del amplicón.

Masa = nanogramos de DNA/mol de plásmido.

No. pb = número de pb en la construcción (vector + amplicón).

Secuenciación de los insertos de pPC301 y pCA401

Un total de 3.4 μ g de pPC301 y 3.2 μ g de pCA401 fueron secuenciados en el LANBAMA (Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental, IPICYT, SLP. México). Adicionalmente enviamos a secuenciar 6.08 μ g de pPC301 y 2.56 μ g de pCA401 al LANGEBIO (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV, Irapuato, México). Las secuencias obtenidas fueron alineadas para generar la secuencia consenso de cada plásmido. Las secuencias fueron analizadas por el programa BLAST de búsqueda y alineación de secuencias nucleotídicas (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

para obtener los valores de similitud con las secuencias registradas en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Calibración de la qPCR anidada de E6-152

Primero diluimos pPC301 ($C_0 = 10 \text{ ng}/\mu\text{L} \rightarrow 2.157 \times 10^9 \text{ moléculas}/\mu\text{L}$) y obtuvimos diluciones logarítmicas seriadas en agua MilliQ estéril para obtener una serie con 2.157×10^9 a 2.157×10^2 copias/ μL) (Tabla 3). Preamplificamos E6-339 por 15 ciclos con la pareja de iniciadores Fw-RPE6/Re-LPE6 en las condiciones óptimas establecidas. Las mezclas contenían 1 μL de cada dilución seriada de pPC301 de concentración conocida.

A cada mezcla de qPCR anidada para E6-152 añadimos 1 μL (1/50 de volumen) de cada mezcla preamplificada y 2.5 μL de EvaGreen como fluorocromo. Corrimos la amplificación por 30 ciclos en el Rotor Gene 6000 con el programa optimizado.

Adicionalmente programamos un perfil de desnaturalización del amplicón generado de 75 °C a 95 °C con incrementos de 0.5 °C cada 5 seg.

Tabla 3. Diluciones logarítmicas seriadas de pPC301 ($C_0 = 120 \text{ ng}/\mu\text{L}$)

Clave	Componentes			Contenido de la diln	
	Espécimen	Agua	ng/ μL	Moléculas de pPC301/ μL	
$C_0/120$	C_0	10 μL	110 μL	10	2.157×10^9
10^{-1}	$C_0/12$	5 μL	45 μL	1	2.157×10^8
10^{-2}	10^{-1}	5 μL	45 μL	10^{-1}	2.157×10^7
10^{-3}	10^{-2}	5 μL	45 μL	10^{-2}	2.157×10^6
10^{-4}	10^{-3}	5 μL	45 μL	10^{-3}	2.157×10^5
10^{-5}	10^{-4}	5 μL	45 μL	10^{-4}	2.157×10^4

Calibración de la qPCR anidada de E7-170

Diluimos la clona pCA401 ($C_0 = 10 \text{ ng}/\mu\text{L} \rightarrow 2.202 \times 10^9 \text{ moléculas}/\mu\text{L}$) para obtener diluciones logarítmicas seriadas en agua MilliQ estéril equivalentes a 2.202×10^7 a 2.157×10^2 copias/ μL (Tabla 4). Preamplificamos el amplicón E7-252 por 15 ciclos con la pareja de iniciadores Fw-LPE7/Re-RPNT3 en las condiciones óptimas establecidas. Las mezclas contenían 1 μL de cada dilución seriada de pCA401 de concentración conocida.

A cada mezcla de qPCR anidada para E7-170 añadimos 1 μL (1/50 de volumen) de cada mezcla preamplificada y 2.5 μL de EvaGreen como fluorocromo. Corrimos la

amplificación por 30 ciclos en el Rotor Gene 6000 con el programa optimizado. Finalmente programamos un perfil de desnaturalización de 75 °C a 95 °C del amplicón generado con incrementos de 0.5 °C cada 5 seg.

Tabla 4. Diluciones logarítmicas seriadas de pCA401 ($C_0 = 58 \text{ ng}/\mu\text{L}$)

Clave	Componentes			Contenido de la dilución	
	Espécimen		Agua	ng/ μL	Moléculas pCA401/ μL
$C_0/58$	C_0	8.60 μL	41.40 μL	10	2.202×10^9
10^{-1}	$C_0/58$	5 μL	45 μL	1	2.202×10^8
10^{-2}	10^{-1}	5 μL	45 μL	10^{-1}	2.202×10^7
10^{-3}	10^{-2}	5 μL	45 μL	10^{-2}	2.202×10^6
10^{-4}	10^{-3}	5 μL	45 μL	10^{-3}	2.202×10^5
10^{-5}	10^{-4}	5 μL	45 μL	10^{-4}	2.202×10^4

RESULTADOS

Amplificación optimizada de los genes E6 y E7 de VPH16

La temperatura óptima de annealing para la amplificación de los productos E6-339 y E7-252 fue 57 °C y las concentraciones óptimas de MgCl₂ fueron 2.0 y 3.5 mM respectivamente. Las temperaturas óptimas de annealing para los amplicones anidados E6-152 y E7-170 fueron 59 °C y 56 °C y la concentración óptima de MgCl₂ para ambos casos fue 2.0 mM. La concentración óptima de dNTPs para el amplicón E7-170 fue 0.1 mM y la de los oligonucleótidos específicos SCHE7F/ RPNT3 fue 0.2 mM (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones óptimas para amplificar E6 y E7 de VPH16

Componente/condición	Unidades	E6-339	E7-252	E6-152	E7-170
Buffer de PCR	Concn	1×	1×	1×	1×
MgCl ₂	mM	2.0	3.5	2.0	2.0
dNTPs	mM	0.05	0.05	0.05	0.1
Iniciadores específicos	μM	0.15	0.15	0.15	0.2
Taq DNA polimerasa	U/μL	2.5	2.5	2.5	2.5
DNA	ng	50	1/50 ^a	50	1/50 ^a
Volumen final	μL	50	50	50	50
Temp de annealing	°C	57	57	59	56

^a Amplificación a partir de 1μL del amplicón directo E6-339 o E7-252.

Construcción de pPC301 y pCA401

La amplificación de E6-339 y E7-252 por PCR punto final bajo las condiciones óptimas dio una sola banda con el tamaño esperado para cada amplicón (Fig. 2). Las construcciones pPC301 y pCA401 con insertos de los amplicones E6-339 y E7-252, respectivamente, fueron obtenidas mediante ligación de los amplicones al vector de clonación y luego empleadas para obtener transformantes de *E. coli* TOP10.

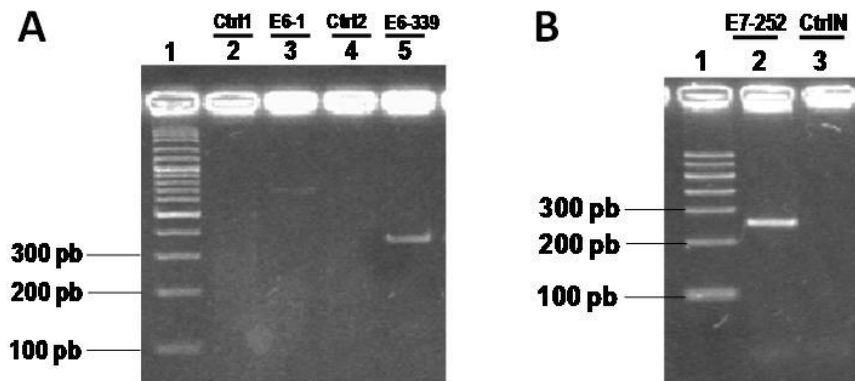


Fig. 2. Amplificación de E6-339 y E7-252 para generar los insertos

(A) Ctrl1, control negativo de E6-1. E6-1, amplicón de 645 pb de E6-1 (control positivo). Ctrl2, control negativo de E6-339. E6-339, amplicón de 339 pb de E6. Los componentes para el amplicón E6-1 (645 pb) fueron los usados por Hernández-Arteaga et al. (2010). (B) E7-252, amplicón de 252 pb de E7. CtrlN, control negativo.

Obtuvimos quince colonias transformantes a partir de la mezcla de ligación de E6-339, las cuales clonamos mediante dos pases sucesivos de colonias aisladas en agar LB/Kn. De la misma manera obtuvimos ocho clonas a partir de la mezcla de ligación de E7-252 (Fig. 3).

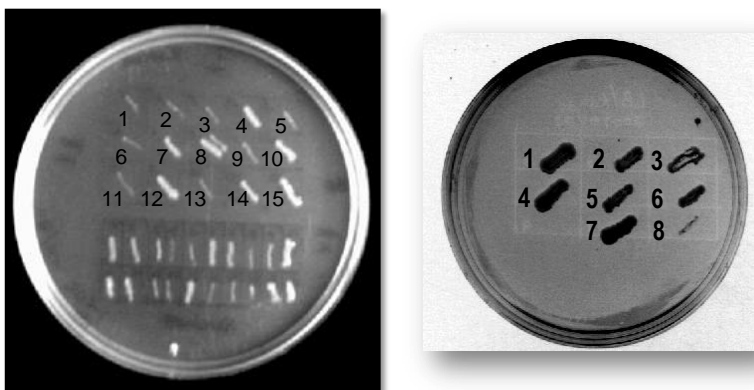


Fig. 3. Transformantes de *E. coli* obtenidas con las mezclas de ligación

A la izquierda se muestran las quince clonas de *E. coli* TOP10 transformadas por electroporación con el amplicón E6-339 ligado a pCR4-TOPO. A la derecha, las ocho clonas transformadas por electroporación con el amplicón E7-252 ligado a pCR4-TOPO.

PCR de las clonas transformantes

Amplificamos los insertos E6-339 y E7-252 con las parejas de oligonucleótidos respectivos a partir de suspensiones de las clonas candidato. Obtuvimos el amplicón E6-339 en las siete

clonas transformantes analizadas (Fig. 4) y el E7-252 en cinco de seis clonas analizadas (Fig. 5).

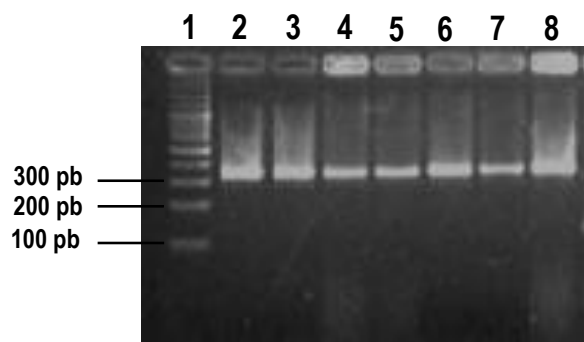


Fig. 4. Amplificación de E6-339 a partir de las siete clonas transformantes

La amplificación de E6-339 pb en las siete clonas transformantes obtenidas confirmó la presencia del inserto E6-339 clonado.

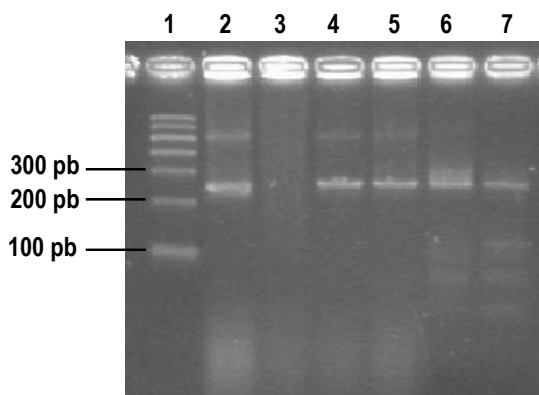


Fig. 5. Amplificación de E7-252 a partir de cinco de las seis clonas transformantes

La amplificación de E7-252 pb confirmó la presencia del inserto E7-252 en cinco de las seis clonas transformantes analizadas.

Purificación y número de copias de pPC301 y pCA401

Entre las clonas positivas a E6-339 y E7-252 seleccionamos dos, designadas PC301 (con el inserto E6-339) y CA401 (con el inserto E7-252), para hacer preparaciones en mayor escala (“midipreps”) de los plásmidos, a los cuales designamos pPC301 y pPCA401, respectivamente.

La midiprep de pPC301 contenía 120.8 ng/μL y la de pCA401 58.0 ng/μL, con cocientes A_{260}/A_{280} 1.83 y 1.95, respectivamente. Con la fórmula descrita en Métodos

calculamos que pPC301 contiene 2.157×10^8 moléculas/ng y pCA401 2.202×10^8 moléculas/ng (Tabla 6).

Tabla 6. Moléculas por nanogrammo de pPC301 y pCA401

Datos	pPC301	pPCA401
Inserto (pb)	339	252
Vector (pb)	3956	3956
Construcción total (pb)	4295	4208
PM de 1 pb (Da)	650	650
Número de Avogadro	$6.023E+23$	$6.023E+23$
Masa de 1 mol de plásmido (g)	$2.7918E+06$	$2.7352E+06$
Moléculas de plásmido/g	$2.1574E+17$	$2.2020E+17$
Moléculas de plásmido/ng	$2.1574E+08$	$2.2020E+08$

Patrones de restricción de pPC301 y pCA401

Para verificar que pPC301 y pCA401 contienen los amplicones E6-339 y E7-252 los sometimos a digestión con la endonucleasa *EcoR* I y comparamos la longitud de las formas intactas y lineales. Así confirmamos que pPC301 y pCA401 sí contienen los insertos E6-339 y E7-252 esperados (Fig. 6).

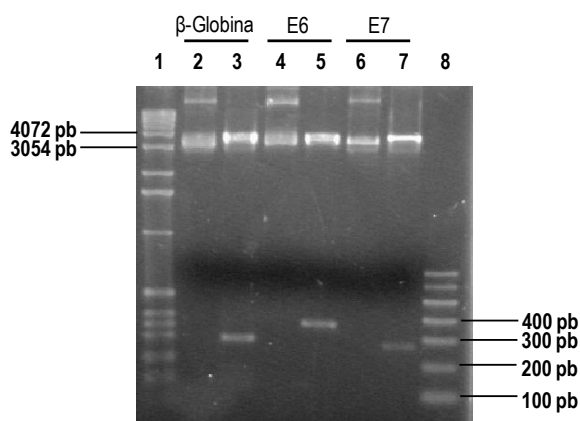


Fig. 6. Liberación de los insertos de pPC301 (E6-339) y pPCA401 (E7-252) con *EcoR* I

Carriles 2 y 3, plásmido control con el inserto de β -globina intacto y restringido, respectivamente. Carriles 4 y 6, pPC301 y pPCA401 intactos. Carriles 5 y 7, pPC301 y pPCA401 restringidos, con las bandas esperadas para los insertos E6-339 pb y E7-252.

Secuencias de los insertos E6-339 (de pPC301) y E7-252 (de pCA401)

Las secuencias de los insertos E6-339 de pPC301 (Fig. 7) y E7-252 de pCA401 (Fig. 8) fueron alineadas con las secuencias del GenBank. El inserto de pPC301 fue 99% similar a

la del gen E6 de VPH16 (Fig. 9) y la de pCA401 fue 100% similar a la del gen E7 de la variante de VPH16 presente en la línea celular SiHa (Fig. 10).

```

710 TCGCCCTAAT GTTTCAGGAC CCACAGCAGC GACCCAGAAA GTTACCACAG TTATGCACAG AGCTGCtAAC
640 AACTATACAT GATATAATAT TAGAATGTGT GtACTGCAAG CAACAGTTAC TGCGACGTGA GGATATGAC
570 TTTGCTTTTC GGGATTTATG CATAGTATAT AGAGATGGGA ATCCATATGC TGTATGTGAT AAATGTTTAA
500 AGTTTTATTC TAAAATTAGT GAGTATAGAC ATTATTGTTA TAGTGTGTAT GGAACAACAT TAGAACAGCA
430 ATACAACAAA CCGTTGTGTG ATTTGTTAAT TAGGTGTATT AACTGTtCAAA AGCCACTGTG TCCTGtAGGG
360 CGAATTCGTT TAAACCTGCA GGACTAGTCC CTTTtAGTGAG GGTTAATTCt GAGCTTGGCG TAATCATGTT
290 CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA
220 GTGTAAGCC TGGGGTGCCt AATGAGTGAG CTAtACTCACA TTAATTGCGT TGGCCTACT GCCCGCTTTC
150 CAGTCGGGAA ACCTGTCGTG CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GtTTTTGCGTA
080 TTGGGCGCTC

```

Fig. 7. Secuencia del inserto E6-339

La secuencia de E6-339 obtenida por análisis del inserto de pPC301 abarca los nucleótidos 364-703 del vector pCR4-TOPO. La secuencia en *cursivas* corresponde a la del gen E6 (NC_001526.1). La “t” de la posición 644 corresponde al mismatch Adenina por Timina. Las secuencias con fondo negro (nucleótidos 703-683 y 384-364) corresponden a los iniciadores Re-LPE6/Fw-RPE6, respectivamente, empleados para generar el amplicón. La secuencia con fondo gris corresponde al iniciador T3 utilizado para secuenciar el plásmido. El resto de la secuencia corresponde al vector de clonación.

```

547 CATGGAGATA CACCTACATT GCAtTGAATAT ATGTTAGATT TGCAACCAGA GACAtACTGAT CTCTACTGTT
477 ATGAGCAATT CAATGACAGC TCAGAGGAGG AGGATGAAAT AGATGGTCCA GCTGGACAAG CAGAtACCGGA
407 CAGAGCCCAT TACAATATTG TAACtTTTTG TTGCAAGTGT GACTCTACGC TTCGtTTGTG CGTACAAAGC
337 ACACACGTAG ACATTCGTAC TTTGGAAGAC CTGTTAATGG GtAAGGGCGA ATTCGTTTAA ACCTGCAGGA
267 CTAGTCCCTT TAGTGAGGGT TAATtCTGAG CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT
197 TGTATCCGC TCACAATTCC ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAGTG TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT
127 GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC GCTACTGCC CGCTTTCCAG TCGGAAACC TGTCGTGCCA
057 GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG GAGAGGCGGT

```

Fig. 8. Secuencia del inserto E7-252

La secuencia de E7-252 pb obtenida por análisis del inserto de pCA401 abarca los nucleótidos 296-547 del vector pCR4-TOPO. La secuencia en *cursivas* corresponde a la del gen E7 (NC_001526.1). Las secuencias con fondo negro (nucleótidos 295-315 y 523-547) corresponden a los iniciadores Re-LPE7/Fw-RPNT3 empleados para generar el amplicón. La secuencia en fondo gris corresponde al iniciador T3 utilizado para secuenciar el plásmido. El resto de la secuencia corresponde al vector de clonación.

```

Query 1 AATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCT 61
      |||
Sbjct 103 AATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCA 163

Query 62 AACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGTAAGCAACAGTTACTGCGACG 121
      |||
Sbjct 164 AACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCGACG 223

Query 122 TGAGGTATATGACTTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATATAGAGATGGGAAATCCATA 181
      |||
Sbjct 224 TGAGGTATATGACTTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATATAGAGATGGGAAATCCATA 283

Query 182 TGCTGTATGTGATAAATGTTAAAGTTTATTCTAAAATTAGTGAGTATAGACATTATTG 241
      |||
Sbjct 284 TGCTGTATGTGATAAATGTTAAAGTTTATTCTAAAATTAGTGAGTATAGACATTATTG 343

Query 242 TTATAGTGTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAACAACCGTTGTGTGATTTGTT 301
      |||
Sbjct 344 TTATAGTGTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAACAACCGTTGTGTGATTTGTT 403

Query 302 AATTAGGTGATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGA 340
      |||
Sbjct 404 AATTAGGTGATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGA 442

```

Fig. 9. Alineación del inserto E6-339

La secuencia del inserto E6-339 de pPC30 es 99% idéntica (339/340) a la del gen de referencia E6 gb|FJ610147.1 (GenBank 19412733). El inserto contiene el mismatch A60T.

```

Query 1 CATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGAT 60
      |||
Sbjct 6 CATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGAT 65

Query 61 CTCTACTGTTATGAGCAATTC AATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCA 120
      |||
Sbjct 66 CTCTACTGTTATGAGCAATTC AATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCA 125

Query 121 GCTGGACAAGCAGAACC GGACAGAGCC CATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGT 180
      |||
Sbjct 126 GCTGGACAAGCAGAACC GGACAGAGCC CATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGT 185

Query 181 GACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGAC 240
      |||
Sbjct 186 GACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGAC 245

Query 241 CTGTTAATGGGCA 253
      |||
Sbjct 246 CTGTTAATGGGCA 258

```

Fig. 10. Alineación del inserto E7-252

La secuencia del inserto E7-252 de pCA401 es 100% idéntica (253/253) a la del gen de referencia E7 gb|AF001599.1 (GenBank 2990090).

Calibración de la qPCR anidada del amplicón E6-152

Partiendo de diluciones logarítmicas seriadas de pPC301 con 2.157×10^7 a 2.157×10^4 copias/ μ L preparamos las mezclas individuales para la preamplificación por 15 ciclos. Las mezclas individuales para amplificación de E6-152 por qPCR anidada contenían 1 μ L de las mezclas preamplificadas.

El rango útil para cuantificar el número de copias de E6-152 fue 2.157×10^4 - 2.157×10^7 moléculas de pPC301 por mezcla, con eficiencia 0.99 (99%) (Tabla 7, Fig. 11). El coeficiente de correlación con la recta fue $R^2 = 0.99651$, con $\Delta Ct_{avg} = 3.3$ (Fig. 12). El pico principal de fusión de E6-152 ocurrió a $87.34 \text{ }^\circ\text{C}$ (Tabla 8, Fig. 13). Concluimos que la familia de curvas de amplificación de E6-152 fue consistente con el número inicial de copias de pPC301, que la qPCR anidada permite cuantificar de manera confiable entre 2.157×10^4 y 2.157×10^7 moléculas de pPC301 y que el perfil de fusión del amplicón final es reproducible y específico.

Tabla 7. Calibración de la qPCR anidada de E6-152

Clave	Iniciadores	Copias de E6-152	Eficiencia de la reacción	Ct	ΔCt	ΔCt_{avg}	Valor del ciclo umbral
CtrlNeg2	F, R	0.0	99%	---	---	---	0.50
1	F, R	2.157×10^7		7.40	2.91	3.3	
2	F, R	2.157×10^6		10.31	3.24		
3	F, R	2.157×10^5		13.55	3.82		
4	F, R	2.157×10^4		17.37	---		

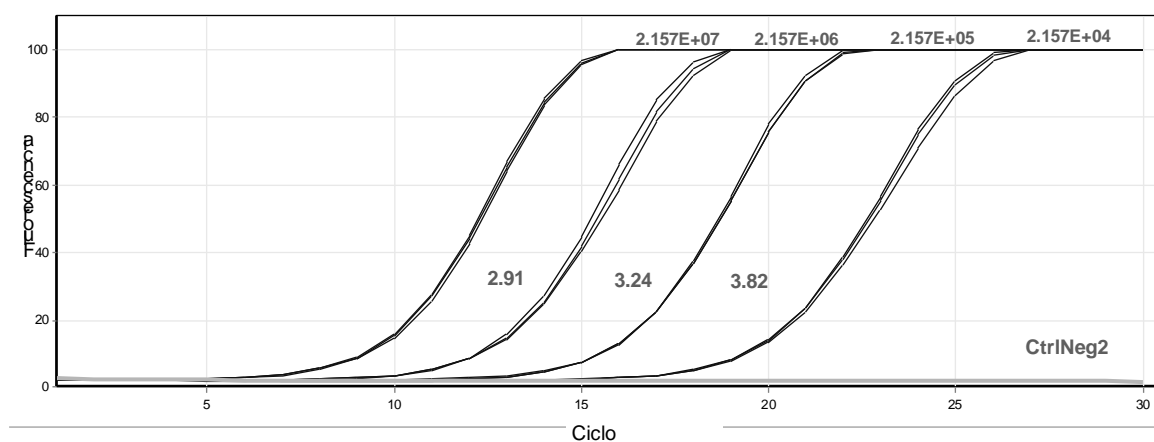


Fig. 11. Familia de curvas de qPCR anidada para E6-152

Las curvas de qPCR anidada por triplicado fueron reproducibles, dependieron del número de copias iniciales de pPC301 y fueron preparadas con 1/50 de volumen de mezclas que habían sido preamplificadas por 15 ciclos. Los valores promedio de Ct en función del número de copias iniciales de plásmido con la secuencia blanco en las mezclas de preamplificación fueron los siguientes: Ct 1 = 7.40 (2.157×10^7 copias), Ct 2 = 10.31 (2.157×10^6 copias), Ct 3 = 13.55 (2.157×10^5 copias), Ct 4 = 17.37 (2.157×10^4 copias). La gráfica muestra el incremento de los valores de Ct con cada dilución y el promedio $\Delta Ct_{avg} = 3.3$. Valor del ciclo umbral = 0.50. El control negativo (CtrlNeg2, mezcla sin ADN) no emitió fluorescencia.

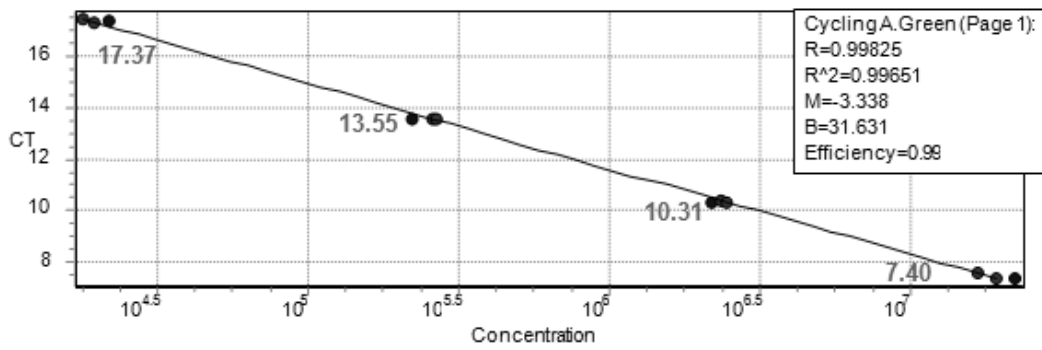


Fig. 12. Regresión lineal de qPCR anidada de E6-152

Curva tipo calculada por regresión lineal de Ct vs log del número de copias de pPC301. Parámetros: $R^2 = 0.99651$, pendiente = 3.3, eficiencia de reacción = 0.99.

Tabla 8. Picos del perfil de fusión térmica de E6-152

No.	Dil	ID	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7	Peak 8
1	1E+07	St	68.0	70.0	72.0	74.0	76.0	87.3	92.0	93.8
2	1E+07	d	69.0	71.0	73.0	75.0	77.0	86.8	92.0	94.0
3	1E+07	d	69.0	71.0	73.0	75.0	77.0	87.3	92.0	93.8
4	1E+06	St	69.0	71.0	73.0	75.0	77.0	87.3	92.0	93.8
5	1E+06	d	68.0	70.0	72.0	74.0	76.0	87.3	91.8	93.8
6	1E+06	d	69.0	71.0	73.0	75.0	81.5	86.7	92.0	94.0
7	1E+05	St	68.0	70.0	72.0	74.0	76.0	86.8	92.0	93.8
8	1E+05	d	69.0	71.0	73.0	75.0	86.7	87.6	93.8	94.0
9	1E+05	d	69.0	71.0	73.0	75.0	82.2	87.3	92.0	93.8
10	1E+04	St	68.0	70.0	72.0	78.8	86.8	87.3	93.8	
11	1E+04	d	69.0	71.0	77.3	86.8	92.0	87.3		
12	1E+04	d	69.0	71.0	78.3	86.8	92.0	87.3		
13	CtrlNeg2									

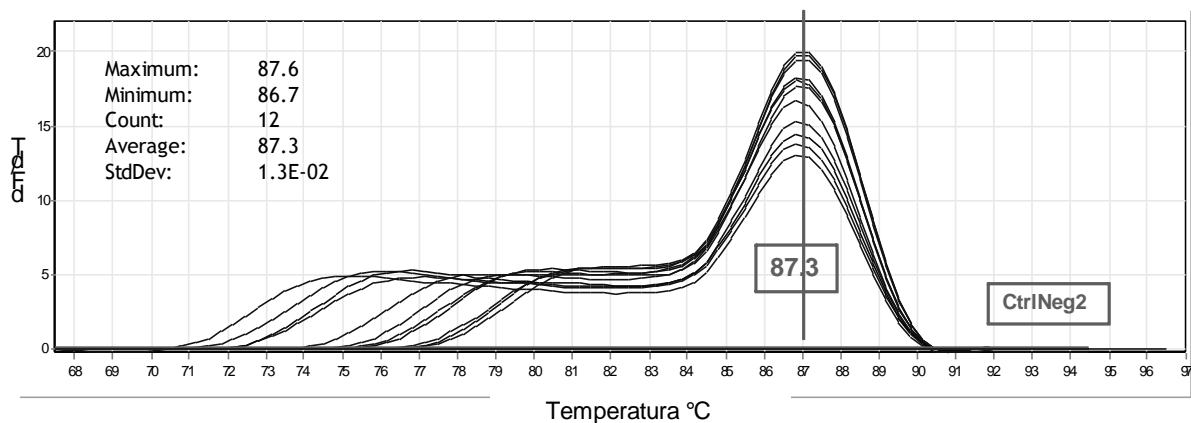


Fig. 13. Perfil de fusión de E6-152

El perfil de fusión del producto principal de amplificación es específico e idéntico en todas las mezclas, con un pico a 87.34 °C.

Calibración de la qPCR anidada del amplicón E7-170

Con diluciones logarítmicas seriadas de pCA401 con 2.202×10^7 hasta 2.202×10^4 copias/ μL preparamos las mezclas individuales para la preamplificación por 15 ciclos. Las mezclas individuales para amplificación de E7-170 por qPCR anidada contenían 1 μL de las mezclas preamplificadas.

El rango útil para cuantificar el número de copias de E7-170 fue 2.202×10^4 - 2.202×10^7 , con eficiencia 0.98 (98%) (Tabla 9, Fig. 14). El coeficiente de correlación con la recta fue $R^2 = 0.99502$ (Fig. 15), con $\Delta\text{Ct}_{\text{avg}} = 3.3$. El pico de fusión de E7-170 ocurrió a $86.76 \text{ }^\circ\text{C}$ (Tabla 10, Fig. 16). Concluimos también que la familia de curvas de amplificación de E7-170 fue consistente con el número inicial de copias de pCA401, que la qPCR anidada permite cuantificar entre 2.202×10^4 y 2.202×10^7 moléculas de pCA401 y que el perfil de fusión del amplicón final es reproducible y específico.

Tabla 9. Calibración de la qPCR anidada de E7-170

Clave	Iniciadores	Copias de E7-170	Eficiencia de la reacción	Ct	ΔCt	$\Delta\text{Ct}_{\text{avg}}$	Valor del ciclo umbral
CtrlNeg2	F, R	---	98%	---	---	---	0.50
1	F, R	2.202×10^7		7.09	2.9	3.3	
2	F, R	2.202×10^6		9.99	3.25		
3	F, R	2.202×10^5		13.24	3.92		
4	F, R	2.202×10^4		17.16	---		

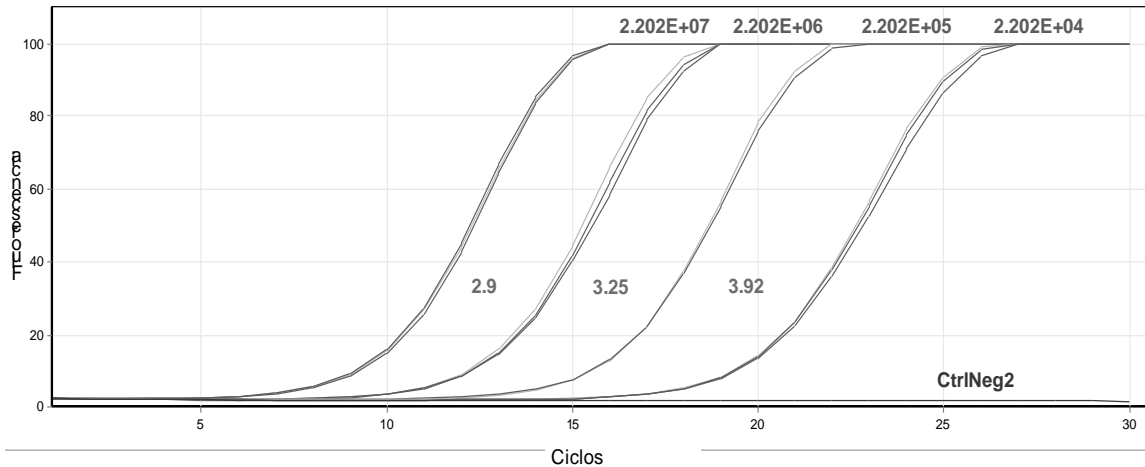


Fig. 14. Familia de curvas de qPCR anidada de E7-170

Las curvas de qPCR anidada por triplicado fueron reproducibles, dependieron del número de copias iniciales de pCA401 y fueron preparadas con 1/50 de volumen de mezclas que habían sido preamplificadas por 15 ciclos. Los valores promedio de Ct en función del número de copias iniciales de plásmido con la secuencia blanco en las mezclas de preamplificación fueron los siguientes: Ct 1 = 7.09 (2.202×10^7 copias), Ct 2 = 9.99 (2.202×10^6 copias), Ct 3 = 13.24 (2.202×10^5 copias), Ct 4 = 17.16 (2.202×10^4 copias). La gráfica muestra el incremento de los valores de Ct con cada dilución y el promedio $\Delta Ct_{avg} = 3.3$. Valor del ciclo umbral = 0.50. El control negativo (CtrlNeg2, mezcla sin ADN) no emitió fluorescencia.

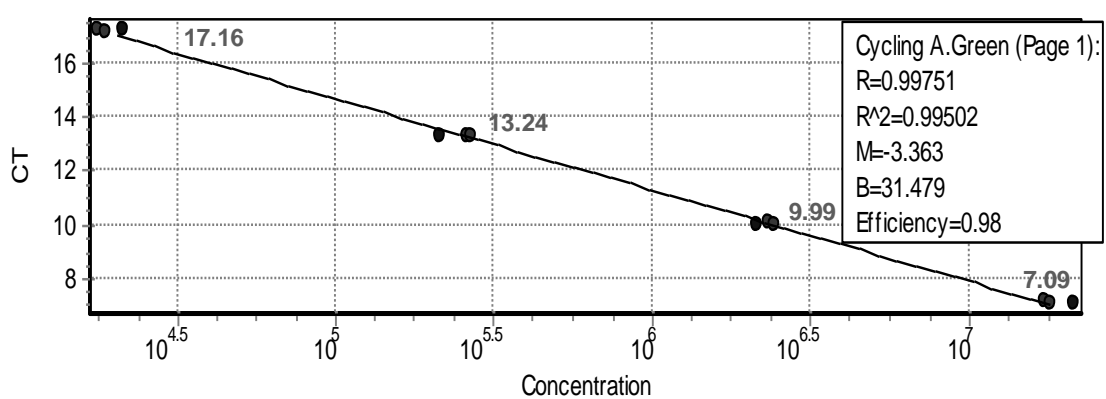


Fig. 15. Regresión lineal de qPCR anidada de E7-170

Regresión lineal de Ct Vs log del número de copias de pCA401. Parámetros de esta familia de curvas tipo: $R^2 = 0.99502$, pendiente = 3.3, eficiencia de reacción = 0.98.

Tabla 10. Picos del perfil de fusión térmica de E7-170

No.	Dil	ID	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7	Peak 8
1	1E+07	St	68.0	70.0	72.0	74.0	76.0	86.8	92.0	93.8
2	1E+07	d	69.0	71.0	73.0	75.0	77.0	86.8	92.0	94.0
3	1E+07	d	69.0	71.0	73.0	75.0	77.0	86.8	92.0	93.8
4	1E+06	St	69.0	71.0	73.0	75.0	77.0	86.8	92.0	93.8
5	1E+06	d	68.0	70.0	72.0	74.0	76.0	86.7	91.8	93.8
6	1E+06	d	69.0	71.0	73.0	75.0	81.5	86.7	92.0	94.0
7	1E+05	St	68.0	70.0	72.0	74.0	76.0	86.8	92.0	93.8
8	1E+05	d	69.0	71.0	73.0	75.0	86.7	86.8	93.8	93.8
9	1E+05	d	69.0	71.0	73.0	75.0	82.2	86.7	92.0	93.8
10	1E+04	St	68.0	70.0	72.0	78.8	86.8	86.7	93.8	
11	1E+04	d	69.0	71.0	77.3	86.8	92.0	86.9		
12	1E+04	d	69.0	71.0	78.3	86.8	92.0	86.9		
13	CtrlNeg2									

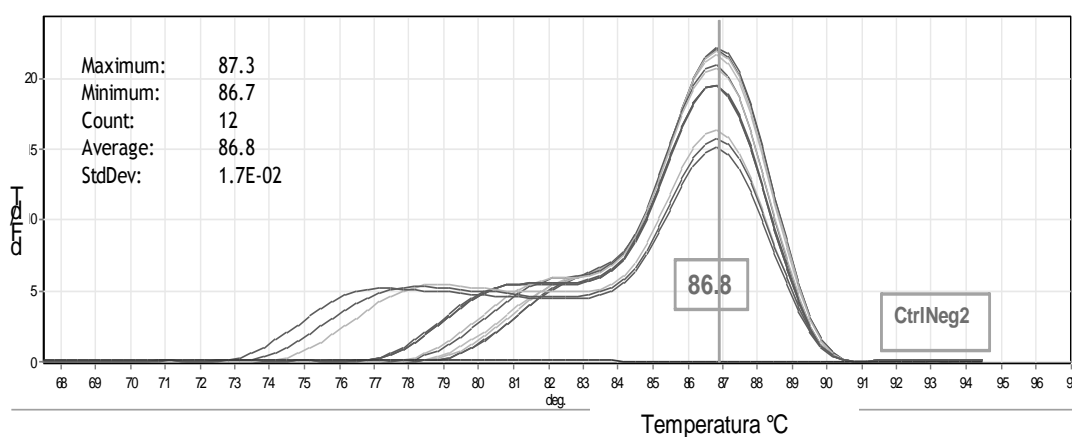


Fig. 16. Perfil de fusión de E7-170

El perfil de fusión del producto principal de amplificación es específico e idéntico en todas las mezclas, con un pico a 86.76 °C.

DISCUSIÓN

El análisis de PCR de las colonias transformantes comprobó la inserción de los amplicones E6-339 y E7-252 y a partir de estos resultados generamos, clonamos y ensayamos las cepas transformantes PC301 y PCA401 que contienen las construcciones pPC301 y pPCA401, respectivamente. Las midipreps de dichas cepas rindieron 120 ng/ μ L y 58 ng/ μ L de DNA plasmídico, comparables con el rendimiento de pHV101 obtenido por Hernández-Arteaga et al. (2010).

La restricción de las construcciones con *EcoR* I generó los dos fragmentos esperados del vector y de cada inserto (Fig. 5). Las secuencias con altos valores de identidad (E_{value}) de los productos de PCR de los insertos de cada clona ($E7 = 2e-128$, $E6 = 1e-175$) correspondieron con los esperados para los genes E6 y E7 de VPH16 y sugieren que pPC301 y p401 serían confiables como fuente de secuencias blanco para calibrar la qPCR de E6 y E7.

Las construcciones con los insertos de interés efectivamente resultaron útiles como moldes para cuantificar los genes E6 y E7 mediante qPCR anidada (Figs. 12 y 15). Nagao et al. (2002) usaron plásmidos con el genoma completo de VPH16 como referencia para la cuantificación de E2-VPH16. El uso de plásmidos que solamente contienen las secuencias de los genes de interés en los ensayos de qPCR probablemente es más limpio, pues podría prevenir la generación de productos de amplificación inespecíficos.

El diseño de los oligonucleótidos directos y anidados fue esencial para asegurar el éxito de las siguientes etapas.

La optimización de la amplificación de E6-152 y E7-170 fue realizada mediante gradientes de temperaturas de annealing así como de concentración de $MgCl_2$, dNTPs y oligonucleótidos. Con las condiciones optimizadas pudimos obtener las familias de curvas esperadas a partir de mezclas preamplificadas con diluciones logarítmicas seriadas de las secuencias blanco que contienen un número inicial conocido de copias.

Concluimos que las curvas tipo de qPCR anidada para E6-152 y E7-170 son reproducibles y consistentes con el número inicial de copias a partir de los parámetros promedio obtenidos en tres experimentos independientes con muestras por triplicado de E6-152 ($\Delta Ct_{\text{avg}} = 3.3$, $R^2 = 0.99651$, pendiente = 3.3, eficiencia de amplificación = 0.99) y E7-

170 ($\Delta Ct_{avg} = 3.3$, $R^2 = 0.99502$, pendiente = 3.3, eficiencia de amplificación = 0.98) en mezclas con 1 μ L de diluciones logarítmicas seriadas de E6-339 (2.157×10^4 a 2.157×10^7 moléculas de pPC301) y E7-252 (2.202×10^4 a 2.202×10^7 moléculas de pCA401) que habían sido preamplificadas por 15 ciclos

Durante el desarrollo de la calibración confirmamos que el error experimental debe ser minimizado, especialmente el derivado de la medición de volúmenes al diluir las construcciones que contienen las secuencias amplificables. La dispersión en esta etapa afecta considerablemente la cuantificación en la qPCR anidada.

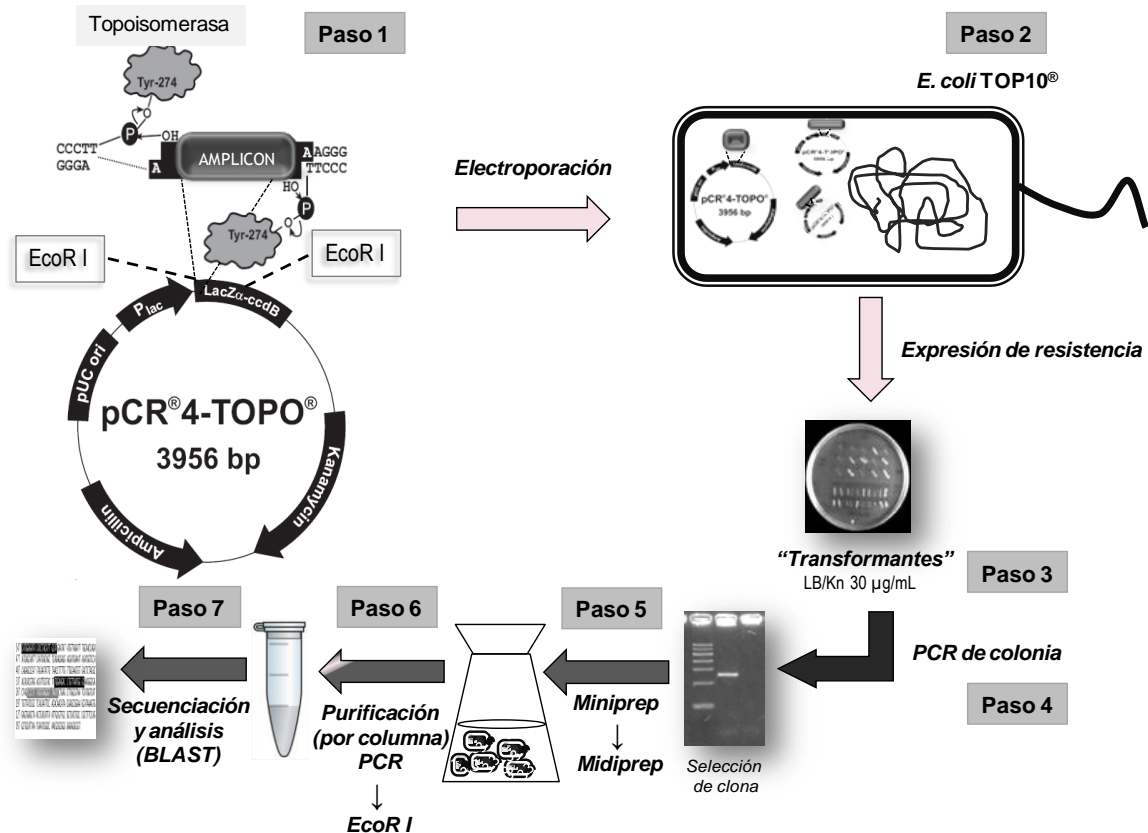
La pérdida de fluorescencia de los amplicones presentes en las mezclas de qPCR por efecto del aumento de la temperatura permite calcular la primera derivada de esta función ($-dFU/dT$) para generar los “perfiles de fusión” (i.e., valores de $-dFU/dT$ máximos) con picos que dependen de la longitud del amplicón, del contenido de GC y la distribución de bases a lo largo de las cadenas del DNA. Los picos de los perfiles de fusión de los amplicones E6-152 y E7-170 fueron específicos y correspondieron a 87.34 °C y 86.76 °C respectivamente (Figs. 13 y 16).

Con este trabajo determinamos las condiciones apropiadas para cuantificar los genes E6 y E7 de VPH16 mediante qPCR anidada con EvaGreen, dado que las curvas tipo fueron reproducibles y consistentes y demostramos además que los amplicones E6-152 y E7-170 son específicos. Estamos pues preparados para llevar a cabo la cuantificación simultánea de E6 y E7 en las lesiones neoplásicas del cérvix causadas por VPH16.

REFERENCIAS

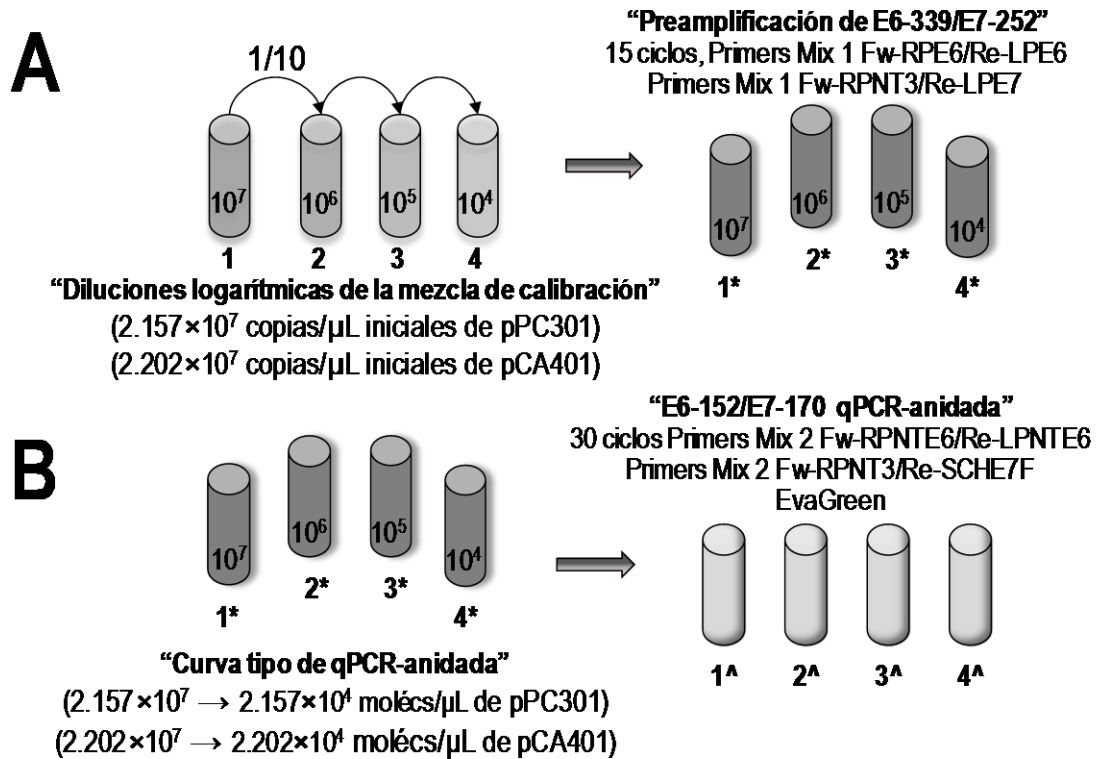
- Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B.** Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer* 92: 2195-2200, 2005.
- Arrossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM.** Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex* 45 Suppl 3: S306-314, 2003.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E.** The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937, 1989.
- Fujii T, Masumoto N, Saito M, Hirao N, Niimi S, Mukai M, Ono A, Hayashi S, Kubushiro K, Sakai E, Tsukazaki K, Nozawa S.** Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagn Mol Pathol* 14: 103-108, 2005.
- Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, Sanseverino F, Giovagnoli MR, Vecchione A, Giordano A.** Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol* 56: 532-536, 2003.
- Hernandez-Arteaga S and Lopez-Revilla R.** Ultrasensitive quantitation of human papillomavirus type 16 E6 oncogene sequences by nested real time PCR. *Infect Agent Cancer* 5: 9, 2010.
- Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, Czerwenka KF.** Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* 92: 873-880, 2004.
- Kitchener HC, Castle PE, Cox JT.** Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/63-70, 2006.
- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M.** Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 59: 6132-6136, 1999.
- Kulmala SM, Syrjanen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, Syrjanen KJ, Johansson BC.** Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol* 59: 513-517, 2006.
- Li W, Wang W, Si M, Han L, Gao Q, Luo A, Li Y, Lu Y, Wang S, Ma D.** The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 134: 1355-1361, 2008.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Vergara A, del Moral A, Muñoz MT, Tafur L, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P, et al.** Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2: 423-431, 1993.
- Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, Hongo A, Kodama J, Itoh S, Kudo T.** Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40: 863-867, 2002.
- Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S.** Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 40: 886-891, 2002.
- Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, Icenogle JP.** Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol* 37: 1030-1034, 1999.
- Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, Zinovich JB, Galuppo J, Alonio LV, Teyssie AR.** Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol* 21: 129-134, 2001.
- Valdez-Morales E.** *Cuantificación del gen E2 del papilomavirus humano tipo 16 por PCR anidada en tiempo real en displasias del cuello uterino* (Maestría en Ciencias (Biología Molecular)). San Luis Potosí, S.L.P.: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, 2007.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N.** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12-19, 1999.
- zur Hausen H.** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-350, 2002.

ANEXOS



Clonación de los amplicones E6-339 y E7-252 generados a partir de DNA de células SiHa

Paso 1. El amplicón E6-339 (nt 103-441) fue amplificado con la pareja de oligonucleótidos LPE6/RPE6 y el E2-252 con la pareja RPNT3/LPE7 a partir de DNA de la línea celular SiHa (transformada por VPH16). Cada amplicón fue ligado en un vector pCR4-TOPO. Paso 2. Transformación por electroporación de *E. coli* TOP10 con las mezclas de ligación con cada amplicón. Paso 3. Obtención de transformantes candidato, resistentes a kanamicina. Paso 4. Identificación de las clonas apropiadas mediante amplificación de E6-339 y E7-252 a partir de las transformantes identificadas y clonación de las mismas mediante dos pasos sucesivos de siembra por estría en agar LB con kanamicina. Paso 5. "Midiprep" de los plásmidos seguida de restricción con EcoRI para verificar que contienen los insertos esperados. Paso 6. Purificación de las construcciones y verificación de que sirven de molde para amplificar E6-339 y E7-252. Paso 7. Secuenciación y alineación de los insertos E6-339 y E7-252.



Calibración de la qPCR anidada

Se llevó a cabo en dos etapas: 1) preparación de mezclas de preamplificación de E6-339 y E7-252 por 15 ciclos mediante PCR de punto final en mezclas con 1 μL de diluciones logarítmicas seriadas de pPC301 y pCA401 (10⁷ → 10⁴ moléculas) y 2) preparación de las mezclas de qPCR anidada con 1 μL de cada mezcla preamplificada para generar los fragmentos internos y generar las familias de curvas de fluorescencia de E6-152 y E7-170 y los perfiles de desnaturalización.