



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**La carga de virus del papiloma humano tipo 16 no  
correlaciona con las lesiones neoplásicas del  
cérvix y es consistente con deleciones de los  
genes virales *E2* y *E6***

Tesis que presenta  
**Luisa Eugenia del Socorro Hernández-Arteaga**

Para obtener el grado de  
**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

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

San Luis Potosí, S.L.P.

Junio de 2011



## CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS

La tesis “**La carga de virus del papiloma humano tipo 16 no correlaciona con las lesiones neoplásicas del cérvix y es consistente con deleciones de los genes virales E2 y E6**” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Luisa Eugenia del Socorro Hernández Arteaga** y aprobada el 26 de mayo 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. Juan Pedro Luna Arias  
Asesor externo

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz  
Asesora

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Gerardo Alfonso Anguiano Vega  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Barajas López  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rubén López Revilla  
Director

## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

El trabajo de esta tesis fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria, 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 una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (177112) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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

## Acta de Examen de Grado

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

En la ciudad de San Luis Potosí a los 3 días del mes de junio del año 2011, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Carlos Barajas López</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruíz</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Gerardo Alfonso Anguiano Vega</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Juan Pedro Luna Arias</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>CINVESTAV</b>
<b>Dr. Rubén Hipólito López Revilla</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Luisa Eugenia del Socorro Hernández Arteaga**

sobre la Tesis intitulada:

*La carga de virus del papiloma tipo 16 no correlaciona con el grado de las lesiones neoplásicas del cérvix y es consistente con deleciones de los genes virales E2 y 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 18:25 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 3 días del mes de junio de 2011.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Bomilla Marín**  
Secretario Académico



## **DEDICATORIAS**

**A DIOS LE AGRADEZCO Y DEDICO ESTE TRABAJO  
MIL GRACIAS POR LA OPORTUNIDAD  
GRACIAS POR LAS CIRCUNSTANCIAS, POR LAS PERSONAS Y LOS MEDIOS  
QUE PUSO EN MI CAMINO PARA CULMINAR ESTA ETAPA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Doctor Rubén López Revilla por su gran trayectoria y las contribuciones realizadas no sólo a mi trabajo sino a nuestro país, agradezco todo lo que me ha enseñado (como —orónimo”) es para mí un honor haber sido su estudiante pues ha sido un gran maestro, gracias por sus atenciones y consejos y un enorme agradecimiento a su esposa que lo cuida y lo respalda tanto.

Al laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria.

A mis compañeros y amigos que están y estuvieron en el grupo, por su ayuda, compañerismo y el cordial ambiente de trabajo para desarrollar nuestros proyectos: Claudia, Mireya, Juan Manuel, Raúl, Gerardo, Paty, Estela, Julio, Miriam, Adriana, Andrés, Merit, Lalo, Carlos, Luz Aurora, Marco, Miguel, Aurora L. y Martha.

Al Dr. Alejandro García Carrancá del Instituto Nacional de Cancerología de la Secretaría de Salud, por su interés en este trabajo y por las muestras de DNA de raspados cervicales que nos proporcionó.

Al M.C. Julio Juárez Álvarez por su ayuda en el análisis estadístico.

Al Dr. Gerardo Alfonso Anguiano, por su ayuda en el procesamiento de las últimas muestras.

Al Q.F.B. Raúl de la Rosa Martínez por la cuantificación de muestras.

A la Biól. Mireya Sánchez Garza, por su apoyo en el laboratorio.

A la M.C. Verónica Espericueta por las facilidades para utilizar el termociclador RotorGene.

A la Dra. Ruth Elena Soria Guerra por su ayuda en las pruebas de intercaladores y de enzimas en los experimentos iniciales.

Al Dr. Ángel Alpuche por las facilidades para usar el Icyler en los experimentos iniciales.

Al Dr. Luis Salazar y su grupo, por su compañerismo y ayuda en el laboratorio.

Al IPICYT por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones, así como las facilidades que me otorgaron sus departamentos y su personal que siempre estuvo dispuesto a ayudarme, de manera especial a Control Escolar, Almacén de biología molecular, Difusión y divulgación, Informática y Biblioteca.

A Mercedes, Gloria y Rosy por su ayuda en la preparación del material de trabajo.

# ÍNDICE

Constancia de aprobación de la tesis .....	ii
Créditos institucionales.....	iii
Copia del acta del examen .....	iv
Dedicatorias .....	v
Agradecimientos .....	vi
Lista de tablas.....	ix
Lista de figuras.....	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
Capítulo I. Introducción general.....	1
Cáncer cervicouterino.....	1
Papilomavirus y CaCu .....	1
Progresión neoplásica y diagnóstico del CaCu.....	2
Citología .....	2
El Sistema Bethesda.....	5
Papilomavirus .....	6
Clasificación.....	6
Estructura y organización del genoma viral .....	7
Ciclo viral y progresión neoplásica.....	7
Adsorción, penetración y replicación.....	7
Transcripción.....	8
Promotores tempranos.....	8
Promotores tardíos .....	10
Replicación del genoma viral .....	11
Liberación de viriones.....	11
Integración del genoma viral y progresión neoplásica .....	12
Marcadores moleculares de infección y progresión neoplásica.....	13
Partículas virales defectuosas interferentes.....	14
Justificación del trabajo.....	15
Estrategia empleada.....	16
Etapas del trabajo.....	16
Organización de la tesis.....	16
Capítulo II. Cuantificación del oncogén <i>E6</i> del papilomavirus humano tipo 16 mediante PCR en tiempo real con EvaGreen.....	18
Resumen.....	18
Introducción .....	18
Material y métodos .....	19
Clonación del inserto <i>E6</i> -645.....	19
Caracterización de pHV101 y pHV103.....	20
Condiciones de amplificación .....	21
PCR en tiempo real con SYBRGreen y EvaGreen.....	21
Resultados .....	21

Clonación de <i>E6</i> -645.....	21
Caracterización de pHV101 y secuencia del inserto.....	22
Amplificación de <i>E6</i> -645 en presencia de SYBRGreen o EvaGreen.....	24
Discusión.....	26
Capítulo III. Cuantificación ultrasensible del oncogén <i>E6</i> del papilomavirus humano tipo 16 mediante qPCR anidada.....	28
Resumen.....	28
Introducción .....	28
Material y métodos .....	29
Condiciones de amplificación .....	29
Preamplificación y calibración de la qPCR anidada.....	29
Resultados.....	30
Calibración y amplificación de <i>E6</i> -2 por qPCR directa.....	30
Preamplificación y qPCR anidada.....	30
Copias de <i>E6</i> -VPH16 en células SiHa.....	31
Discusión.....	34
Capítulo IV. Deleciones de los genes <i>E2</i> y <i>E6</i> en infecciones del cérvix por virus del papiloma humano tipo 16 .....	37
Resumen.....	37
Introducción .....	37
Material y métodos .....	39
Raspados cervicales y lesiones.....	39
DNA de los raspados cervicales.....	39
Construcciones empleadas para la calibración.....	39
PCR directa y qPCR anidada .....	40
Análisis estadístico .....	44
Resultados .....	44
Cuantificación de los genes <i>E6</i> y <i>E2</i> de VPH16 .....	44
Carga de <i>E6</i> y <i>E2</i> y cocientes <i>E2/E6</i> según el grado de lesión .....	46
Correlación de las pruebas moleculares con el grado de lesión.....	49
Eficiencia diagnóstica de las pruebas moleculares.....	52
Discusión.....	53
Referencias .....	62
Artículos publicados .....	67

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mortalidad y defunciones por cáncer cervicouterino en México y en el estado de San Luis Potosí en 2008 .....	4
Tabla 2. Valores de Ct en la amplificación de <i>E6</i> -645 con SYBRGreen o EvaGreen.....	27
Tabla 3. Valores de Ct en la amplificación de <i>E6</i> -645 con EvaGreen .....	27
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados .....	32
Tabla 5. Valores de Ct del amplicón <i>E6</i> -2 en mezclas de qPCR directa y anidada con un número variable de copias de pHV101 .....	33
Tabla 6. Plásmidos, oligonucleótidos y amplicones.....	43
Tabla 7. Mezclas para la PCR (directa) y la qPCR (anidada).....	43
Tabla 8. Valores de Ct y parámetros en las mezclas de calibración de qPCR para cuantificar las copias de los genes <i>E2</i> y <i>E6</i> .....	45
Tabla 9. Copias de <i>E6</i> y <i>E2</i> y cocientes <i>E2/E6</i> en las muestras de cada grupo de lesión .....	47
Tabla 10. Cocientes <i>E2/E6</i> con valores extremos.....	50
Tabla 11. Estadísticos de los valores de log <i>E6</i> , log <i>E2</i> y <i>E2/E6</i> por grupos de lesiones.....	51
Tabla 12. Regresión logística binaria de los valores de log <i>E6</i> , log <i>E2</i> y log ( <i>E2/E6</i> ) entre pares de grupos de lesiones .....	51
Tabla 13. Cargas de <i>E2</i> y <i>E6</i> normalizadas y cocientes <i>E2/E6</i> por grado de lesión en éste y otros trabajos .....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura. 1. Incidencia y mortalidad por CaCu en el mundo.....	3
Figura. 2. Tipos de cánceres más frecuentes en mujeres mexicanas.....	4
Figura. 3. Árbol filogenético de los papilomavirus, basado en el marco de lectura abierto (ORF) de la proteína estructural L1.....	9
Figura. 4. Representación del genoma de VPH16.....	9
Figura. 5. Representación del ciclo de vida de los papilomavirus.....	10
Figura. 6. Análisis electroforético de los plásmidos pHV101 y pHV103 digeridos con las endonucleasas <i>Pst</i> I y <i>Nco</i> I.....	23
Figura. 7. Secuencia consenso del inserto <i>E6</i> -645.....	25
Figura. 8. Familia de curvas de amplificación de <i>E6</i> -645 en presencia de EvaGreen.....	25
Figura. 9. Desnaturalización térmica de los productos <i>E6</i> -645.....	27
Figura. 10. Secuencias de los amplicones <i>E6</i> -1 y <i>E6</i> -2 generados a partir de pHV101.....	32
Figura. 11. Mezclas completas y mínimas para la preamplificación de <i>E6</i> -1 y la amplificación de <i>E6</i> -2 mediante qPCR anidada.....	33
Figura. 12. Familias de curvas del amplicón <i>E6</i> -2 generadas por qPCR directa y anidada.....	35
Figura. 13. Desnaturalización térmica del amplicón <i>E6</i> -2 generado a partir de pHV101 y células SiHa.....	36
Figura. 14. Amplicones directos y anidados de los genes <i>E6</i> y <i>E2</i> de VPH16.....	41
Figura. 15. Insertos con las secuencias de los amplicones directos y anidados de <i>E2</i> y <i>E6</i> .....	41
Figura. 16. Calibración de la qPCR anidada para <i>E6</i> y <i>E2</i> .....	45
Figura. 17. Copias de <i>E6</i> y <i>E2</i> y cocientes <i>E2/E6</i> en las 35 muestras de raspados cervicales.....	48
Figura. 18. Eficiencia diagnóstica de los valores del log <i>E6</i> para discriminar IVPH-NIC1 de NIC2-3/CC e IVPH-NIC1 de CC.....	53
Figura. 19. Distribución de los valores del log ( <i>E2/E6</i> ) en todas las muestras de raspados cervicales.....	56
Figura. 20. Modelo de Cricca et al. (2007) para la replicación e integración del genoma de VPH16 en lesiones neoplásicas cervicales de grado creciente.....	57
Figura. 21. Modelo propuesto para la generación de deleciones del genoma viral y partículas defectuosas de VPH16.....	60
Figura. 22. Modelo propuesto para la generación de deleciones del genoma de VPH y la distribución de partículas defectuosas en infecciones cervicales sucesivas.....	61

## RESUMEN

### “LA CARGA DE VIRUS DEL PAPILOMA TIPO 16 NO CORRELACIONA CON EL GRADO DE LAS LESIONES NEOPLÁSICAS DEL CÉRVIX Y ES CONSISTENTE CON DELECCIONES DE LOS GENES VIRALES *E2* Y *E6*”

**CONTEXTO.** El cáncer cervicouterino se desarrolla en infecciones persistentes del epitelio del cuello uterino por virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo, entre los cuales predomina el tipo 16 (VPH16) cuyo genoma —DNA circular de cadena doble que codifica seis genes de proteínas no *estructurales*, entre ellos el represor *E2* y las oncoproteínas *E6* y *E7*— se replica en el núcleo de las células epiteliales en diferenciación. La integración del genoma viral al genoma celular, aparentemente esencial para iniciar la transformación neoplásica, usualmente se acompaña de escisión/interrupción del gen *E2*. Las lesiones neoplásicas progresan hasta el cáncer invasor (CC) pasando por infección (IVPH), neoplasia intraepitelial de bajo grado (NIC1) y de alto grado (NIC2 y NIC3). Se supone que en las lesiones de bajo grado predomina el genoma viral en estado plasmídico (con igual número de los genes *E2* y *E6* y cociente  $E2/E6 \sim 1$ ) y en lesiones cancerosas el estado integrado (con pérdida del gen *E2* y cociente  $E2/E6 \sim 0$ ). La cuantificación del oncogén *E6* de VPH16 (*E6*-VPH16) mediante PCR en tiempo real (qPCR) con SYBRGreen (fluorocromo intercalante del DNA) ha sido empleada para correlacionar la carga viral y el cociente  $E2/E6$  con el grado de las lesiones neoplásicas. EvaGreen, un nuevo fluorocromo intercalante, ha sido empleado para cuantificar el DNA y propuesto para la qPCR. **PROPÓSITOS.** En este trabajo comparamos la eficiencia de EvaGreen y SYBRGreen para cuantificar *E6*-VPH16 por qPCR, desarrollamos un método ultrasensible con EvaGreen basado en preamplificación convencional seguida de qPCR anidada para evaluar las cargas de *E2* y *E6* y el cociente  $E2/E6$ . **MÉTODOS.** Cuantificamos la carga de *E2* y *E6* en los raspados cervicales de 35 mujeres con lesiones displásicas y cancerosas e infección única por VPH16. **RESULTADOS.** La cuantificación de *E2* y *E6* fue reproducible y el promedio de ciclos umbrales (Ct) fue 4.4 ciclos menor con EvaGreen que con SYBRGreen. Los perfiles de extinción térmica de fluorescencia de los productos amplificados de los raspados cervicales fueron idénticos a los amplificados a partir del genoma de VPH16 auténtico. Las mezclas de qPCR directa y anidada con diluciones logarítmicas seriadas que contenían  $2.5 \times 10^3$ - $2.5 \times 10^6$  copias de la construcción pHV101 (con el inserto de *E6*) dieron valores de Ct en los rangos de 18.7-29.0 y 10.0-25.0, respectivamente. El Ct promedio fue 19.9 en mezclas con 50 ng de DNA de la línea celular SiHa, que porta una copia de VPH16 por célula. Los patrones de extinción térmica de la fluorescencia de los productos de pHV101 y SiHa fueron idénticos, con un pico a 85.5°C. La calibración de las mezclas de qPCR para cuantificar *E2* fue realizada con la construcción pHV201 (con el inserto del ORF *E2*) generada previamente en nuestro laboratorio. Entre los grupos de lesiones de los raspados cervicales los rangos de copias de *E2* y *E6* (por ng de DNA) y los cocientes  $E2/E6$  fueron: IVPH 16-9,250, 55-1,300, 0.006-24.375; NIC1 16-18,076, 18-816,656, 1.625-625.471; NIC2 30-58,535, 119-538, 0.006-15.460; NIC3 21-808,000, 444-5,200,000, 0.736-24.969; CC: 15-1,152,000, 18-17,200,000, 0.020-181.950. Las diferencias fueron significativas sólo entre las cargas de *E6* de NIC1 vs. CC ( $P = 0.028$ ) y NIC1 vs. NIC2-3/CC ( $P = 0.045$ ). Los valores del log  $E2/E6$  de los raspados se ajustaron a una distribución gaussiana. **CONCLUSIONES.** La cuantificación de *E6*-VPH16 es reproducible, específica y más sensible con EvaGreen que con SYBRGreen y confirma la utilidad de EvaGreen para la qPCR. La preamplificación por 15 ciclos aumenta 10,750 veces la sensibilidad de la qPCR anidada, permite cuantificar confiablemente el oncogén *E6* y confirma que las células SiHa contienen una copia del genoma de VPH16 por masa de genoma humano DIPsloide. Las cargas de *E2* y *E6* no correlacionan con el grado de las lesiones neoplásicas. Mostramos por primera vez que en las infecciones naturales del cérvix por VPH16 parecen ocurrir delecciones aleatorias de los genes virales *E2* y *E6*. Los genomas deletados de VPH16 podrían, como ocurre con otros virus, generar partículas defectuosas interferentes capaces de afectar la replicación viral, la progresión neoplásica y la inmunidad contra VPH16.

**PALABRAS CLAVE:** VPH, qPCR, EvaGreen, SYBRGreen.

## ABSTRACT

### “THE LOAD OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 DOES NOT CORRELATE WITH CERVICAL NEOPLASTIC LESIONS AND IS CONSISTENT WITH DELETIONS OF THE *E2* AND *E6* VIRAL GENES”

**CONTEXT.** Cancer of the cervix uteri (CC) develops in persistent infections of the cervical epithelium by high-risk human papillomavirus (HPV), among the most prevalent is type 16 (HPV16) whose genome—circular double stranded DNA encoding six nonstructural protein genes that include the *E2* repressor and the *E6* and *E7* oncoproteins—replicates in the nucleus of differentiating cells. Integration of the viral genome to the cell genome, apparently essential to initiate neoplastic transformation, is usually accompanied by excision/disruption of the *E2* gene. Progression of neoplastic lesions to invasive cancer (CC) passes through viral infection (HPVI), low grade (CIN1), and high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2 and CIN3). It is assumed that the plasmid form of the viral genome predominates in low grade lesions (with equal number of *E2* and *E6* viral genes and *E2/E6* ratio ~ 1) and the integrated form in cancerous lesions (with loss of *E2* and *E2/E6* ratio ~ 0). Quantification of the HPV16 *E6* oncogene (*E6*-VPH16) by real time PCR (qPCR) with the DNA intercalating fluorochrome SYBRGreen has been used to correlate viral loads and *E2/E6* ratios with degree of neoplastic lesions. EvaGreen, a new intercalating fluorochrome, has been used to quantify DNA and proposed for use in qPCR. **AIMS.** In this work we compared the efficiency of EvaGreen and SYBRGreen to quantify *E6*-HPV16 by qPCR, developed an ultrasensitive method with EvaGreen based on conventional preamplification followed by nested qPCR to assess *E2* and *E6* loads and *E2/E6* ratios. **METHODS.** *E2* and *E6* loads were quantified in cervical scrapings from 35 women with cancerous and dysplastic lesions and infected only by HPV16. **RESULTS.** *E2* and *E6* quantification was reproducible with the average number of threshold cycles (Ct) being 4.4 cycles lower with EvaGreen than with SYBRGreen. The thermal-extinction-of-fluorescence profiles of products amplified from DNA of cervical scrapes were identical to those amplified from the authentic HPV16 genome. Direct and nested qPCR mixtures prepared with serial logarithmic dilutions containing  $2.5 \times 10^3$ - $2.5 \times 10^6$  copies of the pHV101 construct (with the *E6* ORF insert) yielded Ct values in the ranges of 18.7-29.0 and 10.0-25.0, respectively. The average Ct value was 19.9 for mixtures containing 50 ng of DNA of the SiHa cell line, known to carry one HPV16 copy per cell. The thermal-extinction-of-fluorescence profiles of pHV101 and SiHa products were identical, with a peak at 85.5°C. Calibration of qPCR mixtures to quantify *E2* copies was performed with the pHV201 construct (containing the *E2* ORF insert; generated previously in our laboratory). Among the groups of neoplastic cervical lesions the ranges of *E2* and *E6* copy numbers (per ng of DNA) and *E2/E6* ratios were: HPVI 16-9,250, 55-1,300, 0.006-24.375; CIN1 16-18,076, 18-816,656, 1.625-625.471; CIN2 30-58,535, 119-538, 0.006-15.460; CIN3 21-808,000, 444-5,200,000, 0.736-24.969; CC: 15-1,152,000, 18-17,200,000, 0.020-181.950. There were significant differences only between the *E6* loads of CIN1 vs. CC ( $P = 0.028$ ) and CIN1 vs. CIN2-3/CC ( $P = 0.045$ ). The log *E2/E6* values observed in the scrapings fitted a gaussian distribution. **CONCLUSIONS.** *E6*-HPV16 quantification is reproducible, specific and more sensitive with EvaGreen than with SYBRGreen and confirms the usefulness of EvaGreen for qPCR. Preamplification for 15 cycles increases nested qPCR sensitivity 10,750 times, allows reliable quantification of the *E6* oncogene and confirms that SiHa cells contain one HPV16 genome per mass of human DIPloid genome. *E2* and *E6* loads do not correlate with the grade of the neoplastic lesions. For the first time we show that in natural cervical infections by HPV16 random deletions of the viral *E2* and *E6* genes might occur. The deleted HPV16 genomes could, as is known to happen with other viruses, generate defective interfering particles capable of affecting viral replication, neoplastic progression and immunity to HPV16.

**KEYWORDS:** HPV, qPCR, EvaGreen, SYBRGreen.

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **CÁNCER CERVICOUTERINO**

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo cáncer más frecuente y la tercera causa de muerte por cáncer entre las mujeres en el mundo, con 529,000 casos nuevos en el año 2008.

Las regiones más afectadas son África Oriental y Occidental con un riesgo estimado y estandarizado por edad (ASR) mayor a 30 por cada 100,000 mujeres; les sigue el sur de África con un ASR de 26.8/100,000, Asia Central y del Sur con 24.6/100,000, América del Sur y África Central con ASR de 23.9 y 23 por 100,000 mujeres, respectivamente.

Las regiones con menor riesgo de CaCu son Asia Occidental, Norteamérica, Australia y Nueva Zelanda, con ASR de 6/100,000, es decir, aproximadamente cinco veces menos que África Oriental y Occidental.

El CaCu fue responsable de 274,000 muertes en 2008 y el 88% de las mismas ocurrieron en países en desarrollo: 53,000 en África, 31,400 en Latinoamérica y el Caribe y 159,800 en Asia (Figura. 1).

Según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) y las estadísticas de cáncer mundial para 2008 (GLOBOCAN 2008) el CaCu en México fue la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres y en ese año se registraron 10,186 casos nuevos y 5,061 defunciones (Figura. 2).

El Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) informó que en el último corte (2008) hubo 4,031 muertes por CaCu y la tasa de mortalidad nacional fue de 9.1/100,000, menor que la registrada por la IARC (Tabla 1). En el estado de San Luis Potosí se registraron 97 defunciones y la tasa de mortalidad fue de 9.3/100,000, lo que ubica al estado por encima del promedio nacional. De acuerdo con estas estadísticas se estima que en 2008 murieron 11 mujeres por día en el país y una cada cuatro días en San Luis Potosí (SINAIS 2008) (Tabla 1).

### **PAPILOMAVIRUS Y CaCu**

zur Hausen propuso y luego demostró que el virus del papiloma humano (VPH) es el agente infeccioso responsable de la transformación neoplásica del cuello uterino (zur Hausen 1977, 1988). Esta hipótesis fue validada con el hallazgo de secuencias del genoma de VPH en 99.7% de los casos de CaCu invasor (Walboomers et al. 1999).

Los papilomavirus humanos denominados de bajo riesgo (VPH-BR) se encuentran en verrugas y lesiones benignas y los de alto riesgo (VPH-AR) u oncogénicos se encuentran en los carcinomas invasores (de Villiers 2001).

Los principales tipos de VPH de bajo riesgo son once (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72,81) y los de alto riesgo quince (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) (Muñoz et al. 2003).

Los dos tipos de VPH-AR asociados con mayor frecuencia a tumores malignos son el 16 (miembro de la especie 9) y el 18 (miembro de la especie 7). El primero es responsable de alrededor del 50% de los casos de CaCu invasor en el mundo (Bosch et al. 1995, Walboomers et al. 1999).

## **PROGRESIÓN NEOPLÁSICA Y DIAGNÓSTICO DEL CaCu**

### ***Histopatología***

La historia natural del CaCu implica el desarrollo de cambios progresivos que empiezan con lesiones precancerosas, las cuales incluyen la neoplasia intraepitelial del cérvix (NIC) leve o neoplasia intraepitelial de grado 1 (NIC1). Esta es seguida por lesiones más severas (NIC2 y NIC3) y luego por el cáncer in situ, microinvasor e invasor.

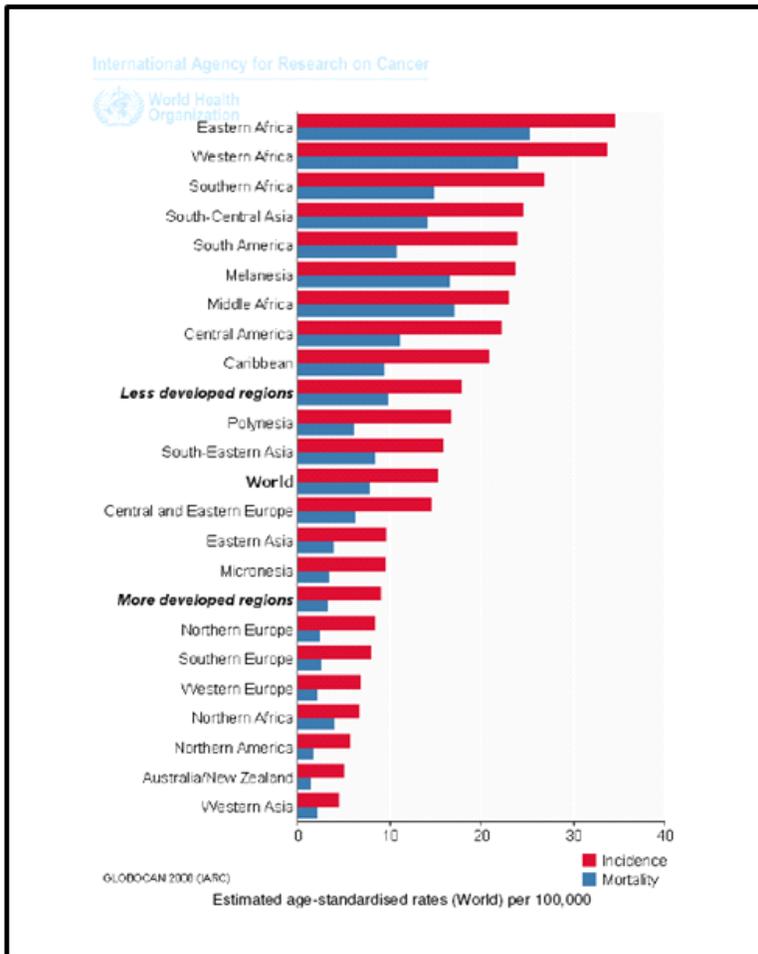
El sistema NIC, basado únicamente en la arquitectura del tejido, promovió el concepto de enfermedad continua y gradual desde leve hasta severa y fue propuesto por Richart desde 1973 (Richart et al. 1973, Buckley 1982).

### ***Citología***

La citología cérvico-vaginal es el método de tamizaje que ha sido empleado masivamente para la detección temprana del CaCu en el mundo (Jenkins 2007) y en Latinoamérica (Organización Panamericana de la Salud) incluyendo a nuestro país (Curiel Valdez 2006).

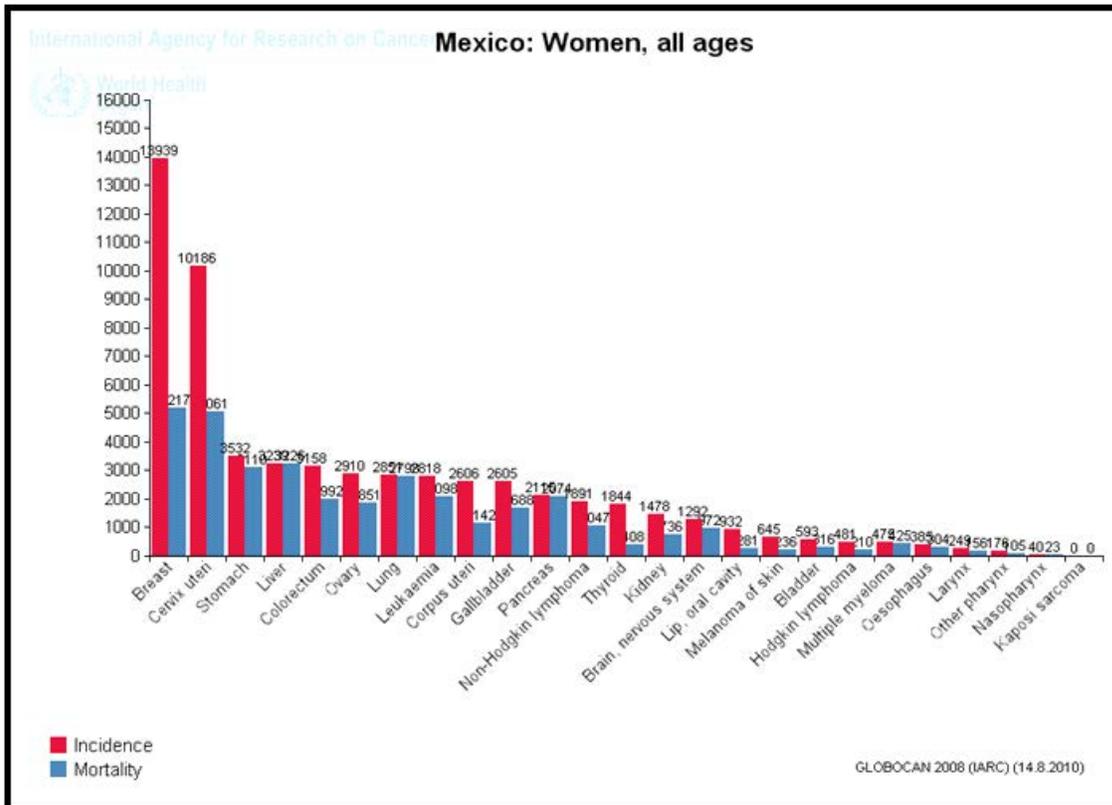
Papanicolaou dedicó 45 años al estudio de la citología exfoliativa y desde 1923 la propuso como un método diagnóstico del cáncer uterino. La citología ginecológica comenzó formalmente con la descripción de los cambios hormonales cíclicos del epitelio vaginal, en los cuales identificó la presencia de células tumorales en algunos frotis.

El Papanicolaou ha contribuido a disminuir la incidencia de cáncer en varios países (Bergström et al. 1999; Pontus et al. 2007), aunque Fahey et al. (1995) demostraron que tiene una sensibilidad variable, en promedio del 58%, y Boffin (2007) registró pacientes con cáncer que habían tenido un diagnóstico citológico negativo.



**Figura. 1. Incidencia y mortalidad por CaCu en el mundo**

Incidencia (barras rojas), Mortalidad (barras azules). El rango estimado fue estandarizado con la edad por cada 100,000 mujeres (IARC, 2008).



**Figura. 2. Tipos de cánceres más frecuentes en mujeres mexicanas.** Incidencia (barras rojas). Mortalidad (barras azules). El gráfico muestra el número de casos registrados en mujeres de todas las edades (IARC, 2008).

**Tabla 1. Mortalidad y defunciones por cáncer cervicouterino en México y en el estado de San Luis Potosí en 2008**

Región	Mortalidad <sup>a</sup>	Defunciones	Muertes/día
México	9.7 <sup>a,b</sup>	5,061	14
México	9.1 <sup>c</sup>	4,031	11
San Luis Potosí	9.3 <sup>c</sup>	97	0.25

<sup>a</sup> Tasa de mortalidad por 100,000 habitantes ajustada por edad.

<sup>b</sup> Fuente: IARC, Globocan 2008.

<sup>c</sup> Fuente: SINAIS 2008.

## **El Sistema Bethesda**

La clasificación de los cambios morfológicos diagnosticados con el método de Papanicolaou ha sido sometida a varias modificaciones y actualmente existe una terminología unificada por el Sistema Bethesda creada para incorporar los nuevos conceptos citológicos, unificar la terminología de este diagnóstico y comunicar la información apropiada para el manejo de las pacientes a través de un informe de los aspectos citológicos. (Bethesda System NCBI 2010; Bergeron 2003)

Los diagnósticos de las lesiones neoplásicas progresivas del Sistema Bethesda son los siguientes:

Negativo para lesión intraepitelial o malignidad. No existe ninguna anomalía de las células epiteliales.

- ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance). Cambios celulares atípicos de significado indeterminado. El término se emplea cuando los hallazgos citológicos son de importancia indeterminada, lo cual refleja dificultad para interpretar ciertos cambios celulares con precisión y reproducibilidad para un diagnóstico definitivo. Son cambios sugestivos pero no concluyentes de infección por VPH.
- Anomalías en las células epiteliales. Cuando se identifican alteraciones celulares premalignas o malignas. Se incluyen a continuación únicamente las dos categorías para las lesiones intraepiteliales escamosas:
- LIEB (lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; LSIL o low-grade squamous intraepithelial lesion) que incluye la infección por VPH y displasia leve (equivalente a NIC1).
- LIEA (lesión intraepitelial escamosa de alto grado, HSIL o high-grade squamous intraepithelial lesion) incluye displasia moderada (equivalente a NIC2) y severa (equivalente a NIC3) y el carcinoma in situ.

Los factores que generan diagnósticos falsos en general incluyen errores en la toma y el procesamiento de la muestra o en la búsqueda e identificación de las células malignas y su interpretación. Alrededor de dos tercios de los falsos negativos resultan de errores en la toma de la muestra y el tercio restante de error en la detección (Burd 2003), aunque hay grandes variaciones que dependen de la calidad del laboratorio y del personal que diagnostica las muestras.

Para tratar de mejorar la especificidad y sensibilidad del diagnóstico se han desarrollado nuevas técnicas como la citología en líquido (liquid based cytology) en la cual se utiliza un cepillo para tomar la muestra que luego se introduce en una solución fijadora donde se conservan y dispersan las células. En el laboratorio la muestra es concentrada selectivamente a través de filtros y transferida al portaobjetos para su tinción y posterior interpretación. Debido a que la muestra es fijada inmediatamente después de su recolección y el proceso elimina materiales

que puedan oscurecer la evaluación de las células epiteliales como sangre, moco y células inflamatorias, hay pocos artefactos en la morfología celular, además de que las células se colocan en una monocapa, lo que facilita la observación. Este método ha permitido disminuir las muestras inadecuadas del 9 al 2%, así como acortar el tiempo empleado para la interpretación (Varela-Martínez 2005).

## **PAPILOMAVIRUS**

Los papilomavirus son virus epiteliotrópicos y sus viriones, de 52-55 nm de diámetro, son partículas sin envoltura, con una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros (Palefsky et al, 1995; Saveria Campo, 2006). La cápside consta de dos proteínas estructurales codificadas por el genoma viral: L1, de 55 kilodaltones (kDa), representa el 80% de la proteína de los viriones y L2, de 70 kDa. El genoma es una molécula de DNA circular de doble cadena (dsDNA) de aproximadamente 8000 pb y su contenido de GC oscila entre el 40% y 48% (Saveria Campo 2006, Flint et al. 2009)

### **Clasificación**

Los papilomavirus pertenecen a la familia Papillomaviridae y se han aislado cientos especie-específicos. Son clasificados por la especie que infectan y el sitio o enfermedad con los cuales están asociados. La secuenciación del genoma ha permitido su clasificación filogenética de acuerdo a su homología en el marco de lectura abierto (ORF) del gen L1, altamente conservado. La clasificación se basa en los siguientes cinco niveles jerárquicos:

**Género.** Es la categoría más amplia de clasificación. Los géneros son designados por letras del alfabeto griego; cada miembro debe tener 60% de identidad en la secuencia de L1 dentro del mismo género.

**Especie.** Dentro de una especie se encuentran papilomavirus del mismo género con 60-70% de identidad en L1.

**Tipo.** Un tipo viral dentro de una especie tiene 71-89% de identidad en L1 respecto a otros tipos de la especie.

**Subtipo.** Los subtipo tienen una identidad del 90-98% dentro de un tipo.

**Variante.** Tienen más del 98% de identidad; también es definida por genomas con una diferencia menor o igual al 2% respecto a la secuencia prototípica del subtipo viral con el que se compara.

La clasificación de de Villiers (2004) agrupa a los VPH en cinco géneros, alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ), mu ( $\mu$ ) y nu ( $\nu$ ), de los cuales se han identificado alrededor de 200 tipos (Figura. 3). Hasta 2007 se habían secuenciado los genomas completos de 96 tipos y más de 100 tipos adicionales habían sido secuenciados parcialmente (ICTV 2002, Saveria Campo 2006; Knipe et al. 2007).

Los VPH de importancia médica están agrupados en el género alfa y muchos de ellos infectan principalmente los genitales. Hay relativamente pocos subtipos, pero han sido identificadas abundantes variantes especialmente para VPH16 (Knipe et al. 2007; López-Revilla et al. 2008).

### **Estructura y organización del genoma viral**

Los genomas de los papilomavirus tienen secuencias y arreglos similares (Saveria Campo, 2006; Knipe et al. 2007). El genoma se divide en tres regiones: La región larga de control (LCR), localizada entre los genes L1 y E6, que contiene de 400 a 850 pb; esta región es conocida como región reguladora no codificante, contiene el origen de replicación viral así como también es responsable del control de la transcripción, ambas dependientes de la célula huésped (Münger et al. 2004, Saveria Campo, 2006). La región que corresponde a los genes tempranos es llamada E (early), contiene genes que participan en la replicación y la oncogenicidad viral y consta de los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Por último la región de los genes tardíos o L, formada por dos genes que codifican la proteína principal de la cápside o L1 y la proteína menor de la cápside o L2 (Komly et al. 1986, Dell y Gaston 2001, Burd 2003).

El genoma de VPH16 fue secuenciado completamente y registrado por primera vez en 1985 (GenBank: K02718.1). Ha sido el modelo de estudio en numerosos trabajos debido a que es principal agente relacionado con el cáncer cervical en el mundo (Bosch et al. 1995, Walboomers et al. 1999) (Figura. 4).

## **CICLO VIRAL Y PROGRESIÓN NEOPLÁSICA**

### **Adsorción, penetración y replicación**

Los papilomavirus son especie-específicos, tienen tropismo por células epiteliales, y la producción de viriones en las células infectadas depende de la diferenciación de las mismas, dado que requieren de la maquinaria celular para llevar a cabo el ciclo replicativo (Flint et al. 2009).

La infección por papilomavirus requiere que las células de la capa basal del epitelio sean infectadas por lo que se propone que para iniciar la infección debe ocurrir una lesión o abrasión del epitelio; esta idea se desarrolló por la presencia de proteínas virales tempranas en las células basales mientras que la expresión de los genes virales tardíos, la producción de proteínas de la cápside, la replicación del DNA viral y el ensamble de los viriones ocurren sólo en células completamente diferenciadas de las capas epiteliales superiores (Stoler 1992 2006, Saveria Campo 2006, Curiel Valdez 2006). (Figura. 5).

La unión de los papilomavirus a la membrana celular no se ha descrito detalladamente. Los viriones parecen unirse a residuos de glucosaminoglucanas en la superficie de la membrana plasmática (Joyce et al. 1999, Saeed et al. 2003). La integrina alfa-6 parece ser el principal receptor de VPH16 y la adsorción es

seguida de endocitosis dependiente de clatrina como un evento de internalización celular (Yoon et al. 2001, Day et al. 2003; Alberts et al. 2004).

La proteína L2 interviene en la salida del endosoma y en el transporte del genoma viral al núcleo celular y una vez ocurrida la infección el virus se establece dentro del núcleo de las células basales.

El DNA viral permanece en estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose en niveles bajos en coordinación con la división celular (Saveria Campo 2006).

### **Transcripción**

El mecanismo transcripcional es complejo y no es comprendido completamente debido a la intervención de múltiples moléculas reguladoras involucradas, a las diferencias encontradas en los distintos modelos de estudio y las limitaciones técnicas para su estudio in vitro.

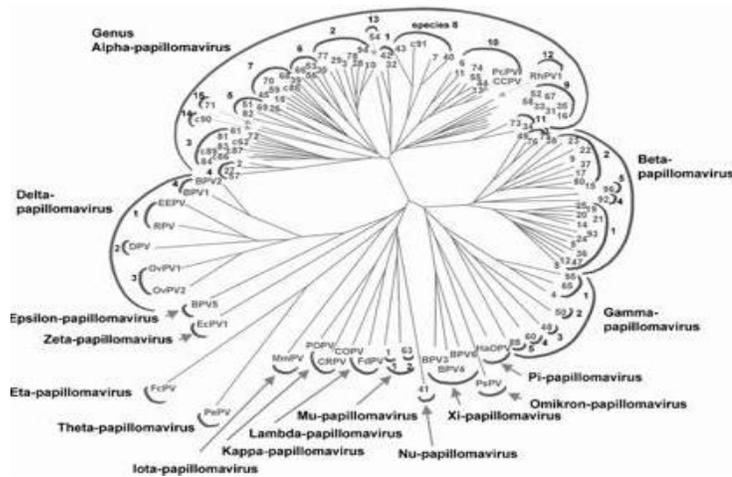
La transcripción es unidireccional, requiere una sola cadena de DNA como molde, depende de la maquinaria transcripcional de la célula eucariota (RNAPol II) y factores que permiten a la enzima reconocer el inicio de la transcripción (caja TATA) y unirse a la cadena molde, notablemente TFIID y TBP (Knipe 2007).

La transcripción requiere promotores que se encuentran en la LCR y en los genes *E6* y *E7* cuya intensidad de uso es determinada por diversos elementos de regulación que se unen a sitios específicos (Saveria Campo 2006, Alberts et. al 2004).

### **Promotores tempranos**

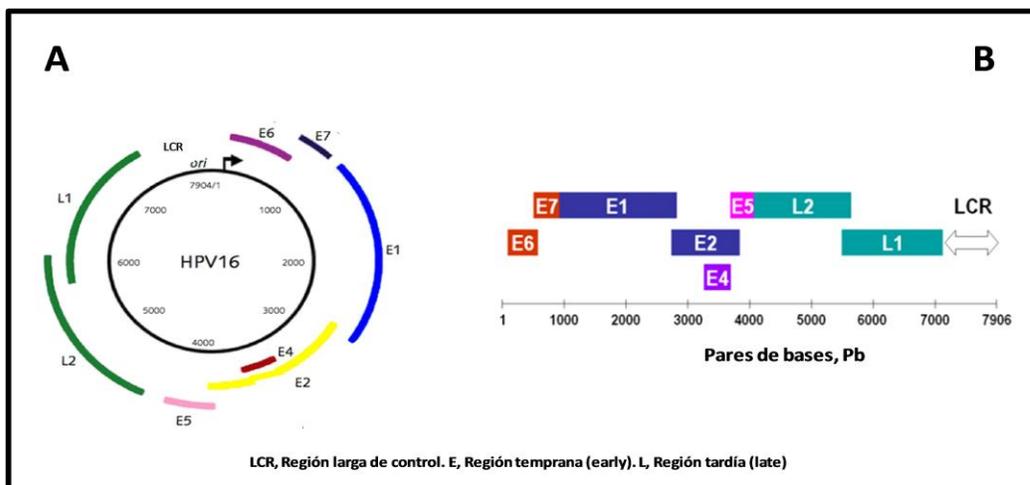
El **promotor *E6*** (p97, nt 97) es empleado para iniciar la transcripción viral con RNAPol II, que junto con los factores de transcripción reconoce y se une al promotor para continuar el proceso de elongación de la cadena de RNA que se transcribe.

Los factores de transcripción que activan a este promotor tienen sitios de unión en regiones distintas. Sp1 se une en la región larga de control LCR (31 pb corriente arriba del promotor *E6*) (Apt et al. 1996).



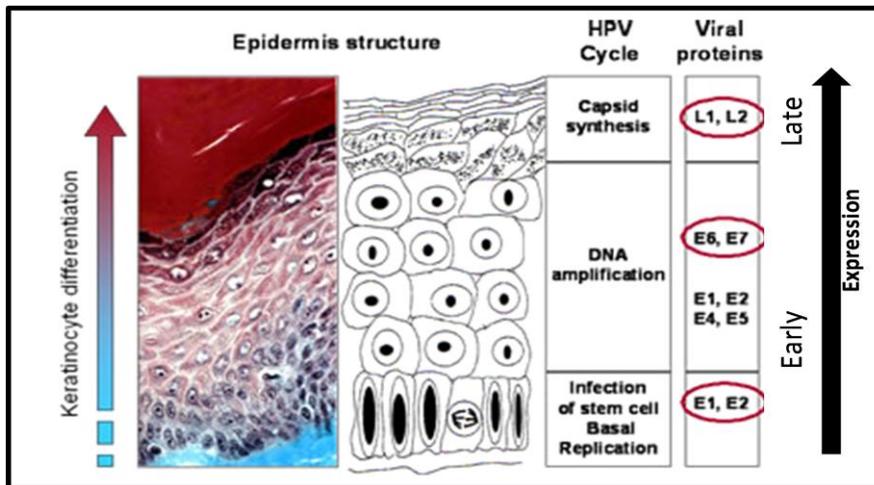
**Figura. 3. Árbol filogenético de los papilomavirus, basado en el marco de lectura abierto (ORF) de la proteína estructural L1**

Los VPH corresponden principalmente a los géneros alfa, beta, gama, mu y nu. Los números indican el tipo de papilomavirus. La letra c anterior al número indica que el miembro es candidato a VPH. Las demás observaciones se refieren a papilomavirus animales. (tomada de Saveria-Campo 2005)



**Figura. 4. Representación del genoma de VPH16**

Longitud total: 7904 pb. (A) Representación circular. (B) Representación lineal. LCR, Región larga de control. Genes tempranos E (early). Genes tardíos L (late). (Adaptado del Instituto de Investigación Clínica de Montreal).



**Figura. 5. Representación del ciclo de vida de los papilomavirus**

La internalización del virus ocurre en células basales junto a la expresión de proteínas tempranas (E), mientras que las proteínas tardías (L) se expresan en las células de estratos superiores (Adaptado de Anaconda Pharma 2006).

La proteína viral *E2* es considerada como factor de transcripción pues al unirse entre la caja TATA y el sitio de unión a Sp1 también actúa como activador transcripcional aunque menos potente que Sp1 (Tan et al. 1994).

El **promotor E7** se localiza dentro de la secuencia del gen *E6* de los tipos de bajo riesgo VPH6 y VPH11 y promueve la expresión del oncogén E7. Su regulación no es bien conocida pero algunos estudios sugieren que la proteína *E2* pudiera estimularlo (di Lorenzo y Steinberg 1995).

### Promotores tardíos

El **promotor E6** (p97, nt 97) dirige la síntesis del mRNA que codifica tanto las proteínas tempranas como las proteínas estructurales L1 y L2 que son traducidas a partir de los mismos mensajeros, pero se desconocen los mecanismos que determinan el cambio en la expresión de las proteínas tempranas a las tardías.

El **promotor p670**, descrito para VPH16 por Grassmann et al. (1996), tiene un mecanismo de regulación desconocido pero promueve la producción de L1 y L2 y su actividad se incrementa durante la diferenciación celular.

Los promotores son regulados por moléculas que potencian su actividad (enhancers) o bien la disminuyen o suprimen (silenciadores). Las moléculas reguladoras de los promotores de papilomavirus son específicas de células epiteliales. Ap1 es considerado un potenciador de p97 (García-Carrancá et al. 1988; Gloss et al. 1989). Los represores se unen a una región de 110 pb entre el enhancer y el promotor p97 y reprimen la transcripción del mismo promotor (Bauknecht et al. 1992)

Otros elementos de regulación de la transcripción son la conformación de la cromatina mediante la modificación covalente de las histonas de los nucleosomas y la metilación de DNA.

### **Replicación del genoma viral**

El origen de replicación es una secuencia de 80 a 140 pb de la LCR (Zhu et al. 1994). Consta de un sitio de unión a la proteína viral E1 (E1BS, E1 binding site) que en sus extremos tiene un sitio de unión para la proteína viral E2 (E2BS, E2 binding site), por lo que la replicación depende de ambas proteínas (Ustavaad Steniud 1991) y requiere también de la maquinaria celular (Lin et al. 2000).

La proteína E2 recluta a E1 y permite el reconocimiento del origen de replicación mientras que E1 tiene actividad de helicasa (Yang et al. 1993). La proteína E2 tiene tres dominios; el extremo amino terminal (200 aa) es necesario para la interacción con E1. Cambios en el dominio amino terminal de la proteína E2 pueden inhibir la replicación (Chiang et al. 1992). E2 además es responsable de la persistencia del genoma viral en células en división debido a que su dominio amino terminal media la asociación con los cromosomas mitóticos (Bastien and McBride, 2000).

La proteína E1 tiene actividad de helicasa y al interactuar con la proteína E2 se une al E1BS además de interactuar con la alfa primasa para iniciar la replicación (Titolo et al. 2000). Ambas interacciones son esenciales pero una vez iniciado el proceso E2 es liberada (Masterson et al. 1998).

La replicación viral es regulada por la proteína supresora de tumores p53 (descrita desde 1979), que detiene el ciclo celular en el punto G1/S cuando existen daños en el DNA, evitando su replicación (López-Martínez et al. 2002). En papilomavirus se ha demostrado que E2 activa directamente a p53.

### **Liberación de viriones**

La proteína E4 se expresa solamente en células diferenciadas y su marco de lectura está localizado en la región temprana. Sin embargo, al encontrarse bajo la acción del promotor tardío localizado en E7, E4 se expresa como un gen tardío. Su función principal consiste en inducir la ruptura de las redes de citoqueratina, lo que permite la liberación de los viriones sintetizados durante la fase productiva de la replicación viral. Se ha propuesto que la activación de los genes virales tardíos también resulta de la interacción de los promotores tardíos con factores de transcripción celulares específicos de la diferenciación, tales como los factores de transcripción Ying Yang 1 (YY1); también se ha propuesto la existencia de factores de transcripción que reprimen la expresión de los genes tardíos en las células basales aunque su regulación no es conocida (Saveria Campo 2006, Wilson et al. 2007).

## **Integración del genoma viral y progresión neoplásica**

El DNA viral puede encontrarse en la célula infectada de tres maneras: libre y completo (–forma episomal”), integrado al genoma celular (–forma integrada”) y compartiendo las formas integrada y episomal (–forma mixta”).

Diversos trabajos han demostrado que la integración viral es importante en la progresión de las lesiones intraepiteliales hasta carcinomas invasores del cuello uterino, aunque después de más de dos décadas de investigación no están claros los mecanismos moleculares implicados en el proceso (López y Aristizábal 2006).

La expresión temprana de las oncoproteínas virales en células epiteliales generalmente conduce al desarrollo de diferentes tipos de anomalías cromosómicas (Duensing and Munger, 2002). La homología entre secuencias del virus y del genoma celular que se recombinan es prácticamente nula, lo que permite considerar el proceso de inserción viral como un mecanismo facilitado por eventos de recombinación no homóloga, empleado frecuentemente por las células en la reparación de daños genéticos (Thorland et al. 2000). El evento de integración aumenta la expresión de las oncoproteínas virales (Zigert et al. 2003), la frecuencia de formas mixtas aumenta con la progresión de la enfermedad (Chen et al. 2005) y la transición de lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) a carcinoma microinvasor se caracteriza por la integración de secuencias de VPH de alto riesgo (Hopman et al. 2004).

La integración es común en el CaCu invasor e infrecuente en epitelios normales y neoplasias intraepiteliales del cérvix de grado 1 (NIC1), mientras que en NIC2 y NIC3 la integración viral abarca un amplio rango de valores. La ausencia de secuencias de VPH16 integradas en estados clínicos avanzados como NIC3 o carcinoma in situ sugiere que la integración no siempre es requerida para la progresión maligna de las lesiones del cuello uterino (Ziegert et al. 2003, Cullen et al. 1991, Pirami et al. 1991, Hudelist et al. 2004, Sathish et al. 2004).

En el proceso de integración la linearización del genoma viral circular es una etapa necesaria que involucra la ruptura del DNA viral principalmente en la región E1/E2 (Tidy et al. 1989, Vernon et al. 1997, Kalantari et al. 1998 y 2001, Choo et al. 1987, Chen et al. 1994).

En VPH16 se han identificado diferentes patrones de ruptura. De acuerdo con la secuencia viral afectada actualmente se considera que el fragmento correspondiente a los genes E1 y E2 es la región con mayor tasa de ruptura; dentro de esta región existen a su vez varias secuencias específicas que han sido reconocidas como blancos de ruptura del genoma viral tanto en E1 (Chen et al. 1994) como en E2 (Kalantari et al. 2001).

Además de la ruptura, en la mayoría de casos ocurren deleciones de segmentos del genoma viral (Choo et al. 1987, Chen et al. 1994). En la región E2 de VPH16 se han registrado pérdidas de 251 pb (el Awady et al. 1987) y 813 pb (Schneider-Maunoury et al. 1987).

Teniendo en cuenta que frecuentemente ocurren rupturas, deleciones o ambas en la región *E1* y *E2*, parte de los efectos de la integración viral dependen de la alteración de las funciones biológicas de *E1* y *E2*. Como la proteína *E2* controla negativamente la transcripción de los genes virales *E6* y *E7* al unirse al promotor viral P97, su ausencia permite el libre acceso de factores de transcripción celulares que regulan positivamente la transcripción de *E6* y *E7* (Lewis et al. 1999).

El proceso de inserción viral no sólo afecta la estructura del genoma viral sino también los genes celulares del hospedero interrumpidos durante la integración. Se han identificado más de 230 sitios de integración celular en tumores primarios del cuello uterino y líneas celulares (Thorland et al. 2000, Ziegert et al. 2003, Kalantari et al. 2001, Peitsaro et al. 2002, Durst et al. 1987, Cannizzaro et al. 1988, Smith et al. 1992, Thorland et al. 2003, Yu et al. 2005).

La ruptura del gen *E2* ha sido asociada con la progresión de lesiones con pronóstico desfavorable (Tonon et al. 2001, SD Vernon et al. 1997, Kalantari et al. 1998). La integración de secuencias de VPH ocurre dentro de regiones del genoma de baja condensación transcripcionalmente activas con mayor accesibilidad para la integración de DNA foráneo y aunque ocurre aleatoriamente, un alto porcentaje de los sitios celulares de integración corresponde a sitios frágiles comunes (CFS, common fragile sites) susceptibles a ruptura que facilitan la inserción del DNA exógeno (Klimov et al. 2002).

### **MARCADORES MOLECULARES DE INFECCIÓN Y PROGRESIÓN NEOPLÁSICA**

Diversos trabajos han descrito los siguientes marcadores virales de riesgo para el desarrollo de CaCu y la progresión de las lesiones neoplásicas: el genotipo viral y sus variantes, la carga viral, la expresión de oncoproteínas virales (*E6* y *E7*) y la integración del genoma viral.

Walboomers y col. (1999) demostraron la presencia de secuencias del virus en el 99.7% de los casos de cáncer cervical. El tipo 16 es considerado el agente causal más prevalente, responsable de más de la mitad de los casos de CaCu invasor en el mundo (Muñoz 2004).

La sobreexpresión de los oncogenes *E6* y *E7* y la pérdida de la actividad represora de *E2* son considerados como factores virales en la patogénesis de las displasias del cuello uterino (Ziegert et al. 2003, Sathish et al. 2004). La ausencia de mensajeros para las oncoproteínas en lesiones de bajo grado y su presencia en todos los casos de NIC3 y cáncer sugirió la valoración de los niveles de los transcritos de *E6* y *E7* para el pronóstico de las pacientes (Sathish et al. 2004).

Otros marcadores virales son la carga viral y los cocientes *E2/E6* y *E2/E7* como indicadores moleculares de progresión (Nagao et al. 2002). Diversos trabajos en lesiones de alto y bajo grado demuestran correlación entre la carga viral (principalmente del número de copias de *E6*) y el grado de lesión de las

muestras cervicales y toman a la carga viral como un valor de progresión (Van Duin et al. 2002, Schlecht et al. 2003, Dalstein et al. 2003 ).

La integración del genoma viral, aceptada como un evento crucial para la transformación y la progresión de las lesiones neoplásicas (Weinberg 1992), provoca por tanto interrupción del gen *E2* con la consecuente sobreexpresión de los oncogenes virales que inician y mantienen la transformación neoplásica (Zigert et al. 2003).

La mayoría de los estudios de la integración viral se han realizado con los dos principales genotipos virales de alto riesgo: VPH16 y VPH18. Tanto la tipificación viral como la evaluación del estado de integración tienen valor diagnóstico y pronóstico en las displasias de cuello uterino (Hudelist et al. 2004).

Se acepta que durante la infección por VPH16 los tres estados físicos posibles del genoma viral (episomal, integrado, mixto) pueden estimarse indirectamente por PCR en tiempo real (qPCR) con el cociente *E2/E6* . En el estado episomal puro los valores del cociente *E2/E6* son cercanos a la unidad, mientras que en el estado integrado puro son cercanos a cero y en el estado mixto (i.e., cuando coexisten las formas episomal e integrada) tienen valores intermedios (Nagao et al. 2002, Yoshida et al. 2007, De Marco et al. 2007, Cricca et al. 2007).

La progresión de las neoplasias ha sido asociada con una alta carga de secuencias virales integradas (Peitsaro et al. 2002). Algunos autores han encontrado que la carga viral es significativamente mayor en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL por sus siglas en inglés; cuyo nivel máximo es el carcinoma de células escamosas o SCC) mientras que en las de bajo grado (LSIL o NIC1) el cociente *E2/E6* disminuye con la progresión neoplásica y permite diferenciar entre lesiones de bajo y alto grado (NIC1/NIC2-3, NIC1/SCC) (Crica et al. 2007, Maelle-Saunier et al. 2008). En contraste, hay autores que han encontrado integración del genoma viral en lesiones de cualquier grado, asociadas a carga viral baja (Berumen et al. 1994) o sin correlacionar con la carga viral (Andersson et al. 2005).

Las diversas conclusiones contradictorias de este tipo de trabajos posiblemente radica en la amplia variedad de métodos empleados, los cuales tienen limitaciones técnicas y de interpretación y subrayan la necesidad de verificar la sensibilidad y especificidad de las técnicas y su concordancia (Saveria Campo 2007, López y Aristizábal 2006).

### **PARTÍCULAS VIRALES DEFECTUOSAS INTERFERENTES**

Las partículas defectuosas interferentes (DIPSs), descritas por Henle y Henle (1943) y von Magnus (1954), son partículas que encapsidan genomas virales incompletos, surgen espontáneamente durante la replicación de virus de RNA y de DNA (Huang y Baltimore 1970, Cole et al. 1971, Lazzarini et al. 1981) y son

incapaces de causar infecciones productivas debido a las deleciones de sus genomas (Holland y Doyle 1973, Kristen et al. 2009).

Las DIPS y los genomas virales completos coinfectan las mismas células y por lo tanto compiten por los recursos de replicación y encapsidación dado que las DIPS son amplificadas a expensas de las partículas virales completas. La infección de células BHK con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) es uno de los mejores sistemas para el estudio de la generación e interacción de las partículas virales defectuosas (Kristen et al. 2009). Se han identificado ciertas deleciones del VSV que generan genomas defectuosos e interfieren con los mecanismos de replicación viral (Perrault y Semler 1979).

Las DIPS carecen del complemento completo de los genes necesarios para llevar a cabo todo el ciclo de replicación viral y requieren que otro virus o la maquinaria del hospedero provea las funciones faltantes. Algunos retrovirus han captado secuencias de la célula hospedera pero han perdido algunas funciones y por ello requieren de un virus auxiliar ('helper') que retenga tales funciones. El virus de la hepatitis 'delta' (con genoma de RNA) es considerado defectuoso porque no codifica sus propias proteínas estructurales y utiliza las del virus de la hepatitis B (con genoma de DNA). En los casos de hepatitis B crónica se ha demostrado que la presencia del agente 'delta' está asociada a mayor inflamación, necrosis parenquimatosa y displasia que en los casos sin agente 'delta', lo cual indica que en pacientes con hepatitis B crónica la presencia de ambos virus aumenta el daño hepático y acelera la progresión de la enfermedad (Kanel et al. 1984).

Aunque se desconoce el papel de las partículas virales defectuosas en las infecciones naturales (Kristen et al. 2009), la presencia de ciertas partículas defectuosas del virus de la hepatitis B (deleción de 183 pb) interfiere con la infección, replicación y liberación de las partículas virales en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (Cabrerizo et al. 2002). La propagación de las partículas defectuosas es favorecida cuando se utiliza como inóculo infectante una suspensión con alta multiplicidad de infección que implica un exceso de partículas virales en relación con el número de células infectadas (Rowe y Bau 1965). Aun no han sido descritas partículas interferentes asociadas a la infección por papilomavirus.

## **JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO**

El programa de detección oportuna del CaCu en México atiende a mujeres que son sujetas a exploración ginecológica y toma de raspados cervicales analizados con el método de Papanicolaou desde la década de 1970, pero no ha reducido significativamente la mortalidad por CaCu.

Además de las limitaciones en la sensibilidad y especificidad del Papanicolaou, el diagnóstico citológico convencional detecta un exceso de

mujeres con resultados no concluyentes (ASCUS, LSIL), sin lesiones significativas, o con lesiones que regresan espontáneamente. Estas limitaciones provocan una elevada sobrecarga asistencial para el diagnóstico y tratamiento (Puig-Tintoré 2003).

Por ello es deseable desarrollar métodos de tamizaje masivos más específicos y sensibles, con valor predictivo y costo accesible que sirvan para el diagnóstico y la evaluación de la progresión de las lesiones neoplásicas de manera más objetiva que el Papanicolaou.

### **ESTRATEGIA EMPLEADA**

En el presente trabajo desarrollamos un método ultrasensible de cuantificación de las secuencias de los genes *E6* y *E2* de papilomavirus humano tipo 16 utilizando una PCR anidada en tiempo real con EvaGreen como intercalador fluorescente del DNA.

Los marcadores virales fueron evaluados de manera individual en cada muestra mediante interpolación con una curva tipo preparada con diluciones seriadas de pHV101 (*E6*) y pHV201 (*E2*) calculando posteriormente el cociente  $E2/E6$ , realizando el análisis estadístico mediante el programa SPSS.

### **ETAPAS DEL TRABAJO**

El trabajo fue realizado en cinco etapas:

1. Optimización de las condiciones para la amplificación de los genes *E2* y *E6* de VPH16.
2. Clonación de los amplicones de ambos genes para calibrar el número de copias en la qPCR con las construcciones obtenidas.
3. Desarrollo y validación de la qPCR con EvaGreen.
4. Incremento de la sensibilidad mediante la qPCR anidada.
5. Estimación de la carga viral y la integración mediante la cuantificación de las copias de *E2* y *E6* presentes en raspados cervicales con displasias y CaCu.

### **ORGANIZACIÓN DE LA TESIS**

La tesis consta de cinco capítulos.

El primero es esta introducción general.

El segundo describe el desarrollo del método de qPCR con EvaGreen, publicado en Analytical Biochemistry (Hernández-Arteaga y López-Revilla 2008).

El tercero describe el método de qPCR anidada y su aplicación para la cuantificación ultrasensible del gen *E6* de VPH16 en la línea celular SiHa, publicado en Infectious Agents and Cancer (Hernández-Arteaga y López-Revilla 2010).

El cuarto trata de la cuantificación de los genes *E2* y *E6* de VPH16 mediante qPCR anidada y la determinación del cociente  $E2/E6$  en raspados

cervicales de mujeres con displasias y CaCu para evaluar la estimación de la carga y la integración viral como marcadores de progresión. Este capítulo consiste en el borrador del manuscrito que estamos preparando para enviar a publicación (S. Hernández-Arteaga, Socorro Hernández-Arteaga, Alejandro García-Carrancá, Gerardo Alfonso Anguiano-Vega, Julio Juárez-Álvarez, Rubén López-Revilla)

El quinto capítulo contiene la discusión general, en la cual resumimos las principales conclusiones del trabajo, a saber: 1) la cuantificación del oncogén *E6* de VPH16 mediante qPCR con EvaGreen es reproducible y específica, 2) la qPCR anidada con EvaGreen es ultrasensible y confiable para cuantificar la carga de *E2* y *E6* de VPH16 y 3) por primera vez mostramos que durante la infección natural del cérvix por VPH16 podrían estar ocurriendo deleciones aleatorias no sólo del gen *E2* sino también del gen *E6*, que podrían generar partículas defectuosas interferentes cuya proporción podría variar en infecciones subsiguientes y tener efectos sustanciales sobre la replicación viral, la progresión neoplásica y la inmunidad.

Después del cuerpo de la tesis se encuentran las referencias bibliográficas y las copias de los artículos de investigación publicados por la autora de esta tesis.

## **CAPÍTULO II. CUANTIFICACIÓN DEL ONCOGÉN *E6* DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL CON EVA GREEN**

### **RESUMEN**

El cáncer cervicouterino se desarrolla en mujeres con infección persistente por papilomavirus humanos (VPH) de alto riesgo, entre los cuales predomina el tipo 16. La cuantificación del oncogén *E6* de VPH16 (*E6*-VPH16) mediante PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) con SYBRGreen como fluorocromo intercalante del DNA ha sido empleada para determinar la carga viral y correlacionarla con las lesiones neoplásicas. EvaGreen, nuevo fluorocromo intercalante, ha sido empleado para cuantificar el DNA y propuesto para la qPCR. En este trabajo comparamos la eficiencia de EvaGreen y SYBRGreen para cuantificar *E6*-VPH16 por qPCR en mezclas con un número conocido de copias de la construcción pHV101 que porta *E6*-645, producto de 645 pb que incluye al ORF *E6* completo de la variante Europea de VPH16. Obtuvimos familias de curvas de los productos de amplificación de *E6*-645 en mezclas con diluciones logarítmicas seriadas de pHV101 incubadas en presencia de SYBRGreen o EvaGreen. Las familias de curvas obtenidas a partir de pHV101 fueron reproducibles y el promedio de ciclos umbrales (Ct) fue 4.4 ciclos menor con EvaGreen que con SYBRGreen. Los perfiles de extinción térmica de fluorescencia de los productos amplificados a partir de pHV101 fueron idénticos a los amplificados a partir del genoma de VPH16, con un pico a 85.5°C. La cuantificación del ORF *E6*-VPH16 es por tanto reproducible, específica y más sensible en mezclas de qPCR con EvaGreen que con SYBRGreen y confirma la utilidad del EvaGreen como agente intercalante para la qPCR.

### **INTRODUCCIÓN**

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres del mundo (Snijders, et al. 2006) y la primera entre las mujeres de los países pobres (Arrosi et al. 2003). Para el desarrollo del CaCu es necesaria la infección por papilomavirus humanos (VPH) de alto riesgo (Walboomers et al. 1999; Kraus et al. 2006; Bosch et al. 2002), entre los cuales VPH16 es el tipo viral más frecuentemente asociado al CaCu invasor (Muñoz et al. 1993).

La PCR en tiempo real (qPCR) (Higuchi et al. 1993), se basa en el monitoreo de la señal fluorescente para detectar y cuantificar los productos amplificados en cada ciclo. La detección de los productos de qPCR puede hacerse con agentes que fluorescencia al intercalarse en el DNA (Reischl y Kochanowski, 1995), así como con oligonucleótidos o sondas fluorescentes (McPherson, 1995). SYBRGreen es el agente intercalante más empleado (Lekanne et al. 2002). La

qPCR con SYBRGreen ha sido empleada para detectar la infección por VPH16 (Crovella et al. 2002; Cricca et al. 2007), determinar su prevalencia (Kulmala et al. 2007) y correlacionar la carga viral con el grado de las lesiones preneoplásicas y neoplásicas (Cricca et al. 2007; Kosel et al. 2007). EvaGreen, un nuevo fluorocromo intercalante más barato y eficiente que SYBRGreen ha sido empleado para cuantificar el DNA en microplacas (Ihrig et al. 2006), capilares para electroforesis (Sang et al. 2006) y tubos (Wang et al. 2006) y acaba de ser propuesto como un agente intercalante prometedor para la qPCR (Mao et al. 2007).

En este trabajo determinamos la eficiencia relativa de la qPCR con EvaGreen para cuantificar la carga viral de VPH16, para lo cual obtuvimos las familias de curvas de la fluorescencia con SYBRGreen o EvaGreen en mezclas con un número creciente de copias de la construcción pHV01 que contiene el inserto *E6-645*, cuya secuencia incluye el ORF *E6* (nt 83-559) del prototipo Europeo de VPH16 (GeneBank, acceso 1489078). Los valores de Ct de la familia de curvas de amplificación obtenida con diluciones logarítmicas seriadas de pHV101 fueron 4.4 ciclos menores con EvaGreen y los productos amplificados tuvieron perfiles de extinción térmica de la fluorescencia idénticos a los amplificados a partir de pVPH16. Concluimos que la cuantificación del ORF *E6* -VPH16 es reproducible, específica y 23 veces más sensible que con SYBRGreen y apoya el uso de EvaGreen para la qPCR.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Clonación del inserto *E6-645***

*E6-645* de VPH16, producto de PCR del segmento de 645 pares de bases (pb) (nt 26-671 del genoma de VPH16) que contiene el ORF *E6* -VPH16 de 476 pb completo (nt 83-559) fue amplificado con la pareja de oligonucleótidos LCRS/E7AS (Fujinaga et al. 1991) a partir del plásmido pVPH16 que contiene el genoma completo del prototipo VPH16 Europeo (Yamada et al. 1997 y 1995), usando las condiciones de amplificación descritas previamente (López-Revilla et al. 2008).

El producto *E6-645* fue ligado in vitro a pGEM (Invitrogen) en una mezcla de ligación de 10  $\mu$ L contenía 5  $\mu$ L de amortiguador de ligación 2 $\times$ , 1.5  $\mu$ L de agua, 2  $\mu$ L de la mezcla de PCR, 1  $\mu$ L de DNA ligasa de T4 (3 U/ $\mu$ L), 0.5  $\mu$ L del vector pGEM (50 ng/ $\mu$ L) y fue incubada toda la noche a 4°C. Con ella transformamos células de *Escherichia coli* TOP10 añadiendo 2  $\mu$ L de la mezcla a 50  $\mu$ L de una suspensión bacteriana en fase exponencial ( $A_{260} = 0.6$ ), la cual electroporamos con un pulso de 25  $\mu$ F, 400  $\Omega$ , 2.5 kV. Inoculamos cada mezcla electroporada en 1 mL de caldo LB y la incubamos con agitación a 37°C por 45 min; después la centrifugamos a 12,000 $\times$ g e inoculamos la pastilla celular a un

matraz con 200 mL de caldo LB el cual incubamos con agitación a 37°C toda la noche. Del matraz tomamos 30 o 100 µL de suspensión para inocular placas de agar LB-ampicilina (1 mg/mL) que habían sido espatuladas con 14 µL de X-Gal al 10% y 20 µL de isopropil-β-tiogalactósido (IPTG, 20 mg/mL), a fin de seleccionar colonias transformantes Lac<sup>-</sup> (blancas) o Lac<sup>+</sup> (azules). Para asegurar el origen clonal de las bacterias transformantes hicimos dos resiembras sucesivas por estría de colonias aisladas.

Analizamos cinco clonas mediante detección ultrarrápida de tres transformantes Lac<sup>-</sup> (SL103, SL104, SL110) y dos Lac<sup>+</sup> (SL105, SL111). La mezcla de lisis de cada muestra contenía 20 µL de amortiguador de carga (glicerol al 30%, xilenocianol al 0.02%, orange G al 0.02%), 3 µL de SDS al 1% y 10 µL de agua. Con la punta de la pipeta tomamos cada colonia transformante y la mezclamos con 33 µL de la solución de lisis; agitamos con el vórtex por 5 seg, agregamos 33 µL de fenol-cloroformo (1:1), centrifugamos a 130×g y cargamos 10 µL de la fase acuosa en un gel de SB-agarosa al 1% para identificar las clonas con plásmidos. Seleccionamos la transformante SL104 Lac<sup>-</sup> que porta el plásmido pHV101 con el inserto del tamaño esperado (~645 pb), e hicimos una preparación de pHV101 con el kit PureYield Plasmid MiDIPsrep System (Promega, Madison, WI).

Mediante electroforesis en geles de SB-agarosa al 1% corridos por 2 h a 80 V (Brody y Kern 2004) seguida de tinción con bromuro de etidio, visualizamos las bandas de DNA por transiluminación con luz ultravioleta y registramos las imágenes digitales en un fotodocumentador ChemiDoc EQ (BioRad, Hercules, CA). Con el kit PicoGreen dsDNA Quantitation (Molecular Probes, Eugene, OR) determinamos la concentración de DNA con el fluorómetro GENios (TECAN, San Jose, CA) acoplado a una computadora con el programa Magellan 4. En una microplaca FIA negra de 96 pozos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) colocamos 198 µL de la solución de ensayo (PicoGreen 1:400 en TE) y 2 µL de DNA estándar o de cada muestra problema. El contenido de DNA de los problemas fue calculado por interpolación en la curva tipo derivada de pozos que contenían 5, 10, 25 o 50 ng de DNA del fago λ; la preparación de pHV101 contenía 101.4 ng/µL y la de pHV103 285.4 ng/µL.

### **Caracterización de pHV101 y pHV103**

La digestión de pHV101 y pHV103 con *Pst* I y *Nco* I fue realizada en mezclas de 30 µL que contenían 10 µL del DNA de cada construcción, 3 µL de amortiguador de digestión (Tris-HCl 50 mM NaCl 50 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 8.0), 1.5 µL de la solución de cada enzima (10 U/µL) y 15.5 µL de agua. La corrida electroforética se llevó a cabo en un gel de SB-agarosa al 1 % (Yamada et al. 1995) por 2 h a 80 V que luego fue teñido con bromuro de etidio y fotodocumentado.

### **Condiciones de amplificación**

En mezclas de PCR convencional probamos concentraciones variables de  $MgCl_2$ , dNTPs, oligonucleótidos y *Taq* polimerasa y un gradiente de temperatura de *hibridación* para encontrar las condiciones que maximizaran la amplificación de *E6-645*. Rangos de las condiciones probadas:  $MgCl_2$  0-4 mM, dNTPs 0-0.4 mM, oligonucleótidos 0-0.6  $\mu M$ , *Taq* polimerasa 0-30 mU, *hibridación* a 55-60°C. Mediante electroforesis de muestras de 10  $\mu L$  en geles de SB-agarosa al 1.5% corridos por 2 h a 90 V seguida de tinción con bromuro de etidio, visualizamos los productos de PCR de cada reacción. Los pixeles de las bandas principales de cada experimento fueron cuantificados con el programa Quantity One (BioRad, Hercules, CA, USA).

### **PCR en tiempo real con SYBRGreen y EvaGreen**

Amplificamos *E6-645* con los oligonucleótidos LCRS (5'-AAGGGAGTAACCGAAAACGGT-3') y E7AS (5'-TCATCCTCCTCCTCTGAG-3') (Fujinaga et al. 1991) en el Icyler (BioRad, Hercules, CA, USA). Empleamos como molde 1  $\mu L$  de diluciones logarítmicas seriadas de pHV101 linealizado con *Pst I* de manera que las mezclas contuvieran  $2.5 \times 10^4$ - $2.5 \times 10^8$  copias. Las mezclas de PCR con SYBRGreen contenían 23.25  $\mu L$  de agua, 0.75  $\mu L$  de una mezcla con los oligonucleótidos forward y reverse (0.15  $\mu M$  c/u) y 25  $\mu L$  de SYBRGreen PCR Master Mix 20 $\times$  (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las mezclas con EvaGreen contenían 38.2  $\mu L$  de agua, 0.75  $\mu L$  de una mezcla con los oligonucleótidos forward y reverse (0.15  $\mu M$  c/u),  $MgCl_2$  2 mM, dNTP 0.05 mM (c/u), amortiguador de PCR 10 $\times$ , 30 mU de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y 2.5  $\mu L$  de EvaGreen 20 $\times$  (Biotium, Hayward, CA, USA). El programa del termociclador constó de 40 ciclos con desnaturalización a 94°C por 15 seg, *hibridación* a 57°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y extensión final a 72°C por 10 min.

## **RESULTADOS**

### **Clonación de *E6-645***

Clonamos el segmento *E6-645* amplificado a partir de pVPH16 para contar con la secuencia nucleotídica blanco de referencia que permitiera calibrar la cuantificación del ORF *E6-VPH16* mediante qPCR.

Ligamos *E6-645* in vitro a pGEM-T y con la mezcla de ligación electroporamos células de *E. coli* TOP10 y aislamos transformantes resistentes a ampicilina Lac<sup>-</sup> a partir de colonias blancas y Lac<sup>+</sup> a partir de colonias azules.

Mediante detección ultrarrápida seleccionamos las clonas SL104 Lac<sup>-</sup> y SL105 Lac<sup>+</sup>, de las cuales purificamos respectivamente pHV101 de 3.7 kb con el inserto *E6-645* y pHV103 de 3 kb (vacío).

A partir de cultivos de 50 mL obtuvimos preparaciones de pHV101 (101.4 ng) y de pHV103 (285.4 ng). Como 1 ng de pHV101 equivale a  $2.5 \times 10^8$  copias de

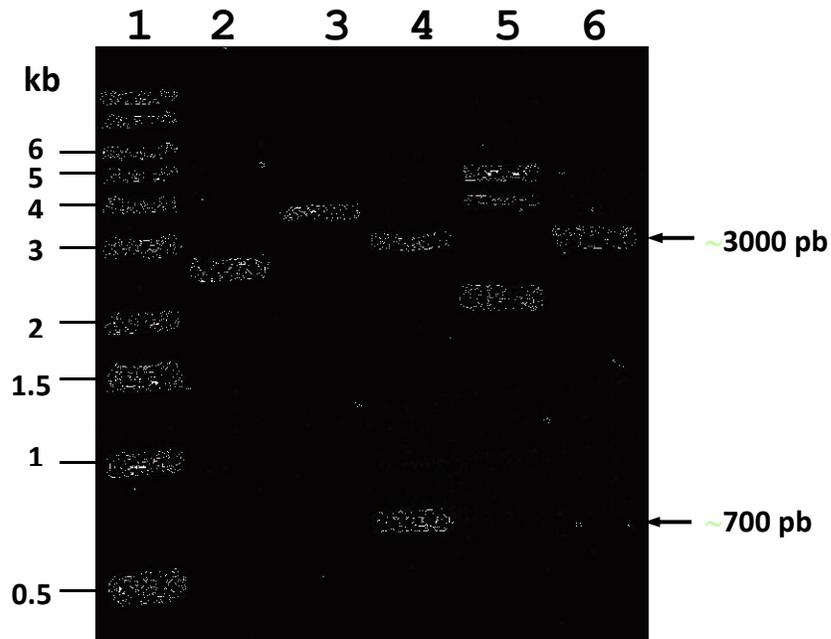
*E6 -645* (Staroscik 2002), la cantidad de pHV101 purificada era suficiente para calibrar al menos 100 ensayos de qPCR con 10 ng del plásmido con inserto (equivalentes a  $2.5 \times 10^8$  copias iniciales de *E6 -645*).

### **Caracterización de pHV101 y secuencia del inserto**

Para verificar si pHV101 contiene el inserto *E6 -645* entre los sitios de corte *Pst I* y *Nco I* únicos, comparamos las construcciones intactas con las digeridas con cada una o con ambas enzimas.

Los plásmidos pHV101 y pHV103 linealizados con *Pst I* tuvieron longitudes de ~3700 pb y ~3000 pb, respectivamente. El tratamiento simultáneo de pHV101 con *Pst I* y *Nco I* generó dos fragmentos: el mayor de ~3000 pb (igual al de pHV103 linealizado con *Pst I*) y el del inserto de ~700 pb (Figura. 6).

Para saber si pHV101 porta el inserto completo, incubamos cada construcción con cada enzima o con ambas y determinamos el tamaño de los fragmentos generados. Como se aprecia en la Figura 6, el fragmento de 700 pb sólo se liberó al digerir el plásmido pHV101 con las dos enzimas de restricción (Figura. 6, carril 4). Demostramos así que el inserto está completo porque las mezclas de PCR convencional con pHV101 intacto y lineal y la pareja de oligonucleótidos LCR/E7AS generaron la banda de *E6 -645* del tamaño esperado.



**Figura. 6. Análisis electroforético de los plásmidos pHV101 y pHV103 digeridos con las endonucleasas *Pst* I y *Nco* I.**

Gel de agarosa al 1%. Carril 1, Marcador de tamaño molecular de 1 kb. Carril 2, pHV101 intacto. Carril 3, pHV101 incubado con *Pst* I. Carril 4, pHV101 digerido con *Pst* I y *Nco* I. Carril 5, pHV103 sin digerir. Carril 6, pHV103 cortado con *Pst* I. Las flechas señalan el vector y el inserto de alrededor de 700 pb liberado por las enzimas *Pst* I y *Nco* I.

Estos resultados confirmaron además que pHV101 tiene los dos sitios de corte *Pst I* y *Nco I* únicos flanqueando al inserto *E6 -645* y por lo tanto puede servir para calibrar el número de copias iniciales del ORF *E6 -VPH16* en las mezclas de qPCR.

El análisis de las cadenas de DNA sentido y antisentido amplificadas a partir de pHV101 con la pareja de oligonucleótidos LCR/E7AS mostró que la secuencia consenso del inserto *E6 -645* abarca los nt 26-627 del ORF *E6 -VPH16* y es idéntica a la esperada (GeneBank, acceso AY686581) excepto por la inserción de una timina adicional en la posición 106 (Figura. 7).

### **Amplificación de *E6 -645* en presencia de SYBRGreen o EvaGreen**

Para optimizar la amplificación de *E6 -645* en mezclas de PCR convencional a partir de pHV101 y la pareja LCR/E7AS, variamos las concentraciones de cuatro componentes y la temperatura de *hibridación*. Las condiciones finales fueron: MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTP 0.05 mM (c/u), oligonucleótidos 0.15 μM (c/u), *Taq* polimerasa 30 U/ml y *hibridación* a 57°C.

Luego comparamos la amplificación de *E6 -645* por qPCR en presencia de SYBRGreen o de EvaGreen en mezclas que contenían 2.5×10<sup>4</sup>-2.5×10<sup>8</sup> copias de pHV101 y la pareja LCR/E7AS. Con ambos fluorocromos obtuvimos familias de curvas consistentes (Figura. 8). Los valores de Ct con 2.5×10<sup>6</sup> copias fueron 18.2 para SYBRGreen y 13.8 para EvaGreen (ΔCt = 4.4).

Con SYBRGreen la amplificación fue consistente en el rango de 2.5×10<sup>6</sup> a 2.5×10<sup>8</sup> copias de *E6 -645* y la fluorescencia inespecífica (i.e., en mezclas sin DNA) empezó a aumentar a partir del ciclo 25. Con EvaGreen el rango de amplificación consistente fue más amplio, de 2.5×10<sup>4</sup> a 2.5×10<sup>8</sup> copias, y la fluorescencia inespecífica empezó a aumentar a partir del ciclo 29.

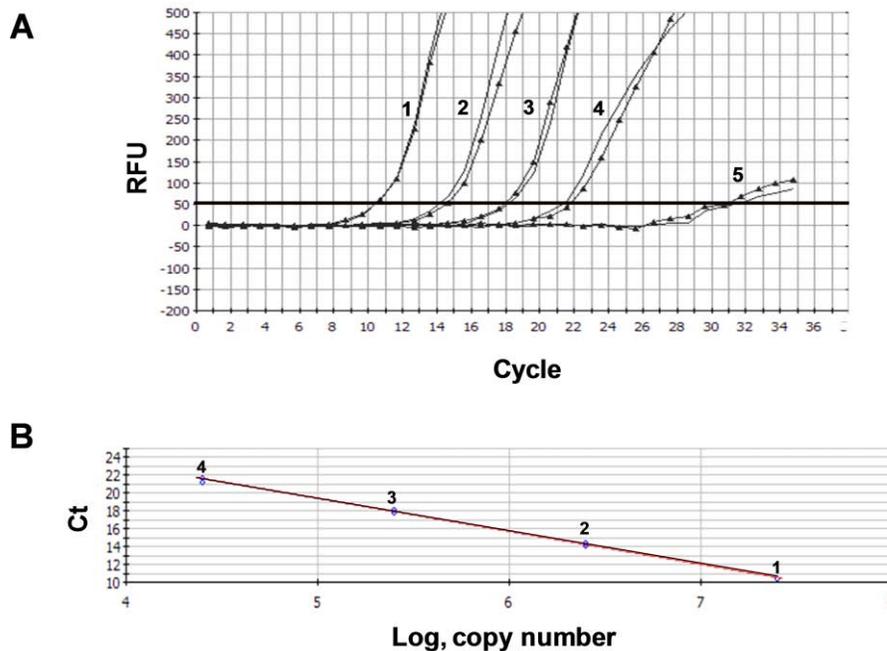
Determinamos la sensibilidad relativa con la ecuación  $N = \text{Antilog}(0.3 \times \Delta Ct)$ , en donde N es la sensibilidad relativa y ΔCt es el incremento promedio de los valores de Ct obtenidos con ambos agentes intercalantes, que en promedio fue 4.57 (Tabla 2). Este valor implica que la sensibilidad relativa es 23 veces mayor con EvaGreen que con SYBRGreen; este dato fue reforzado por el hecho de que el número mínimo de copias amplificables consistentemente en mezclas con EvaGreen (2.5×10<sup>3</sup>) fue dos órdenes de magnitud menor que el de mezclas con SYBRGreen (2.5×10<sup>5</sup>) (datos no mostrados).

La amplificación de *E6 -645* en presencia de EvaGreen en dos experimentos independientes con mezclas que contenían 2.5×10<sup>4</sup>-2.5×10<sup>7</sup> copias de pHV101 dió valores de Ct consistentes (ΔCt<sub>avg</sub> = 3.703) y reproducibles (r<sub>2</sub> = 0.999; CV<sub>avg</sub> = 0.6%) (Tabla 3, Figura. 9).

26	<b>aagggcgtaa</b>	<b>ccgaaatcgg</b>	<b>ttgaaccgaa</b>	accggttagt	ataaaagcag	acattttatg
	caccaaaga	gaactgcaat	tttcaggacc	cacaggagcg	accagaaag	ttaccacagt
	tatgcacaga	gctgcaaaca	actatacatg	atataatatt	agaatgtgtg	tactgcaagc
	aacagttact	gcgacgtgag	gtatatgact	ttgcttttcg	ggatttatgc	atagtatata
	gagatgggaa	tccatatgct	gtatgtgata	aatgtttaaa	gttttattct	aaaattagtg
	agtatagaca	ttattgttat	agtttgatg	gaacaacatt	agaacagcaa	tacaacaac
	cgttgtgtga	tttgtaatt	aggtgtatta	actgtcaaaa	gccactgtgt	cctgaagaaa
	agcaaagaca	tctggacaaa	aagcaaagat	tccataatat	aaggggtcgg	tggaccggtc
	gatgtatgct	ttgttcaga	acatcaagaa	cacgtagaga	aaccagctg	taatcatgca
	tggagataca	tctacattgc	atgaatatat	gttagatttg	caaccagaga	caactgatct
627	ctactgttat	gagcaattaa	atgacag <b>ctc</b>	<b>agaggaggag</b>	<b>gatga</b>	

**Figura. 7. Secuencia consenso del inserto E6 -645**

La secuencia del inserto E6 -645 abarca los nucleótidos 26-671 (645 pb) del genoma de VPH16 y está delimitado por los oligonucleótidos LCR y E7AS (letras blancas con fondo negro) en los extremos 5' y 3' respectivamente. El inserto contiene 38% de GC y su secuencia es 99.8% idéntica al ORF E6 -VPH16.



**Figura. 8. Familia de curvas de amplificación de E6 -645 en presencia de EvaGreen**

Las mezclas de qPCR fueron preparadas por duplicado con diluciones logarítmicas de pHV101. RFU, unidades de fluorescencia relativa. Los números junto a cada curva indican muestras por duplicado (en negro y triángulos rellenos) con el mismo número de copias de pHV101. Carril 1,  $2.5 \times 10^7$  copias. Carril 2,  $2.5 \times 10^6$  copias. Carril 3,  $2.5 \times 10^5$  copias. Carril 4,  $2.5 \times 10^4$  copias. Carril 5, blanco (agua). (A) Familia de curvas con el umbral fijado a 50 RFU. (B) Regresión lineal de los valores de Ct con el logaritmo del número de copias de pHV101.

Para determinar si los productos *E6* -645 amplificados a partir de pHV101 son específicos/idénticos, analizamos los perfiles de extinción térmica de la fluorescencia de mezclas de reacción que contenían diluciones logarítmicas seriadas de copias iniciales de pHV101. Los perfiles fueron nulos en la mezcla blanco y similares en las mezclas calibradas con pHV101, con un pico de extinción máxima a 86°C, con lo cual confirmamos que la amplificación de *E6* -645 es específica y los productos son idénticos (Figura. 9).

## DISCUSIÓN

Para clonar el ORF *E6* -VPH16 y poder producir, purificar y emplear un número conocido de copias de la construcción para calibrar la qPCR, amplificamos el fragmento *E6* -645 con los oligonucleótidos correspondientes (Fujinaga et al. 1991). El plásmido con el inserto serviría después de molde para calibrar el número de copias del ORF *E6* -VPH16 en las mezclas de qPCR con los mismos oligonucleótidos.

La clona de *E. coli* SL104 (Lac-) porta pHV101, plásmido derivado de pGEM con el inserto *E6* -645 completo y la clona SL105 (Lac+) porta pHV103, derivado de pGEM vacío. Los tamaños relativos de pHV101 y pHV103 fueron los esperados para las construcciones con el plásmido vacío y con el inserto *E6* -645 completo. A partir de estos resultados obtuvimos preparaciones del DNA plasmídico de ambas clonas; la de pHV101 rindió poco más de 100 ng, con los cuales podríamos preparar unas 100 mezclas de qPCR con diluciones logarítmicas seriadas del plásmido a partir de 1 ng (equivalente a  $2.5 \times 10^8$  copias) para generar las familias de curvas con un número conocido de copias de la secuencia blanco.

La secuencia del inserto de pHV101 resultó idéntica a la del prototipo europeo de VPH16 almacenada en GenBank (acceso K02718.1) excepto por la inserción de una timina en la posición 106 (identidad: 644 pb/645 pb = 99.8%), con lo cual confirmamos que el plásmido efectivamente contiene el inserto completo de *E6* -645 y puede ser usado para calibrar el número de copias en las mezclas de qPCR.

La amplificación de un número conocido de copias de *E6* -645 en presencia de SYBRGreen o EvaGreen confirmó la reproducibilidad y la sensibilidad relativa de la qPCR con ambos fluorocromos. Hubo escasa dispersión de los valores de  $\Delta Ct_{avg}$  en las curvas obtenidas con diluciones logarítmicas seriadas de *E6* -645 (Tabla 2) y los perfiles de extinción térmica de fluorescencia de los productos generados a partir de pHV101 fueron idénticos (Figura. 9). Estos resultados indican además que la amplificación del ORF-*E6* de VPH con EvaGreen es reproducible (rango de  $\Delta Ct_{avg}$ : 3.42-3.84) y 23 veces más sensible que con SYBRGreen, por lo cual el uso de EvaGreen parece ser más ventajoso (Tabla 3).

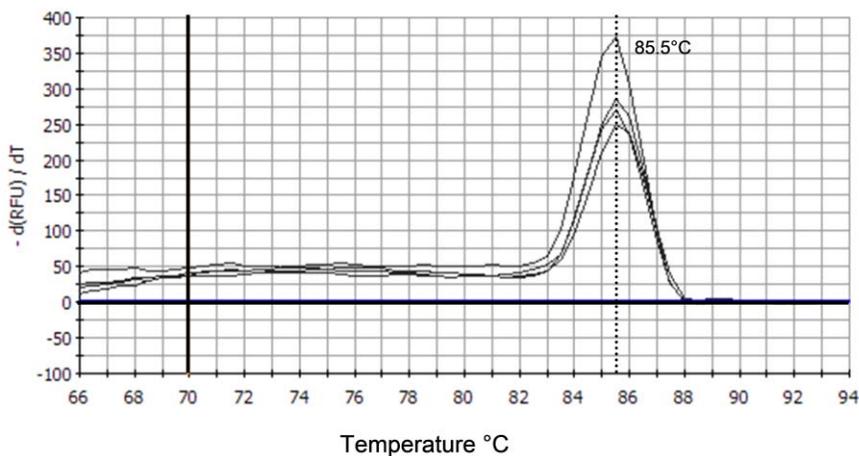
**Tabla 2. Valores de Ct en la amplificación de E6 -645 con SYBRGreen o EvaGreen**

Copias de pHV101	Ct		$\Delta Ct$
	SYBRGreen	EvaGreen	
$2.5 \times 10^6$	18.20	13.80	4.40
$2.5 \times 10^7$	14.74	10.00	4.74

**Tabla 3. Valores de Ct en la amplificación de E6 -645 con EvaGreen**

Copias de pHV101	Ct <sup>a</sup>	Ct <sub>avg</sub>	$\Delta Ct_{avg}$
$2.5 \times 10^7$	10.42, 10.42	10.42	---
$2.5 \times 10^6$	14.08, 14.45	14.26	3.84
$2.5 \times 10^5$	18.08, 18.15	18.11	3.85
$2.5 \times 10^4$	21.32, 21.75	1.53	3.42

<sup>a</sup> Promedio de mezclas por duplicado en dos ensayos independientes.



**Figura. 9. Desnaturalización térmica de los productos E6 -645**

Después de haber sido incubadas por 70 ciclos, las mezclas de qPCR fueron sujetas a calentamiento progresivo con incrementos de 0.5°C (desde 57°C hasta 90°C) para obtener los perfiles de desnaturalización térmica. RFU, unidades de fluorescencia relativa. Línea roja, mezcla blanco (sin DNA), sin extinción. Líneas negras, muestras con  $2.5 \times 10^4$  -  $2.5 \times 10^7$  copias de pHV101 (todas con extinción máxima a 86°C).

## CAPÍTULO III. CUANTIFICACIÓN ULTRASENSIBLE DEL ONCOGÉN *E6* DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 MEDIANTE QPCR ANIDADA

### RESUMEN

Hemos desarrollado un método de PCR en tiempo real (qPCR) ultrasensible basado en preamplificación convencional seguida de qPCR anidada en presencia del agente intercalante EvaGreen. Calibramos las mezclas de amplificación iniciales con un número conocido de copias del plásmido pHV101 –que porta un inserto de 645 pb del oncogén *E6* de VPH16– como molde para generar sucesivamente el amplicón *E6* -1 (645 pb) por PCR convencional y *E6* -2 (237 pb) por qPCR anidada. Las mezclas de qPCR directa y anidada para *E6* -2 equivalentes a  $2.5 \times 10^3$  a  $2.5 \times 10^6$  copias de pHV101 dieron valores de Ct en los rangos de 18.7-29.0 y 10.0-25.0, respectivamente. En mezclas de qPCR con 50 ng de DNA de la línea SiHa, que porta una copia de VPH16 por célula, el Ct promedio fue 19.9. Los patrones de extinción térmica de la fluorescencia de los productos de pHV101 y SiHa fueron idénticos, con un pico en 85.5°C. Concluimos que la preamplificación por 15 ciclos aumenta 10,750 veces la sensibilidad de la qPCR anidada y permite cuantificar confiablemente el oncogén *E6* ya que confirmamos que la línea SiHa contiene una copia del genoma de VPH16 por genoma celular humano diploide.

### INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino se desarrolla en mujeres con infección persistente por papilomavirus humanos (VPH) de alto riesgo, entre los cuales predominan los tipos 16 y 18 (Muñoz et al. 2003). El VPH tipo 16 es responsable de la mitad de los casos de cáncer invasor en el mundo (Bosch 2003, Walboomers et al. 1999). Los métodos moleculares para cuantificar las copias del genoma de VPH16 permiten determinar la carga viral y dar seguimiento a la progresión de las lesiones neoplásicas por VPH16. Para el diagnóstico molecular de la infección por VPH se emplea la captura de híbridos (Gravitt et al. 2003) o PCR convencional (Sotlar et al. 2004) y para evaluar la carga viral se emplea la qPCR (Hubbard 2003, Mayrand et al. 2007).

La PCR anidada es más sensible que la PCR directa para detectar secuencias del oncogén *E6* de VPH16 (Noda et al. 1998, López-Revilla et al. 2008) cuya cuantificación es reproducible, específica y más sensible en mezclas de qPCR con EvaGreen (Hernández-Arteaga et al. 2007, Hernández-Arteaga y López-Revilla 2008).

En este trabajo desarrollamos un método ultrasensible para cuantificar el oncogén *E6* de VPH16 que se basa en la amplificación anidada en dos etapas: 1)

preamplificación inicial del producto *E6* -1 (645 pb) por 15 ciclos de PCR convencional y 2) amplificación del producto *E6* -2 (237 pb) por qPCR anidada en presencia del agente intercalante EvaGreen. La preamplificación vuelve al método ultrasensible y con él confirmamos que en la línea SiHa sólo hay una copia del genoma de VPH16 por célula.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Condiciones de amplificación**

E-645, el inserto de pHV101, abarca el ORF *E6* y puede usarse como molde inicial para generar sucesivamente los amplicones *E6* -1 (645 pb) por PCR directa y *E6* -2 (237 pb) por PCR anidada (Figura. 10) con las parejas de oligonucleótidos diseñadas previamente (Hernández-Arteaga y López-Revilla, 2008) que mostramos en la Tabla 4.

La síntesis de los amplicones *E6* -1 y *E6* -2 en mezclas de 50 µL de PCR convencional con  $2.5 \times 10^6$  copias de pHV101 fue maximizada en las siguientes condiciones: MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTPs 0.05 mM (c/u), oligonucleótidos 0.15 µM (c/u), 30 U/ml de *Taq* polimerasa y *hibridación* a 57°C.

Analizamos los productos de PCR mediante electroforesis en geles de borato de sodio-agarosa al 1.5% (Brody and Kern 2004) por 2 h a 90 V, seguida de tinción con bromuro de etidio. Visualizamos los productos de PCR por transiluminación con luz ultravioleta, registramos las imágenes digitales en un fotodocumentador ChemiDoc EQ (BioRad, Hercules, CA) y cuantificamos los píxeles de las bandas con el programa Quantity One (BioRad).

### **Preamplificación y calibración de la qPCR anidada**

El cálculo del número de copias se basa en la masa de pHV101 (3,645 pb) y el peso promedio de un par de desoxinucleótidos (650 Da). Calculamos que 1 ng de pHV101 equivale a  $2.5 \times 10^8$  copias con la fórmula de Staroscik (2004): number of copies = ((amount in ng) \*  $6.022 \times 10^{23}$ ) / ((length in bp) \* 109 \* 650).

Mediante PCR convencional con los oligonucleótidos LCRS/E7AS preamplificamos *E6* -1 por 15 ciclos (desnaturalización a 94°C por 15 seg, *hibridación* a 57°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min) en mezclas de 50 µL con  $2.5 \times 10^6$  copias de pHV101 o 50 ng de DNA de células SiHa, las cuales tuvieron como controles negativos una mezcla blanco (sin DNA) y otra con 50 ng de DNA humano normal.

Las mezclas de qPCR anidada de *E6* -2 preparadas para obtener la familia de curvas tipo contenían 1 µL de diluciones logarítmicas seriadas de la mezcla de calibración preamplificada 15 ciclos con  $2.5 \times 10^6$  copias iniciales de pHV101. Para determinar el número de copias en las muestras problema y controlar la

amplificación preparamos mezclas adicionales de 50µL a las que añadimos 1 µL de las mezclas problema o control preamplificadas.

Las mezclas de qPCR optimizadas para amplificar *E6 -2* en presencia de EvaGreen (Biotium, Hayward, CA) contenían la pareja de oligonucleótidos pU1M/pU2R y fueron incubadas con el mismo programa del termociclador. En estos experimentos preparamos un control negativo adicional con 1 µL de la mezcla preamplificada a partir del DNA de células SiHa con el oligonucleótido forward (pU1M) únicamente.

## RESULTADOS

### Calibración y amplificación de *E6 -2* por qPCR directa

Las familias de curvas tipo necesarias para calibrar el número de copias del ORF *E6* fueron obtenidas con mezclas de qPCR que contenían diluciones logarítmicas seriadas de la mezcla de calibración preamplificada con  $2.5 \times 10^6$  copias iniciales de pHV101 (Figura. 10).

La amplificación de *E6 -2* por qPCR directa en mezclas con la pareja de oligonucleótidos pU1M/pU2R y diluciones logarítmicas seriadas de pHV101 con  $2.5 \times 10^3$ - $2.5 \times 10^6$  copias de la secuencia blanco dio una familia de curvas consistente, con valores de Ct entre 18.7 y 29.0,  $\Delta Ct$  en el rango de 3.1-3.8 y fluorescencia nula para las muestras sin DNA. Así concluimos que la qPCR directa en presencia de EvaGreen permite cuantificar de manera confiable desde 2,500 copias del oncogén *E6* (Figura. 11A).

### Preamplificación y qPCR anidada

Para aumentar la sensibilidad de la qPCR preamplificamos *E6 -1* por 15 ciclos en mezclas de PCR directa a partir de  $2.5 \times 10^6$  copias de pHV101 y luego *E6 -2* por 35 ciclos de qPCR anidada. La mezcla inicial de qPCR contenía 1/50 de volumen de diluciones logarítmicas seriadas de la mezcla preamplificada, equivalentes al rango de  $2.5 \times 10^2$ - $2.1 \times 10^6$  copias iniciales de pHV101.

Los valores de Ct obtenidos en la qPCR anidada (10.80 para  $2.5 \times 10^6$ , 14.35 para  $2.5 \times 10^5$ , 17.71 para  $2.5 \times 10^4$ , 21.62 para  $2.5 \times 10^3$  y 25.02 para  $2.5 \times 10^2$  copias de pHV101) fueron consistentes (rango de  $\Delta Ct$ : 3.3-3.9) y reproducibles ( $R^2 = 1.000$ ) y la mezcla sin DNA empezó a generar fluorescencia detectable a partir del ciclo 27 (Figura. 11B).

La preamplificación disminuyó en 7.78 ciclos el valor promedio de Ct en la qPCR (Tabla 5), lo cual equivale a un aumento de sensibilidad de 215 veces. Al multiplicar este factor por el de la dilución empleada en la reacción anidada resulta que la preamplificación aumenta la sensibilidad de la qPCR 10,750 veces.

### **Copias de *E6* -VPH16 en células SiHa**

Pusimos a prueba la sensibilidad del método de qPCR anidada para determinar la carga de VPH16 mediante la cuantificación de las copias de *E6* en el DNA de células SiHa.

A las mezclas de qPCR de 50  $\mu$ L añadimos 1  $\mu$ L de las diluciones logarítmicas seriadas de las mezclas de pHV101 preamplificadas, con los siguientes controles: 1) DNA de SiHa con la misma pareja de oligonucleótidos (control positivo), 2) DNA de SiHa sólo con el oligo forward (pU1M) (control negativo 1), 3) DNA de leucocitos humanos normales (control negativo 2) y 4) blanco sin DNA (control negativo 3).

En las mezclas sin DNA o con DNA de sangre normal la fluorescencia empezó a detectarse a partir del ciclo 27, pero permaneció nula en las mezclas con DNA de células SiHa que sólo contenían el oligonucleótido pU1M (Figura. 13A).

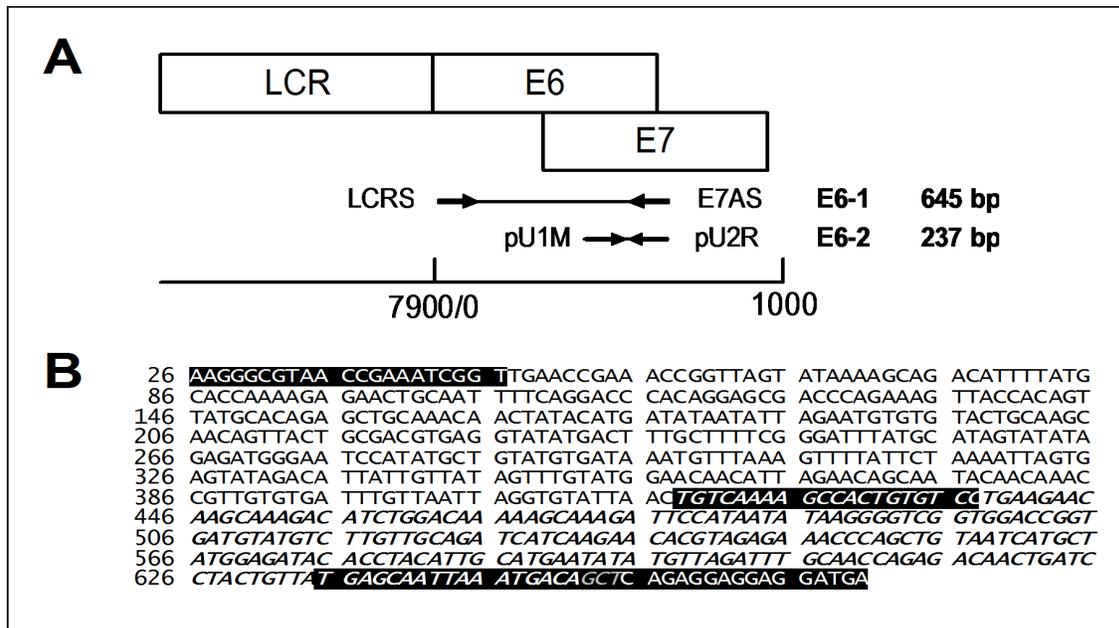
El rango de valores de Ct fue de 25.0 a 10.8 ciclos para mezclas con  $2.5 \times 10^2$  a  $2.5 \times 10^6$  copias iniciales de pHV101 ( $R^2 = 1.000$ ; pendiente = -3.57) y los valores de  $\Delta$ Ct fueron consistentes (rango: 3.3-3.9).

El valor de Ct (19.9) y el número de copias del gen *E6* en mezclas con 50 ng de DNA de células SiHa ( $6.05 \times 10^3$  copias de *E6*) fueron de las magnitudes esperadas (i.e., una copia de *E6* por 7.1 pg de DNA, equivalente a la masa del genoma en una célula humana DIPsloide). La familia de curvas tipo obtenidas por qPCR anidada para *E6* -2 fueron consistentes con el número de copias de pHV101 (Figura. 12).

Los patrones de extinción térmica de la fluorescencia de los productos de qPCR anidada generados con pHV101 y DNA de células SiHa fueron idénticos, con un pico alrededor en 85.5°C, de magnitud proporcional al número inicial de copias de pHV101 y claramente distinto del pico secundario de 78.5°C que apareció en los controles negativos 2 y 3 (Figura. 13).

**Tabla 4. Oligonucleótidos empleados**

Pareja	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Amplicón
1	LCRS (Forward)	AAGGGGAGTAACCGAAAACGGT	E6 -1 (645 pb)
	E7AS (Reverse)	TCATCCTCCTCCTCTGAG	
2	pU1M (Forward)	TGTCAAAAACCGTTGTGTCC	E6 -2 (237 pb)
	pU2R (Reverse)	GAGCTGTCGCTTAATTGCTC	

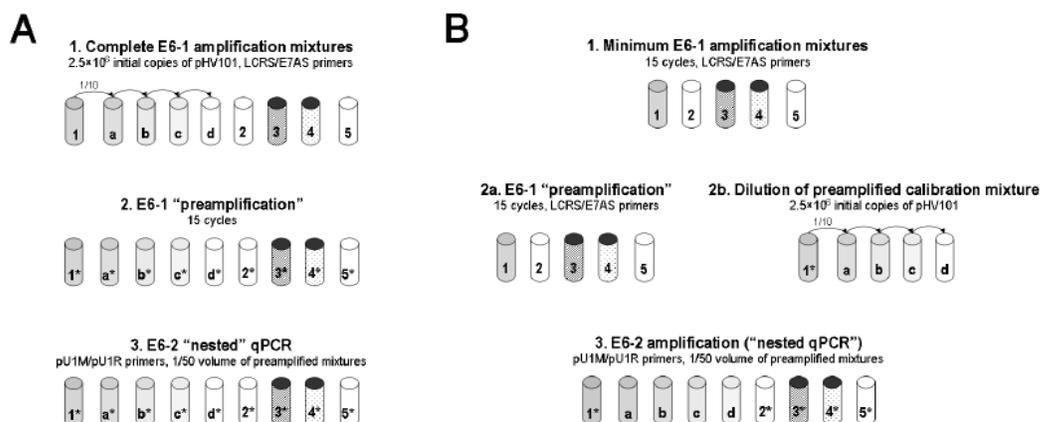


**Figura. 10. Secuencias de los amplicones E6 -1 y E6 -2 generados a partir de pHV101**

(A) Diagrama de la región larga de control (LCR) y los genes E6 y E7 de VPH16, cuyas secuencias se superponen parcialmente. El amplicón E6 -1 (645 pb) es generado por PCR directa con la pareja de oligonucleótidos LCRS/E7AS y el amplicón E6 -2 (237 pb) es generado por PCR anidada con la pareja pU1M/pU2R. La escala de abajo marca las posiciones de LCR, de los genes E6 y E7 y de los amplicones E6 -1 y E6 -2 en el genoma de VPH16. (B) El inserto con el amplicón E6 -1 (E6 -645) clonado abarca los nucleótidos 26-671 (645 pb) del genoma de VPH16 y está delimitado por los oligonucleótidos LCRS y E7AS (letras blancas con fondo negro) en los extremos 5' y 3', respectivamente; contiene 38% de GC y es 99% idéntica al ORF del gen E6 -VPH16 (Hernández-Arteaga y López-Revilla 2008). El fragmento E2-237 (en cursivas) abarca los nucleótidos 419-656 (237 pb) de VPH16 y está delimitado por los oligonucleótidos pU1M y pU2R (letras cursivas blancas con fondo negro), respectivamente; su secuencia contiene 41% de GC y es idéntica al ORF del gen E6 -VPH16. Las tres bases representadas en letras cursivas grises con fondo negro indican la superposición parcial de los oligonucleótidos pU2R y E7AS.

**Tabla 5. Valores de Ct del amplicón E6-2 en mezclas de qPCR directa y anidada con un número variable de copias de pHV101**

Copias de pHV101	Ct		ΔCt
	qPCR directa	qPCR anidada	
$2.5 \times 10^2$	---	25.02	---
$2.5 \times 10^3$	29.00	21.62	7.40
$2.5 \times 10^4$	25.90	17.71	8.10
$2.5 \times 10^5$	22.10	14.35	7.75
$2.5 \times 10^6$	18.70	10.80	7.90



**Figura. 11. Mezclas completas y mínimas para la preamplificación de E6 -1 y la amplificación de E6 -2 mediante qPCR anidada**

(A) Preamplificación de la serie completa. Etapas sucesivas: 1) preparación de la mezcla de preamplificación que contiene E6 -1. 2) "preamplificación" mediante PCR convencional, 3) amplificación de E6 -2 mediante qPCR anidada en mezclas que contienen EvaGreen y un 1/50 de volumen de la mezcla preamplificada E6 -1. Los tubos 1, a, b, c y d son mezclas control positivas preamplificadas con diluciones logarítmicas seriadas de pHV101 con un rango de  $2.5 \times 10^6$ - $2.5 \times 10^2$  copias/tubo. Tubo 2: blanco de preamplificación (sin DNA). Tubo 3: muestra problema preamplificada (50 ng de DNA de SiHa). Tubos 4 y 5: Controles negativos de preamplificación (50 ng de DNA de sangre normal); los asteriscos indican las mezclas preamplificadas. (B) Preamplificación de la serie mínima. Etapas sucesivas: 1) preparación de la mezcla de preamplificación de E6 -1 incluyendo solamente el control positivo (de calibración con el mayor número de copias de pHV101; 2a) Preamplificación de E6 -1 por PCR convencional. 2b) Diluciones logarítmicas seriadas a partir de la mezcla de calibración preamplificada. 3) amplificación de E6 -2 en mezclas de qPCR anidada que contienen EvaGreen, la pareja de *primers* E6 -2, y un 1/50 de volumen de las mezclas preamplificadas con E6 -1. Tubo 1: Mezcla de amplificación control positiva con  $2.5 \times 10^6$  copias de pHV101. Tubo 2: mezcla blanco preamplificada (sin DNA)). Tubo 3: Mezcla problema preamplificada (50 ng de DNA de SiHa). Tubos 4 y 5: Controles negativos preamplificados (50 ng de DNA de sangre normal). Tubos a, b, c, y d: diluciones logarítmicas seriadas a partir de la mezcla control positiva preamplificada usada para preparar las mezclas de qPCR anidada equivalentes a las preamplificadas con  $2.5 \times 10^5$ - $2.5 \times 10^2$  copias de pHV101. Los asteriscos de los tubos numerados indican las mezclas preamplificadas.

## DISCUSIÓN

Nuestro grupo confirmó que la detección de papilomavirus es más sensible a través de la PCR anidada mediante la síntesis sucesiva de los amplicones *E6 -1* y *E6 -2* (López-Revilla et al. 2008) y demostró que la cuantificación del oncogén *E6* de VPH16 mediante qPCR en presencia de EvaGreen es reproducible y específica (Hernández-Arteaga et al. 2007, Hernández-Arteaga y López Revilla 2008).

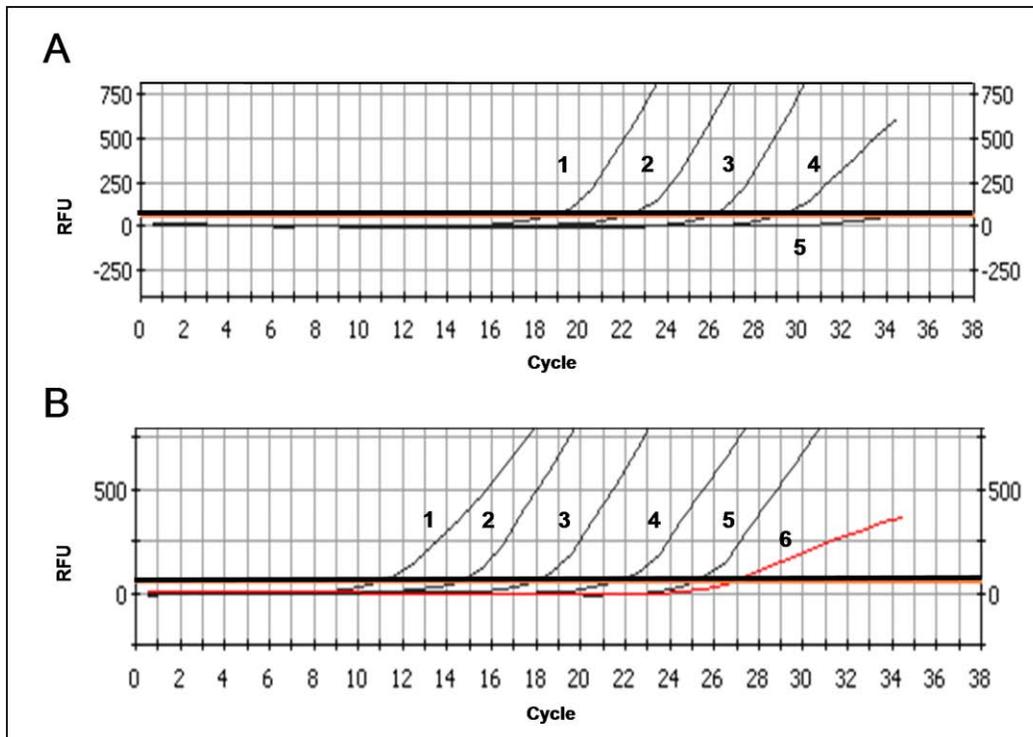
En este trabajo empleamos nuevamente la construcción pHV101, derivada de pGEM con un inserto de 645 pb cuya secuencia contiene el ORF de *E6 - VPH16* (Hernández-Arteaga y López Revilla 2008), como molde para generar sucesivamente los amplicones *E6 -1* y *E6 -2* y así aumentar la sensibilidad del método de qPCR directa que permite cuantificar de manera confiable desde 2,500 copias de la secuencia blanco.

Para la amplificación ultrasensible de *E6 -2* mediante qPCR anidada preamplificamos *E6 -1* por 15 ciclos de PCR convencional y luego *E6 -2* por qPCR en presencia de EvaGreen empleando 1/50 de volumen de diluciones logarítmicas seriadas de la primera mezcla. Las familias de curvas de la qPCR anidada generadas a partir de diluciones logarítmicas de mezclas con pHV101 preamplificadas fueron consistentes y reproducibles y permitieron cuantificar de manera confiable desde 250 copias del oncogén *E6 -VPH16*. La disminución del valor de Ct resultante de la preamplificación muestra que la qPCR anidada es casi 11,000 veces más sensible que la directa y es cercana a la esperada, pues con 15 ciclos de preamplificación se espera que el número de copias aumente  $2^{15} = 32,768$  veces.

La fluorescencia inespecífica empieza a aparecer hasta el ciclo 27 en mezclas sin DNA o con DNA humano sin VPH16 y depende de la interacción de los oligonucleótidos de la pareja 2, pues no ocurre en mezclas con DNA de SiHa preamplificado que contienen únicamente el oligonucleótido forward de la pareja 2 (Figura. 12).

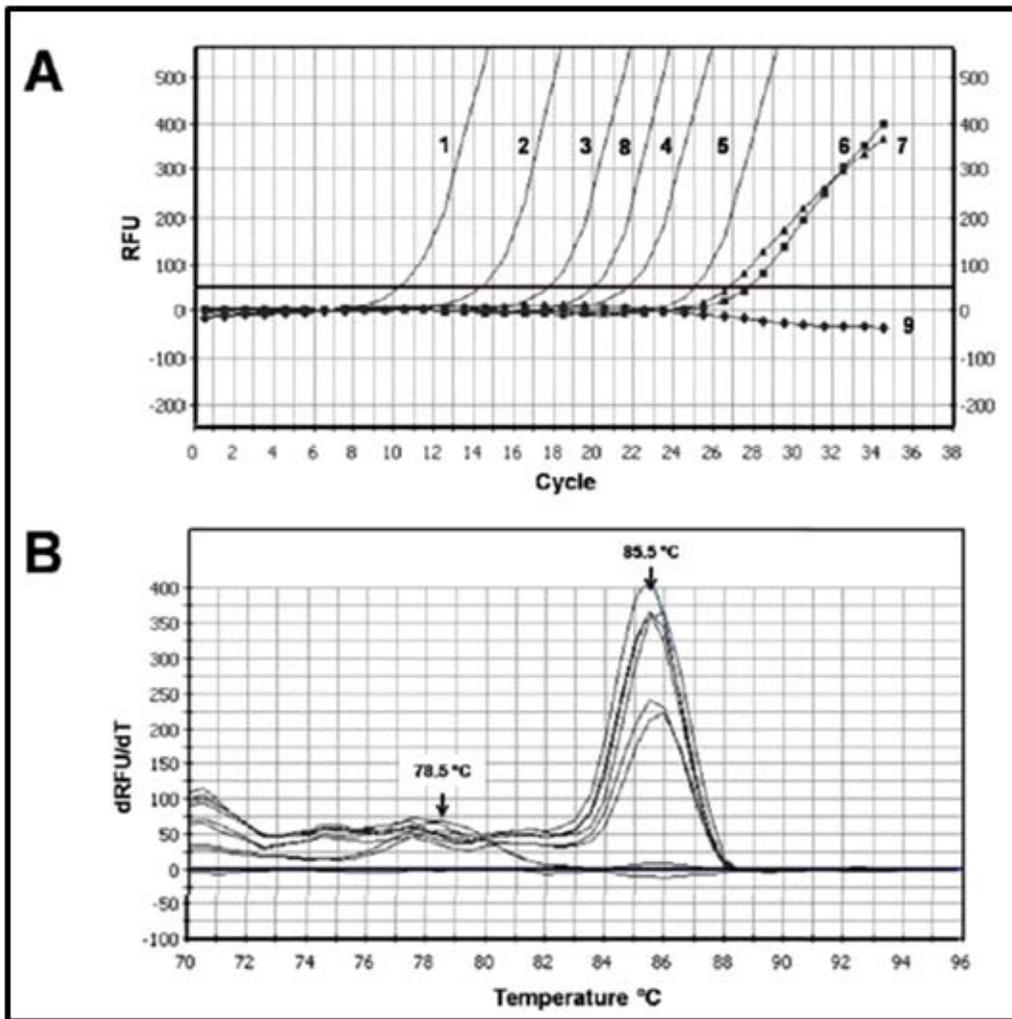
La línea celular SiHa, aislada de un cáncer cervicouterino invasor causado por VPH16, contiene solamente una copia del genoma de VPH16 por célula (Friedl et al. 1970), y permitió poner a prueba la sensibilidad del método de qPCR anidada. Las mezclas con muestras preamplificadas que inicialmente contenían 50 ng de DNA de células SiHa dieron un valor de Ct equivalente a una copia del oncogén *E6* por cada copia de genoma humano diploide (cálculo tomando en cuenta el número total de pb del genoma humano con una masa de 650 Daltons/pb).

La qPCR anidada descrita aquí podría por tanto usarse para aumentar la sensibilidad en la cuantificación de las copias de genes virales y celulares y de los transcritos de interés.



**Figura. 12. Familias de curvas del amplicón *E6 -2* generadas por qPCR directa y anidada**

RFU, unidades de fluorescencia relativa. Umbral (línea roja): 50 RFU. **(A)** Familia de curvas obtenida en mezclas de qPCR directa con diluciones de pHV101 y los oligonucleótidos para *E6 -2*. Curva 1,  $2.5 \times 10^6$  copias. Curva 2,  $2.5 \times 10^5$  copias. Curva 3,  $2.5 \times 10^4$  copias. Curva 4,  $2.5 \times 10^3$  copias. Curva 5, Blanco (sin DNA). **(B)** Familia de curvas obtenida por qPCR anidada con los oligonucleótidos para *E6 -2* a partir de mezclas preamplificadas por 15 ciclos con pHV101 y la pareja *E6 -1*. Curva 1,  $2.5 \times 10^6$  copias. Curva 2,  $2.5 \times 10^5$  copias. Curva 3,  $2.5 \times 10^4$  copias. Curva 4,  $2.5 \times 10^3$  copias. Curva 5,  $2.5 \times 10^2$  copias. Curva 6, Blanco (sin DNA).



**Figura. 13. Desnaturalización térmica del amplicón E6-2 generado a partir de pHV101 y células SiHa**

RFU, unidades de fluorescencia relativa. Umbral (línea continua horizontal): 50 RFU. **(A)** Familia de curvas con un número variable de copias de pHV101: Curva 1,  $2.5 \times 10^6$  copias; Curva 2,  $2.5 \times 10^5$  copias; Curva 3,  $2.5 \times 10^4$  copias; Curva 4,  $2.5 \times 10^3$  copias. ; Curva 5,  $2.5 \times 10^2$  copias Curva 6, Blanco (sin DNA). Curva 7, DNA de sangre humana normal. Curva 8, DNA de células SiHa con la pareja de oligos pU1M/2R. ; Curva 9, DNA de células SiHa solo con oligo pU1M (forward) **(B)** Perfiles de extinción térmica de la fluorescencia de los productos de pHV101 y DNA de células SiHa (pico en 85.5°C), de las mezclas blanco (sin DNA) o con DNA de sangre normal (máximo a 78.5°C) y mezcla con DNA de células SiHa con el oligo pU1M (línea horizontal).

## CAPÍTULO IV. DELECCIONES DE LOS GENES *E2* Y *E6* EN INFECCIONES DEL CÉRVIX POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16

### RESUMEN

El virus del papiloma humano tipo 16 (VPH16), cuyo DNA circular se replica como un plásmido, es la causa más frecuente de cáncer cervicouterino. La integración del genoma viral, aparentemente esencial para la transformación neoplásica, usualmente es precedida de escisión/interrupción del gen viral *E2*. Las lesiones neoplásicas progresan hasta el cáncer invasor (CC) pasando por infección por VPH (IVPH), neoplasia intraepitelial de bajo grado (NIC1) y de alto grado (NIC2 y NIC3). Se ha propuesto que en las lesiones de bajo grado predomina el estado plasmídico (con similar número de genes *E2* y *E6* y cociente  $E2/E6 \sim 1$ ) y en las cancerosas el estado integrado (con pérdida de *E2* y cociente  $E2/E6 \sim 0$ ). En este trabajo evaluamos si las lesiones neoplásicas correlacionan con la carga de *E2* y *E6* y con el cociente  $E2/E6$ , determinados con un método de PCR en tiempo real (qPCR) ultrasensible. Analizamos el DNA de raspados cervicales de 35 mujeres con lesiones neoplásicas de diversos grados e infección por VPH16 y determinamos la carga de *E2* y *E6* en mezclas de qPCR calibradas con construcciones que contienen insertos con el marco de lectura abierto de *E2* (pHV201) o *E6* (pHV101). Encontramos los siguientes rangos de copias de *E2* y *E6* por ng de DNA y cocientes  $E2/E6$  por grupo de lesión: IVPH 16-9,250, 55-1,300, 0.006-24.375; NIC1 16-18,076, 18-816,656, 1.625-625.471; NIC2 30-58,535, 119-538, 0.006-15.460. NIC3 21-808,000, 444-5,200,000, 0.736-24.969. CC: 15-1,152,000, 18-17,200,000, 0.020-181.950. Sólo hubo diferencias significativas entre las cargas de *E6* en IVPH-NIC1 vs. CC ( $P = 0.028$ ) y en IVPH-NIC1 vs. NIC2-3/CC ( $P = 0.045$ ). Los valores del  $\log E2/E6$  se ajustaron a una distribución gaussiana. Concluimos que en las infecciones cervicales por VPH16 las cargas de *E2* y *E6* y los cocientes  $E2/E6$  no correlacionan con el grado de las lesiones neoplásicas y además parecen ocurrir deleciones aleatorias de los genes *E2* y *E6*. Los genomas deletados podrían, como ocurre con otros virus, generar partículas defectuosas interferentes capaces de afectar la replicación viral, la progresión de las lesiones neoplásicas y la inmunidad contra VPH16.

**Palabras clave:** Cáncer cervicouterino, VPH16, PCR en tiempo real, deleciones del genoma viral, partículas defectuosas interferentes.

### INTRODUCCIÓN

El genoma del virus del papiloma humano (VPH), consistente en DNA circular de cadena doble, permanece en estado episomal en el núcleo de las células epiteliales infectadas y se replica en bajos niveles en coordinación con la división celular (Saveria Campo 2006). La producción de viriones depende de que las

células infectadas avancen en su diferenciación para poder completar el ciclo de replicación viral (Flint et al. 2009).

La integración del genoma de VPH a los cromosomas de las células infectadas, aparentemente crucial para la transformación neoplásica (Weinberg 1992), usualmente ocurre por recombinación preferente del gen viral *E2* —que codifica una proteína represora de la transcripción de los oncogenes virales *E6* y *E7*— en regiones frágiles de la cromatina (Choo et al. 1987, Chen et al. 1994). La linearización del genoma viral durante el proceso de integración implica la ruptura del DNA viral en la región *E1/E2* (Tidy et al. 1989, Vernon et al. 1997, Kalantari et al. 1998 y 2001, Choo et al. 1987, Chen et al. 1994) e interrupción del gen *E2* con la consecuente sobreexpresión de los oncogenes virales que mantienen la transformación neoplásica (Zigert et al. 2003). Además de la ruptura, en la mayoría de los casos ocurren deleciones del genoma viral (Choo et al. 1987, Chen et al. 1994); se han documentado pérdidas de 251 pb (el Awady et al. 1987) y 813 pb (Schneider-Maunoury et al. 1987) y la ruptura del gen ha sido asociada a progresión de las lesiones con pronóstico desfavorable (Tonon et al. 2001, Vernon et al. 1997, Kalantari et al. 1998).

Los tres estados físicos posibles del genoma viral durante la infección por VPH16 (episomal, integrado, mixto) son estimados a través de la carga de los genes *E2* y *E6* por PCR en tiempo real (qPCR). En el estado episomal puro las cargas de *E2* y *E6* son similares y el cociente *E2/E6* es cercano a la unidad; el cociente es cercano a cero en el estado integrado puro y tiene valores intermedios en el estado mixto, donde coexisten las formas episomal e integrada (Nagao et al. 2002, Yoshida et al. 2007, De Marco et al. 2007, Cricca et al. 2007). Algunos autores sostienen que el cociente *E2/E6* disminuye con la progresión neoplásica y permite diferenciar lesiones de alto y bajo grado (Cricca et al. 2007, Maelle-Saunier et al. 2008) mientras que otros dicen haber encontrado cocientes tendientes a cero en lesiones de cualquier grado, tanto asociadas a carga viral baja (Berumen et al. 1994) como sin correlación con la carga (Andersson et al. 2005).

Como la evaluación de la carga de los genes *E2* y *E6* podría ayudar a decidir sobre su uso como marcadores de la progresión neoplásica, decidimos analizar la correlación del grado de las lesiones neoplásicas cervicales asociadas a infección única por VPH16 con la carga de los genes *E2* y *E6* y el cociente *E2/E6* con un método de qPCR ultrasensible desarrollado en nuestro laboratorio (Hernández-Arteaga et al. 2007, Valdéz-Morales et al. 2007, Hernández-Arteaga y López-Revilla 2008). Esperábamos encontrar una correlación positiva entre el grado de las lesiones y la carga y que el rango de valores del cociente *E2/E6* estuviese entre cero y uno. Los valores cercanos a cero serían consistentes con el estado de integración puro, los cercanos a uno con el estado episomal puro y los intermedios con el estado mixto. Sin embargo, encontramos que las cargas de *E2*

y *E6* no correlacionaron con el grado de las lesiones y que los valores del cociente  $E2/E6$  no sólo rebasaron el máximo esperado de uno sino que tuvieron una distribución gaussiana. Esta distribución puede ser explicada por la ocurrencia de deleciones aleatorias del genoma de VPH16 en las infecciones naturales del cérvix, tanto del gen *E2* (valores < 1) como del oncogén *E6* (valores > 1), en las cuales podrían generarse partículas virales defectuosas, como ocurre en infecciones por otros virus (Kirkwood y Bangham 1993), que podrían ser capaces de afectar la replicación, la patogenia viral, la inducción de inmunidad y la progresión de las lesiones neoplásicas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Raspados cervicales y lesiones**

Este trabajo incluye el análisis de 35 raspados cervicales de mujeres con lesiones precancerosas y cancerosas, seleccionados por tener infección única por VPH16 diagnosticada en nuestro laboratorio (Martínez-Contreras et al. 2008) o en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Quince muestras (42.9%) provenían del INCAN, 11 (31.4%) de los Servicios de Salud de la ciudad de León, Gto. y nueve (25.7%) de la Clínica de Displasias de los Servicios de Salud de la ciudad de San Luis Potosí.

El diagnóstico histopatológico de las muestras fue de infección por papilomavirus (IVPH, n = 9), neoplasia intraepitelial cervical de grado 1 (NIC1, n = 7), grado 2 (NIC2, n = 7) o grado 3 (NIC3, n = 3) y cáncer cervical (CC, n = 9).

### **DNA de los raspados cervicales**

El DNA fue purificado mediante digestión con proteinasa K, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol (Wizard DNA clean-up system, Promega). La concentración fue determinada mediante fluorometría con PicoGreen, empleando una curva tipo generada con diluciones seriadas de DNA del fago lambda en el rango de 25 a 200 ng/μl de acuerdo con las instrucciones del fabricante del PicoGreen dsDNA Quantitation kit (Molecular Probes, Eugene, OR) utilizando una microplaca FIA negra de 96 pozos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) en el fluorómetro GENios (TECAN, San Jose, CA) acoplado a una computadora con el programa Magellan 4. La calidad de las muestras para los ensayos de PCR fue confirmada por la presencia de DNA genómico de alto peso molecular (> 12 kb) en geles de Tris-acetato-EDTA-agarosa al 1% calibrados con una escalera de DNA de 1000 pares de bases (Invitrogen, Carlsbad, CA, EU).

### **Construcciones empleadas para la calibración**

Las construcciones pHV101 y pEV201 fueron obtenidas mediante inserción de los amplicones *E6* de 645 pb y *E2* de 1031 pb (Figura. 14) generados a partir del plásmido pVPH16 que contiene el genoma completo del prototipo VPH16 Europeo

(Yamada et al. 1995, 1997). Los amplicones fueron generados con las parejas de oligonucleótidos señaladas en la Tabla 6 y ligados al vector pGEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EU) en mezclas de ligación con 3 U/μL de DNA ligasa de T4.

El inserto de pHV101 (Hernández-Arteaga et al. 2007, Hernández-Arteaga y López-Revilla 2008) abarca el marco de lectura abierto (ORF) de *E6* y fue empleado como molde inicial para generar sucesivamente el amplicón *E6*-1 (645 pb) por PCR directa de punto final y *E6*-2 (237 pb) por qPCR anidada (Figura. 14, Figura. 15A).

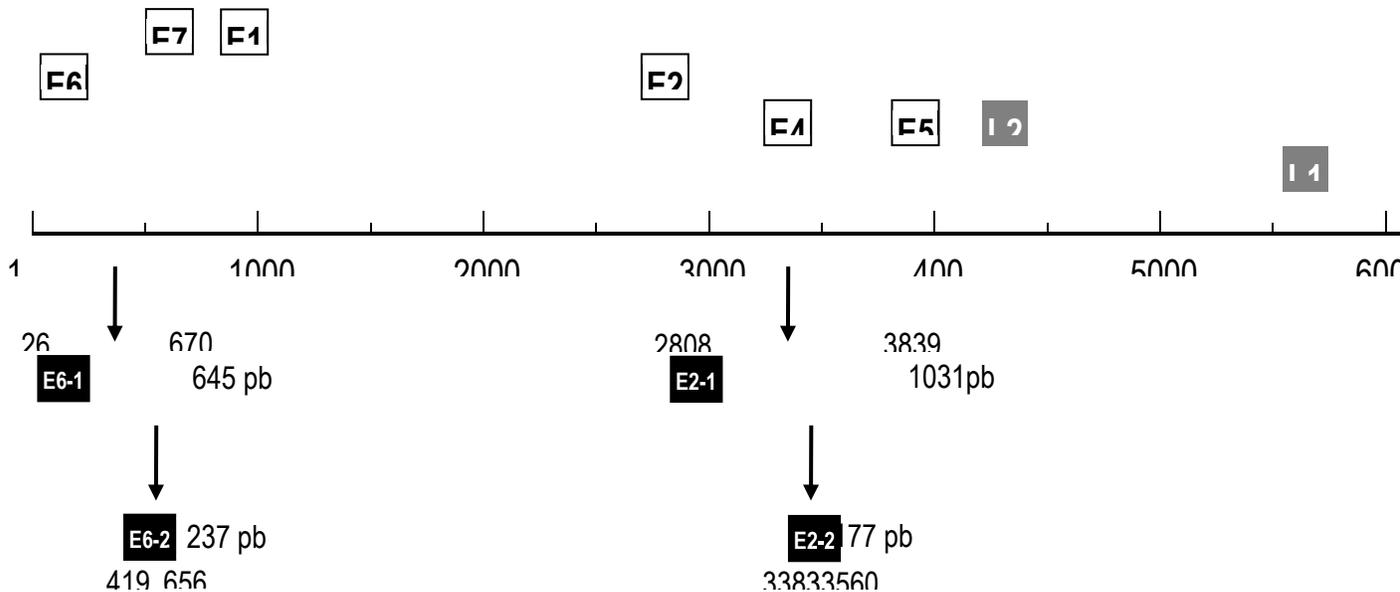
El inserto de pEV201 (Valdéz-Morales et al. 2007) abarca gran parte del ORF de *E2* (nt 28008-3839) y fue empleado como molde inicial para generar el amplicón *E2*-1 (1031 pb) por PCR directa y *E2*-2 (177 pb) por qPCR anidada (Figura. 14, Figura. 15B).

### **PCR directa y qPCR anidada**

En nuestro laboratorio confirmamos previamente que la PCR anidada de punto final es más sensible que la PCR directa para la detección de papilomavirus de alto riesgo (López-Revilla et al. 2008) y luego desarrollamos un método ultrasensible de qPCR anidada en presencia del fluorocromo EvaGreen para cuantificar las secuencias de *E6* de VPH16 (Hernández-Arteaga et al. 2007, Hernández-Arteaga y López-Revilla 2010). Aquí hemos aplicado este método para cuantificar las copias de las secuencias de *E6* y *E2* presentes en los raspados cervicales.

Las mezclas de calibración de la qPCR anidada necesarias para generar las familias de curvas tipo que permitieron cuantificar las copias de las secuencias *E6* y *E2* en las muestras problema contenían 1 μL de diluciones logarítmicas seriadas de mezclas de PCR de punto final que habían sido —preamplificadas” por 15 ciclos en un termociclador Touchgene Gradient (Techne, Burlington, NJ, EU) a partir de  $2.5 \times 10^6$  copias iniciales de pHV101 o  $2.1 \times 10^7$  copias iniciales de pEV201 (Hernández-Arteaga y López-Revilla 2010). Las concentraciones de DNA en las muestras problema fluctuaron entre 10 y 200 ng/μL y la masa total de DNA por mezcla de preamplificación fue de 0.2 a 4 ng.

Los plásmidos y oligonucleótidos empleados en las mezclas de PCR directa y qPCR anidada se presentan en la Tabla 6 y los componentes de las mezclas de PCR directa para preamplificar *E6*-1 y *E2*-1 por PCR directa y amplificar *E6*-2 y *E2*-2 por qPCR anidada en la Tabla 7. El programa del termociclador Touchgene Gradient constó de 15 ciclos con desnaturalización a 95°C por 15 seg, *hibridación* a 57°C por 60 seg y extensión a 72°C por 60 seg. Las mezclas de qPCR anidada para ambos amplicones fueron incubadas en presencia de EvaGreen (Biotium, Hayward, CA) en un termociclador de tiempo real Rotor-Gene 6000 (Corbett, Alemania) con el mismo programa del termociclado pero incluyendo una extensión final a 57°C por 10 min.



**Figura. 14. Amplicones directos y anidados de los genes E6 y E2 de VP16**  
 Sobre la escala de longitud están diagramadas las tres regiones y los ocho genes de VP16 (7904 nt; NCBI accession NC\_001526): LCR, región larga de control (nt 7155-26); E, genes tempranos E6 (nt 83-559), E7 (nt 562-858), E1 (nt 865-2813), E2 (nt 2755-3852), E4 (nt 3332-3619) y E5 (nt 3863-4099); L, genes tardíos L2 (nt 4235-5656 nt) y L1 (nt 5559-7154). Bajo la escala se muestran los amplicones directos y anidados empleados en este trabajo. Amplicones directos: E6-1 de 645 pb (nt 26-671); E2-1, 1031 pb (nt 2808-3839). Amplicones anidados: E6-2, 237 pb (nt 419-656); E2-2 de 177 pb (nt 3383-3560).

**A**

```

26  AAGGGCGTAA CCGAAATCGG TTGAACCGAA ACCGGTTAGT ATAAAGCAG ACATTTTATG
86  CACCAAAAAGA GAACTGCAAT TTTCAGGACC CACAGGAGCG ACCCAGAAAAG TTACCACAGT
146 TATGCACAGA GCTGCAAACA ACTATACATG ATATAATATT AGAATGTGTG TACTGCAAGC
206 AACAGTACT GCGACGTGAG GTATATGACT TTGCTTTTCG GGATTTATGC ATAGTATATA
266 GAGATGGGAA TCATATGCT GTATGTGATA AATGTTTAAA GTTTTATTCT AAAATTAGTG
326 AGTATAGACA TTATTGTTAT AGTTTGTATG GAACAACATT AGAACAGCAA TACAACAAAC
386 CGTTGTGTGA TTTGTTAATT AGGTGTATTA ACTGTCAAAA GCCACTGTGT CTGAAGAAC
446 AAGCAAAGAC ATCTGGACAA AAAGCAAAGA TTCCATAATA TAAGGGGTCG GTGGACCGGT
506 GATGTATGTC TTGTTGCAGA TCATCAAGAA CACGTAGAGA AACCAGCTG TAATCATGCT
566 ATGGAGATAC ACCTACATTG CATGAATATA TGTTAGATT GCAACCAGAG ACAACTGATC
626 CTACTGTTAT GAGCAATTAA ATGACAGCTC AGAGGAGGAG GATGA
  
```

**B**

```

2756 GACTCTTTGC CAACGTTTAA ATGTGTGTCA G
2761 TTAGTACAGAC CTACGTGACC ATATAGACTA T
2821 TTATTACAAG GCCAGAGAAA TGGGATTTAA A
2881 GGCTGTATCA AAGAATAAAC CATTACAAGC A
2941 ATATAACTCA CAATATAGTA ATGAAAAGTG G
3001 TTTAACTGCA CCAACAGGAT GTATAAAAAA A
3061 TGGAGACATA TGCAATACAA TGCAATTATAC A
3121 AGCATCAGTA ACTGTGGTAG AGGGTCAAGT T
3181 AGGAATACGA ACATATTTTG TGCAAGTTTAA A
3241 AGTATGGGAA GTTCATGCCG GTGGTCAAGT A
3301 CAACGAAAGTA TCCTCTCCTG AAATTATTAG G
3361 CCATACCAA GCCGTGCGCT TGGGCACCGA A
3421 ATCAGAGCCA GACACCGGAA ACCCTGCCA C
3481 GGACAGTGCT CCAATCTCA GTGCATTTAA C
3541 TAGTAACACT ACACCCATAG TACATTTTAA A
3601 ATATAGATTT AAAAAAGCATT GTACATTGTA T
3661 AGGACATAAT GTAAAACATA AAAGTCAAT T
3721 ACCTGACCAA TTTTGTCTC AAGTAAAAAT T
3781 TATGTCTATA TGA
3841
  
```

**Figura. 15. Insertos con las secuencias de los amplicones directos y anidados de E2 y E6**

(A) La construcción pHV101 porta el inserto E6-645, a partir del cual son generados los amplicones E6-1 (645 pb) y E6-2 (237 pb). El ORF completo del gen E6 (476 pb) abarca los nucleótidos 83-559 del genoma de VP16; las secuencias de los extremos están incluidas en la región larga de control LCR y el gen E7, respectivamente. La secuencia del inserto corresponde al amplicón E6-1 (645 pb) que abarca los nucleótidos 26-671 del genoma de VP16 y está delimitado por los primers LCRS y E7AS (letras blancas en fondo negro) en los extremos 3' y 5'

respectivamente. El amplicón *E6 -2* (237 pb) (cursivas) abarca los nucleótidos 419-656 del genoma de VPH16 y está delimitado por los *primers* pU1M y pU2R (cursivas blancas en fondo negro) y contiene 41% de GC. Las tres letras cursivas grises en fondo negro corresponden al traslape de los *primers* pU2R y E7AS. (**B**) La construcción pEV201 porta el inserto *E2-1031*, a partir del cual son generados los amplicones *E2-1* (1031 pb) y *E2-2* (237 pb). El ORF completo del gen *E2* (1097 pb) abarca los nucleótidos 2755-3852 del genoma de VPH16. La secuencia del inserto abarca los nucleótidos 2808-3839 del genoma de VPH16 (66 pb menos que el ORF completo) y está delimitado por los *primers* *E2-1F/1R* (letras blancas en fondo negro) en los extremos 3' y 5' respectivamente. El fragmento correspondiente al amplicón *E2-2* (en cursivas) abarca los nucleótidos 3384-3562 (177 pb) del genoma de VPH16 y está delimitado por los *primers* *E2-2F/2R* (cursivas blancas en fondo negro).

**Tabla 6. Plásmidos, oligonucleótidos y amplicones**

PCR	Gen	Plásmido	Oligonucleótidos		Amplicones		
			Nombre	Secuencia (5'→3')	Nombre	Posición <sup>a</sup>	Tamaño (pb)
Directa (punto final)	E6	pHV101	1F	AAGGGCGTAACCGAAATCGGT	E6 -1	26-671	645
			1R	GCTCAGAGGAGGAGGATGA			
	E2	pEV201	1F	ATGAAAATGATAGTACAGAC	E2-1	2808-3839	1031
			1R	CCAGTAGACACTGTAAATAG			
Anidada (tiempo real)	E6	pHV101	2F	TGTCAAAGCCACTGTGTCC	E6 -2	419-656	237
			2R	TGAGCAATTAATGACAGCT			
	E2	pEV201	2F	TTATTAGGCAGCACTTGGCC	E2-2	3383-3560	177
			2R	GTGAGGATTGGAGCACTGTCC			

<sup>a</sup> Nucleótidos que abarca el amplicón en el genoma de VPH16.

**Tabla 7. Mezclas para la PCR (directa) y la qPCR (anidada)**

Componente	PCR		qPCR <sup>a</sup>
	E6 -1	E2-1	
Agua	40.7 µL	39.5 µL	38.2 µL
Buffer PCR 10× <sup>b</sup>	5 µL	5 µL	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2 µL	1 µL	2 µL
dNTPs (10 mM c/u)	0.25 µL	0.5 µL	0.25 µL
Mezcla de oligos (10 µM c/u)	0.75 µL	2.5 µL	0.75 µL
Taq DNA polimerasa (5U/ml)	0.3 µL	0.5 µL	0.3 µL
EvaGreen 20×	---	---	2.5 µL
DNA molde (10-100 ng/µL)	1 µL	1 µL	---
Mezcla preamplificada	---	---	1 µL

<sup>a</sup> Componentes idénticos para E6 y E2.

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

## **Análisis estadístico**

Realizamos los análisis estadísticos con el programa SPSS 18 para Windows (IBM Corporation, Somers, NY). La media, mediana, rango, rango intercuartil, desviación estándar, intervalo de confianza al 95% y las frecuencias fueron utilizadas para el análisis estadístico descriptivo.

La prueba de Mann-Whitney (M-W), la prueba de regresión logística multinominal multivariada (RLMM) y los valores de P fueron usados para comparar los marcadores virales (carga de *E6* y de *E2* y cociente *E2/E6*) en los distintos grupos de lesiones. Los estimados no paramétricos, las curvas ROC y la distribución de los valores del log (*E2/E6*) también fueron obtenidos y analizados con el programa SPSS 18. Consideramos significativos los valores de  $P \leq 0.05$ .

## **RESULTADOS**

### **Cuantificación de los genes *E6* y *E2* de VPH16**

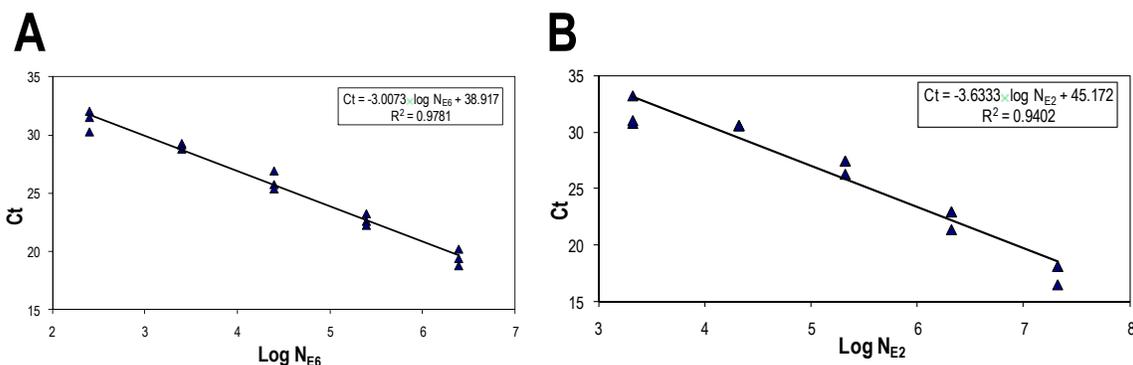
La calibración para cuantificar el número de copias del gen *E6* mediante qPCR anidada fue realizada en experimentos independientes empleando diluciones logarítmicas seriadas de la construcción pHV101 para obtener desde 250 hasta 2,500,000 copias iniciales de *E6* por mezcla. La calibración para cuantificar las secuencias del gen *E2* mediante qPCR anidada también fue realizada en experimentos independientes empleando diluciones logarítmicas seriadas de la construcción pEV201 para obtener desde 2,100 hasta 21,000,000 copias iniciales de *E2* por mezcla.

La Tabla 8 contiene los valores absolutos, promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación del ciclo umbral (Ct) en función del número de copias iniciales de la secuencia blanco, así como los promedios de  $\Delta Ct$ , eficiencia de polimerización, pendiente de la ecuación (Ct vs. log del número de copias) y el coeficiente de correlación con la recta.

La dispersión de los datos de carga de *E6* fue aceptable (Figura. 16A) pues el coeficiente de correlación en tres experimentos de calibración fue muy cercano a la unidad ( $R^2 = 0.9781$ ). La dispersión de los datos de carga de *E2* también fue aceptable (Figura. 16B), ya que el coeficiente de correlación en tres experimentos de calibración fue cercano a la unidad ( $R^2 = 0.9402$ ) aunque algo menor que para las secuencias de *E6*.

**Tabla 8. Valores de Ct y parámetros en las mezclas de calibración de qPCR para cuantificar las copias de los genes E2 y E6**

Secuencia blanco		Valores de Ct						
<b>E2</b> (pEV201)	<b>Copias</b>	<b>Mezcla 1</b>	<b>Mezcla 2</b>	<b>Mezcla 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>	<b>CV</b>	
	21,000,000	18.100	16.470	18.100	17.557	.941	5.0%	
	2,100,000	22.920	21.350	22.920	22.397	.906	4.0%	
	210,000	27.410	26.250	27.410	27.023	.670	2.0%	
	21,000	30.540	30.570	30.540	30.550	.670	2.0%	
	2,100	33.190	30.750	31.000	31.647	.342	4.0%	
	<b>Parámetros</b>							
	$\Delta Ct_{avg}$	3.450	3.570	3.220	3.413	.178	5.0%	
	Eficiencia	1.000	0.840	1.000	0.947	.092	9.0%	
	Pendiente	-3.780	-3.770	-3.340	-3.630	.251	6.0%	
R <sup>2</sup>	0.982	0.940	0.934	0.952	.026	2.0%		
<b>E6</b> (pHV101)	<b>Copias</b>	<b>Mezcla 1</b>	<b>Mezcla 2</b>	<b>Mezcla 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>	<b>CV</b>	
	2,500,000	19.370	20.180	18.750	19.433	.717	3.6%	
	250,000	22.570	23.230	22.230	22.677	.508	2.2%	
	25,000	25.740	26.910	25.360	26.003	.808	3.1%	
	2,500	29.150	29.270	28.790	29.070	.250	0.9%	
	250	31.510	32.040	30.270	31.273	.908	2.9%	
	<b>Parámetros</b>							
	$\Delta Ct_{avg}$	3.050	2.965	2.880	2.965	.085	2.8%	
	Eficiencia	1.100	1.160	1.000	1.087	.081	7.4%	
	Pendiente	-3.086	-2.970	-3.610	-3.222	.341	10.5%	
R <sup>2</sup>	0.996	0.994	0.993	0.994	.002	0.1%		



**Figura. 16. Calibración de la qPCR anidada para E6 y E2**

(A) Regresión lineal de Ct vs. logaritmo del número de copias de pHV101 ( $\log_{10} NE_6$ ) en tres calibraciones independientes con 250 a 2,500,000 copias de E6. Parámetros de la ecuación de la recta para esta familia de curvas tipo: pendiente = -3.0073, eficiencia promedio = 1.087,  $R^2 = 0.9781$ . (B) Regresión lineal de Ct vs. logaritmo del número de copias de pEV201 ( $\log_{10} NE_2$ ) en tres calibraciones independientes con 2,100 a 21,000,000 de copias. Parámetros de la ecuación de la recta para esta familia de curvas tipo: pendiente = -3.6333, eficiencia promedio = 0.947,  $R^2 = 0.9402$ .

## **Carga de E6 y E2 y cocientes E2/E6 según el grado de lesión**

### ***Lesiones de bajo grado (IVPH y NIC1)***

En las nueve muestras con IVPH el rango de valores para las secuencias de E6 fue 16-9,250 copias/ng (promedio = 1,726 copias/ng, CV = 175%) mientras que para las secuencias de E2 fue 55-1,300 copias/ng (promedio = 426 copias/ng, CV = 107%). El rango de los cocientes E2/E6 fue 0.006-24.375 (promedio = 5.469, CV = 144%). En la muestra con el cociente más bajo (0.006) la carga de E6 fue la más alta (9,250 copias/ng) y la de E2 la más baja (55 copias/ng) (Tabla 9, Figura. 17).

En las siete muestras con lesiones NIC1 el rango de valores para las secuencias de E6 fue 16-18,076 copias/ng, con un promedio de 2,706 copias/ng. El rango de E2 fue 18-816,656 copias/ng con un promedio de 180,469 copias/ng. En este grupo (20% del total) el rango de los cocientes E2/E6 fue 1.625-625.471 con un promedio de 118.265. Todas estas muestras tuvieron más copias de E2 que de E6 ( $E2/E6 > 1$ ) (Tabla 9, Figura. 17).

### ***Lesiones de alto grado ( $\geq$ NIC2)***

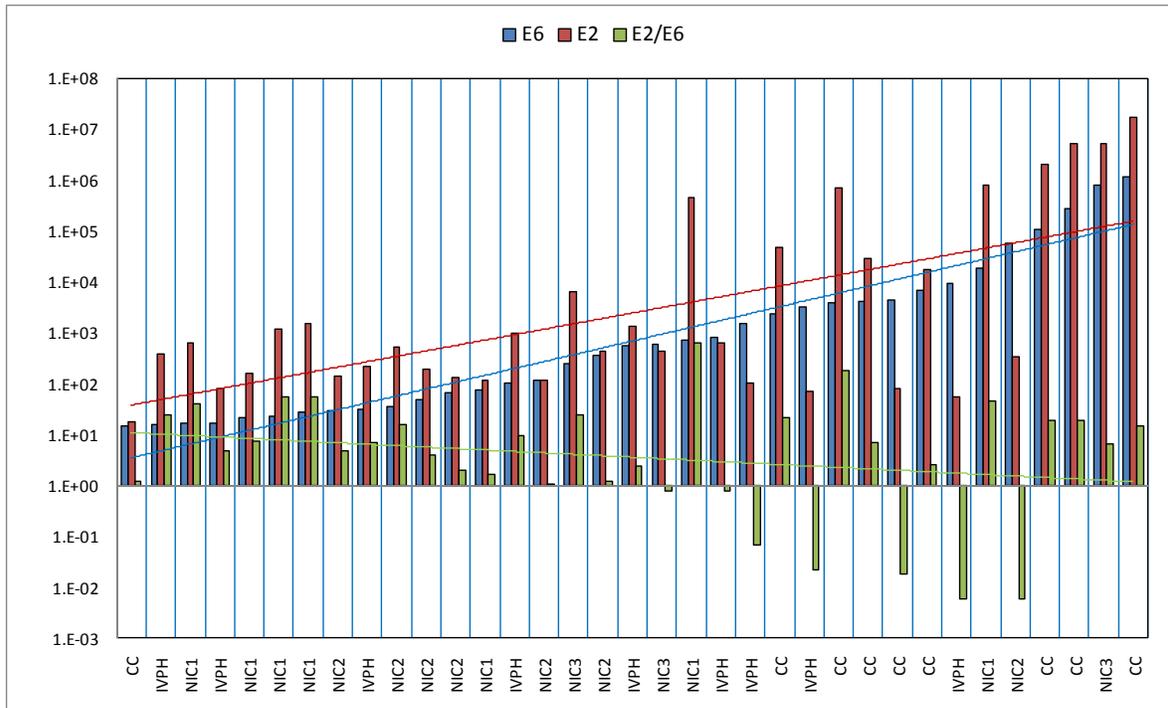
En las siete muestras con lesiones NIC2 el rango de valores para las secuencias de E6 fue 30-58,535 copias/ng (promedio = 8,455 copias/ng, CV = 261%) en tanto que para las secuencias de E2 fue de 119-538 copias/ng (promedio = 269 copias/ng, CV = 62%). El rango de cocientes E2/E6 fue 0.006-15.460 (promedio = 4.000, CV = 131%). La muestra con el cociente más bajo (0.006) tuvo la carga de E6 más alta (58,535 copias/ng) y mayor que la carga de E2 (339 copias/ng) (Tabla 9, Figura. 17).

En las tres muestras con lesiones NIC3 el rango de valores para las secuencias de E6 fue 251-808,000 copias/ng (promedio = 269,611 copias/ng, CV = 173%) en tanto que para las secuencias de E2 fue 444-5,200,000 copias/ng (promedio = 1,735,566 copias/ng, CV = 173%). El rango de cocientes E2/E6 fue 0.736-24.969 (promedio = 10.720, CV = 118%). La muestra con el cociente más bajo (0.736) fue la única con carga de E6 más alta (582 copias/ng) que de E2 (444 copias/ng) (Tabla 9, Figura. 17).

En las 26 lesiones precancerosas (i.e., NIC1-NIC3,  $\leq$  NIC3) el rango de valores para las secuencias de E6 fue 16-808,000 copias/ng (promedio = 34,711 copias/ng, CV = 455%) en tanto que para las secuencias de E2 fue 55-5,200,000 copias/ng (promedio = 249,065 copias/ng, CV = 336%). El rango de cocientes E2/E6 fue 0.006-625.471 (promedio = 36.058, CV = 336%) (Tabla 9, Figura. 17).

**Tabla 9. Copias de E6 y E2 y cocientes E2/E6 en las muestras de cada grupo de lesión**

IVPH (n = 9)				NIC1 (n = 7)			NIC2 (n = 7)			NIC3 (n = 3)			CC (n = 9)		
E6	E2	E2/E6		E6	E2	E2/E6	E6	E2	E2/E6	E6	E2	E2/E6	E6	E2	E2/E6
9,250	55	0.006		73	118	1.6	58,535	339	0.006	582	444	0.763	4,440	80	0.018
3,250	72	0.022		21	154	7.4	116	119	1.0	808,000	5,200,000	6.4	15	18	1.2
1,510	100	0.066		16	645	39.8	355	428	1.2	251	6,255	25.0	7,000	17,500	2.5
812	640	0.788		18,076	816,656	45.2	66	134	2.0				4,120	28,000	6.8
547	1,300	2.4		22	1,210	54.0	48	188	3.9				1,152,000	17,200,000	14.9
17	80	4.8		28	1,530	54.4	30	138	4.7				275,277	5,218,526	19.0
31	215	7.0		708	442,971	625.5	35	538	15.5				109,400	2,080,000	19.0
101	980	9.7											2,300	49,000	21.3
16	390	24.4											3,990	726,000	182.0
<b>Mínimo</b>	16	55	0.006	16	118	1.600	30	119	0.006	251	444	0.763	15	18	0.018
<b>Máximo</b>	9,250	1,300	24.400	18,076	816,656	625.500	58,535	538	15.500	808,000	5,200,000	25.000	1,152,000	17,200,000	182.000
<b>Promedio</b>	1,726	426	5.469	2,706	180,469	118.266	8,455	269	4.038	269,611	1,735,566	10.723	173,171	2,813,236	29.626
<b>DE</b>	3,012	454	7.893	6,782	325,364	224.670	22,084	167	5.297	466,259	3,000,289	12.660	378,329	5,664,597	57.725
<b>CV (%)</b>	175%	107%	144%	251%	180%	190%	261%	62%	131%	173%	173%	118%	218%	201%	195%



**Figura. 17. Copias de *E6* y *E2* y cocientes *E2/E6* en las 35 muestras de raspados cervicales**

Las barras indican el número de copias del gen *E6* (azul) y *E2* (rojo) por ng de DNA en cada mezcla de PCR directa, así como el cociente *E2/E6* (verde) en las muestras de raspados cervicales con infección por VPH16. Los datos de la gráfica fueron alineados en orden creciente de valores de *E6*. Las líneas azul, roja y verde muestran la tendencia exponencial de los valores de *E2*, *E6* y *E2/E6*, respectivamente. Rangos del número de copias por ng de DNA: *E2*,  $15-1.15 \times 10^6$ ; *E6*,  $18-17.2 \times 10^6$ . Rango del cociente *E2/E6*:  $6 \times 10^{-3}$ -625.5.

En las nueve lesiones cancerosas el rango de valores para las secuencias de *E6* fue 15-1,152,000 copias/ng (promedio = 173,171 copias/ng, CV = 218%) en tanto que para las secuencias de *E2* fue 18-17,200,000 copias/ng (promedio = 2,813,236 copias/ng, CV = 201%). El rango de cocientes *E2/E6* fue 0.018-181.950 (promedio = 29.630, CV = 195%) (Tabla 9, Figura. 17).

En las doce lesiones NIC3 el rango de valores para las secuencias de *E6* fue 15-1,152,000 copias/ng (promedio = 197,281 copias/ng, CV = 193%) en tanto que para las secuencias de *E2* fue 18-17,200,000 copias/ng (promedio = 2,543,819 copias/ng, CV = 197%). El rango de cocientes *E2/E6* fue 0.018-181.955 copias/ng (promedio de 24.9 copias/ng, CV = 201%) (Tabla 9, Figura. 17).

Los valores extremos de los cocientes *E2/E6* correspondieron a 14 muestras (cinco < 0.07 y nueve > 20): cuatro IVPH, cinco NIC1, una NIC2, una NIC3 y tres cancerosas (Tabla 10).

### **Correlación de las pruebas moleculares con el grado de lesión**

Para determinar la correlación de las pruebas moleculares con el grado de lesión calculamos los estadísticos descriptivos de las variables con un intervalo de confianza del 95%. Con la prueba de Mann-Whitney comparamos pares de grupos de lesiones y con la regresión logística binaria correlacionamos las variables con el grado de lesión.

La Tabla 11 muestra la estadística descriptiva del logaritmo del número de copias de *E2* y de *E6* y del cociente *E2/E6* en relación con el grado de lesión. Al analizar los rangos intercuartiles todas las variables cuantitativas se traslaparon a lo largo de las diferentes categorías de lesión, excepto para log *E2* y log *E6* de la pareja IVPH-NIC1 vs. CC (P = 0.019).

En cuanto a las medianas, sólo las del log *E6* aumentaron significativamente al aumentar el grado de lesión. En contraste con la interpretación de Cricca et al. (2007) de que al progresar las lesiones disminuye el cociente *E2/E6* por incremento en la integración del genoma viral, nosotros no observamos disminución del cociente al aumentar el grado de lesión. Entre las medianas sólo fueron estadísticamente significativas las diferencias en los valores del log *E6* de los pares de grupos IVPH-NIC1 vs. NIC2-3/CC (P = 0.047) y IVPH-NIC1 vs. CC (P = 0.019).

Al analizar la relación de cada variable con el grado de lesión encontramos que los valores del log *E6* tuvieron una correlación positiva significativa con los pares de grupos de lesiones IVPH-NIC1 vs. NIC2-3/CC (60.0% de casos clasificados correctamente como IVPH-NIC1 y 66.7% clasificados correctamente como CC) y IVPH-NIC1 vs. CC (86.7% de casos clasificados correctamente como IVPH-NIC1 y 50% clasificados correctamente como CC) (Tabla 12).

**Tabla 10. Cocientes E2/E6 con valores extremos**

Muestra		Copias por ng		Cociente E2/E6
ID	Lesión	E2	E6	
14	NIC2	339	58,535	0.006
482	IVPH	55	9,250	0.006
E	CC	80	4,440	0.018
IV 258	IVPH	72	3,250	0.022
438	IVPH	100	1,510	0.066
63	CC	49,000	2,300	21.304
6C	IVPH	390	16	24.375
10C	NIC3	6,255	251	24.969
12C	NIC1	645	16	39.790
8C	NIC1	816,656	18,076	45.179
7C	NIC1	1,210	22	54.018
14C	NIC1	1,530	28	54.352
93	CC	726,000	3,990	181.950
9C	NIC1	442,971	708	625.471

**Tabla 11. Estadísticos de los valores de log E6 , log E2 y E2/E6 por grupos de lesiones**

Lesiones	Log E6 <sup>a</sup>				Log E2 <sup>b</sup>				E2/E6 <sup>b</sup>			
	Media	Mediana	Intercuartil	Rango	Media	Mediana	Intercuartil	Rango	Media	Mediana	Intercuartil	Rango
IVPH-NIC1 (n = 15)	2.24	1.86	1.32-3.18	3.05	1.71	2.60	2.00-2.99	4.17	16.80	7.05	0.79-39.79	54.30
NIC2-3 (n = 9)	2.70	2.32	1.65-3.27	4.43	2.96	2.58	2.14-2.99	4.64	6.00	2.02	0.96-8.69	25.00
NIC2-3, CC (n = 17)	3.29	3.10	1.79-4.84	4.89	3.69	2.69	2.14-5.09	5.98	18.00	3.88	1.15-16.33	182.00
CC (n = 8)	4.02	3.75	3.43-5.34	4.89	4.60	4.57	2.49-6.62	5.98	31.50	12.9	1.52-18.99	182.00

<sup>a</sup> Sólo fueron estadísticamente significativas las diferencias en los pares NIC1 vs. NIC2-3/CC (P = 0.047) y NIC1 vs. CC (P = 0.019).

<sup>b</sup> Diferencias no significativas.

**Tabla 12. Regresión logística binaria de los valores de log E6 , log E2 y log (E2/E6 ) entre pares de grupos de lesiones**

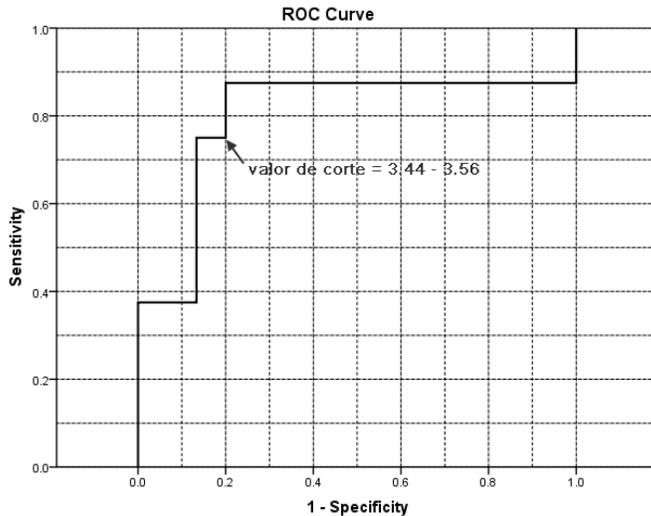
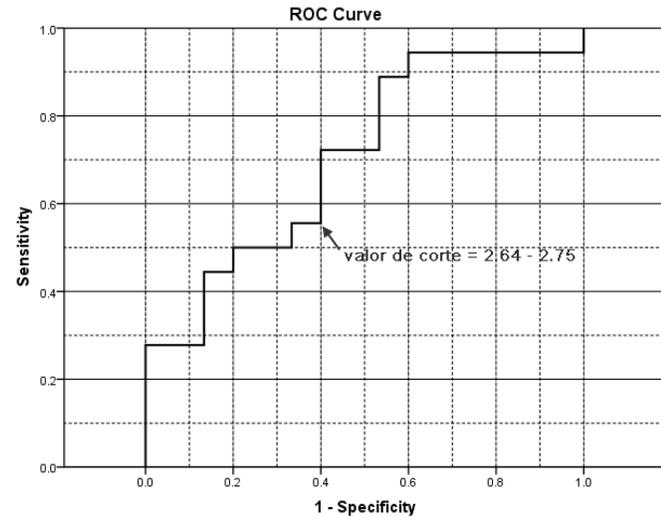
Grupos de lesiones	Log E6		Log E2		Log (E2/E6)	
	P	Clasificación correcta	P	Clasificación correcta	P	Clasificación correcta
IVPH-NIC1 vs. NIC2-3	0.364	IVPH-NIC1 13/15 (86.7%) NIC2-3 2/10 (20.0%)	0.580	IVPH-NIC1 14/15 (93.3%) NIC2-3 1/10 (10.0%)	0.145	NIC 10/15 (66.7%) NIC2-3 4/10 (40.0%)
IVPH-NIC1 vs. NIC2-3/CC	0.032	IVPH-NIC1 9/15 (60.0%) NIC2-3/CC 12/18 (66.7%)	0.066	IVPH-NIC1 8/15 (53.3%) NIC2-3/CC 9/18 (50.0%)	0.079	IVPH-NIC1 5/15 (33.3%) NIC2-3/CC 14/18 (77.8%)
IVPH-NIC1 vs. CC	0.003	IVPH-NIC1 13/15 (86.7%) CC 4/8 (50.0%)	.010	IVPH-NIC1 14/15 (93.3%) CC 5/8 (62.5%)	0.125	IVPH-NIC1 15/15 (100.0%) CC 0/8 (0.0%)

Los valores del log  $E2$  correlacionaron significativamente con la pareja de grupos IVPH-NIC1 vs. CC (93.3% de casos clasificados correctamente como IVPH-NIC1 y 62.5% clasificados correctamente como CC). El cociente  $E2/E6$  no correlacionó significativamente con ninguna categoría de lesión. Las diferencias en las medianas tampoco correlacionaron con el grado de lesión, por lo cual el cociente  $E2/E6$  no sirve para predecir el grado de lesión. Aunque sí hubo correlación significativa de los valores del log  $E2$  en la pareja de grupos IVPH-NIC1 vs. NIC2-3/CC, la pequeña pero no significativa diferencia entre sus medianas tampoco permite diferenciar entre esos grados de lesión. Las diferencias significativas entre las medianas de log  $E6$  en los pares IVPH-NIC1 vs. NIC2-3/CC y IVPH-NIC1 vs. CC así como sus correlaciones sugieren que esta variable sí sería adecuada para discriminar entre esas lesiones.

### **Eficiencia diagnóstica de las pruebas moleculares**

Para determinar si hay valores de corte del log  $E6$  que permitan diferenciar parejas de grupos con diferente grado de lesión generamos las curvas ROC correspondientes maximizando la razón de probabilidad [(*likelihood ratio*, LR = probabilidad de verdaderos positivos + probabilidad de verdaderos negativos)/(probabilidad de falsos positivos + probabilidad de falsos negativos)].

Las curvas ROC (Figura. 18) muestran la sensibilidad, especificidad y valor de corte del log  $E6$  para diferenciar los pares IVPH-NIC1 vs. NIC2-3/CC y IVPH-NIC1 vs. CC. Nótese que los valores de corte están claramente diferenciados en cada pareja de grupos de lesiones comparadas (2.03-2.75 para IVPH-NIC1 vs. NIC2-3/CC y 3.27-3.56 para IVPH-NIC1 vs. CC). Sin embargo, el área bajo la curva de la pareja IVPH-NIC1 vs. CC fue mayor que la de la pareja IVPH-NIC1 vs. NIC2-3/CC (0.8 contra 0.7) y también fueron mayores los valores de sensibilidad y especificidad (75-87.5% y 80-86.7% contra 55.6-72.2% y 60-66.7%). En las muestras analizadas aquí el valor del log  $E6$  es significativamente útil para diferenciar IVPH-NIC1 de NIC2-3/CC e IVPH-NIC1 de CC con puntos de corte en los rangos 2.03-2.75 (107-562 copias  $E6$  /ng) y 3.27-3.56 (1,862-3,631 copias de  $E6$  /ng), respectivamente.

**A****B**

**Figura. 18. Eficiencia diagnóstica de los valores del log *E6* para discriminar IVPH-NIC1 de NIC2-3/CC e IVPH-NIC1 de CC**

(A) La línea de carga de log *E6*, con valores de corte de 3.44-3.56 (equivalente a 2,754-3,631 copias de *E6* por ng de DNA) permite discriminar las lesiones IVPH-NIC1 de las de alto grado (NIC2-3/CC). (B) La línea carga de *E6* con valores de corte de 2.64-2.75 (equivalente a 437-562 copias de *E6* por ng de DNA) permite discriminar las lesiones IVPH-NIC1 de las de CC.

**DISCUSIÓN**

Nuestro grupo demostró previamente que la cuantificación de secuencias del gen *E6* de VPH16 mediante qPCR en presencia de EvaGreen es reproducible y específica (Hernández-Arteaga y López-Revilla, 2008) y puede ser utilizada para determinar la carga viral de VPH16 en raspados cervicales (Hernández-Arteaga y López-Revilla, 2010). En este trabajo demostramos que la qPCR anidada con EvaGreen también es confiable para cuantificar las secuencias de *E2* y *E6* de VPH16, dada la linealidad y reproducibilidad de las curvas tipo de los plásmidos con las secuencias blanco de *E6* y de *E2*. Con el método de qPCR anidada para los genes *E2* y *E6* en este trabajo analizamos 35 raspados cervicales de mujeres de tres ciudades mexicanas con infección única por VPH16 y displasias de bajo y alto grado o cáncer.

Cricca et al. (2007) determinaron que la carga de *E6* por 300 ng de DNA es menor en NIC1 ( $2.83 \times 10^5$ ) que en NIC2-3 ( $7.27 \times 10^7$ ), pero mayor en NIC1 que en CC ( $6.10 \times 10^3$ ). Los valores inferidos por nosotros para la carga de *E2* resultaron menores en NIC1 que en NIC2-3 pero mayores en NIC1 que en CC, mientras que

los valores del cociente disminuyeron desde NIC1 hasta CC (0.91, 0.69 y 0.02). Maelle-Saunier et al. (2008) determinaron cargas de  $E6$  por mil células y encontraron que los valores promedio de  $E2$  y  $E6$  aumentan con el grado de lesión a medida que disminuye el cociente  $E2/E6$ , pero sin diferencias significativas entre las cargas de NIC1 y CC. Yoshida et al. (2007) observaron que los valores de  $E6$  por célula disminuyen con el grado de la lesión, pero no compararon lesiones de diferente grado ni especificaron los valores del cociente  $E2/E6$ . Éstos son mencionados por ellos solamente para inferir la integración del genoma viral cuando afirman que el valor de corte de 0.8 discrimina entre las formas episomal e integrada de genoma viral. También mencionan haber encontrado “formas inusuales” del virus cuando los valores del cocientes  $E2/E6$  fueron  $> 1.5$ .

La Tabla 13 resume nuestros resultados normalizados con los de otros autores que han utilizado SYBRGreen (Cricca et al. 2007, Yoshida et al. 2007) o sondas TaqMan (Maelle-Saunier et al. 2008) para cuantificar las secuencias de VPH16 y han calculado las cargas en unidades diferentes.

Con las pruebas M-W y RLMM comparamos los valores de las cargas de  $E2$  y  $E6$  y el cociente  $E2/E6$  del grupo de lesiones NIC1 con los grupos de lesiones precancerosas de alto grado (NIC2-3), de alto grado y cancerosas (NIC2-3/CC) y cancerosas (CC). Encontramos diferencias significativas sólo entre las cargas de  $E6$  de NIC1 y CC con la prueba M-W ( $P_{E6} = 0.028$ ) y de NIC1 y NIC2-3/CC con la prueba RLMM ( $P_{E6} = 0.045$ ).

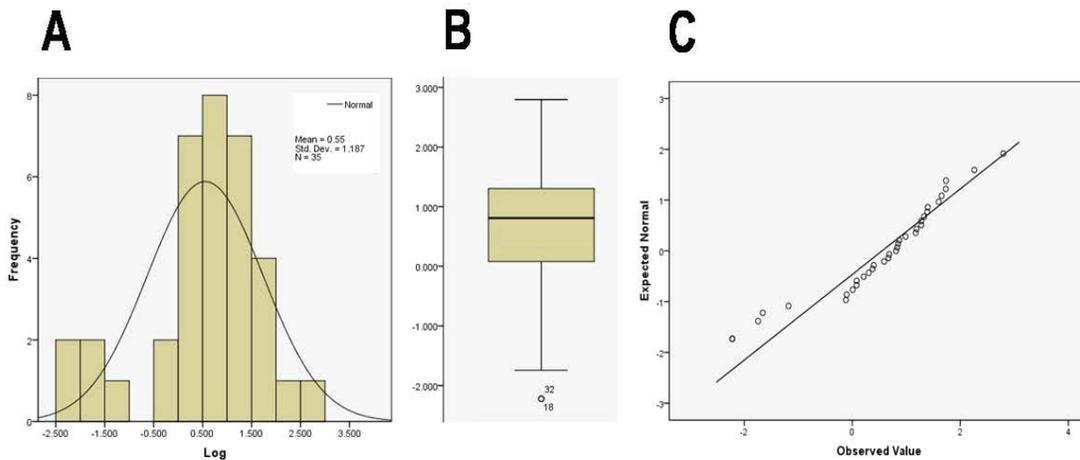
Cricca et al. (2007) concluyeron que la carga viral es significativamente mayor en lesiones de alto grado que de bajo grado y en NIC1 que en CC, en tanto que el cociente  $E2/E6$  disminuye con la progresión neoplásica y permite diferenciar entre lesiones de bajo y alto grado (NIC1/NIC2-3, NIC1/CC). En la Figura. 20 esquematizamos el modelo de estos autores, quienes encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) entre NIC1 y CC (cargas de  $E6$  de  $2.83 \times 10^5$  para NIC1 y  $6.10 \times 10^3$  para CC; cargas de  $E2$  inferidas por nosotros:  $2.57 \times 10^5$  para NIC1 y 122 para CC; cocientes  $E2/E6$  de 0.91 en NIC y 0.02 en CC) Cricca et al. (2007). Maelle-Saunier et al. (2008) encontraron que la carga de  $E6$  difiere significativamente entre NIC1 y CC, mientras que el cociente  $E2/E6$  disminuye pero no significativamente,  $E6 = 94$  para NIC1 y 59,963 para CC; cargas de  $E2$  inferidas por nosotros: 54.5 para NIC1 y 21,587 para CC, cociente  $E2/E6 = 0.58$  y 0.36 para NIC1 y CC, respectivamente. Por otra parte, Yoshida et al. (2007) encontraron que la carga viral es inversamente proporcional al grado de lesión neoplásica pero no hay diferencias significativas entre grupos con lesiones de distinto grado. Maelle-Saunier et al. (2008) afirman que al aumentar el grado de lesión también aumenta significativamente la carga de  $E2$  y  $E6$  de VPH16 en tanto que el cociente  $E2/E6$  disminuye.

**Tabla 13. Cargas de E2 y E6 normalizadas y cocientes E2/E6 por grado de lesión en éste y otros trabajos**

Lesión	Copias de E2/ng		Copias de E6/ng		Cociente E2/E6		Referencia
	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	
IVPH-NIC1	149,072 ± 114,238	55-1,267,116	4,056 ± 4,847	16-34,478	103 ± 154	0.006-877	Este trabajo
	NE	NE	72,303	0.09-2,180	NE	NE	Yoshida et al. (2007)
	153,587 ± 156,679	0-1,535,867	2,210,000 ± 203,861	45-2,210,000	1.5 ± 0.4	0-14.5	De Marco et al. (2007)
	858 <sup>a</sup>	NE	943 <sup>a</sup>	0.08-9,133	1 <sup>a</sup>	0.5-1.0	Cricca et al. (2007)
NIC2-3	947,015 ± 1,644,084	119-5,208,583	157,821 ± 254,066	30-868,018	11.0 ± 8.0	0.006-60	Este trabajo
	NE	NE	21,600	0.09-2,180	NE	NE	Yoshida et al. (2007)
	267,179 ± 367,925	0-3,606,914	369,791 ± 612,204	346-4,992,182	1.5 ± 0.4	0-19.9	De Marco et al. (2007)
	167,209 <sup>a</sup>	NE	242,333 <sup>a</sup>	4.2-496,667	1 <sup>a</sup>	NE	Cricca et al. (2007)
CC	2,813,236 ± 5,664,597	18-17,200,000	173,171 ± 378,329	15-1,152,000	29.6 ± 57.7	0.02-182	Este trabajo
	NE	NE	10,028 <sup>a</sup>	0.09-2,180	NE	NE	Yoshida et al. (2007)
	1 <sup>a</sup>	NE	696,000 <sup>a</sup>	NE	0	NE	De Marco et al. (2007)
	0	NE	20	1.2-83	0	0-0.2	Cricca et al. (2007)

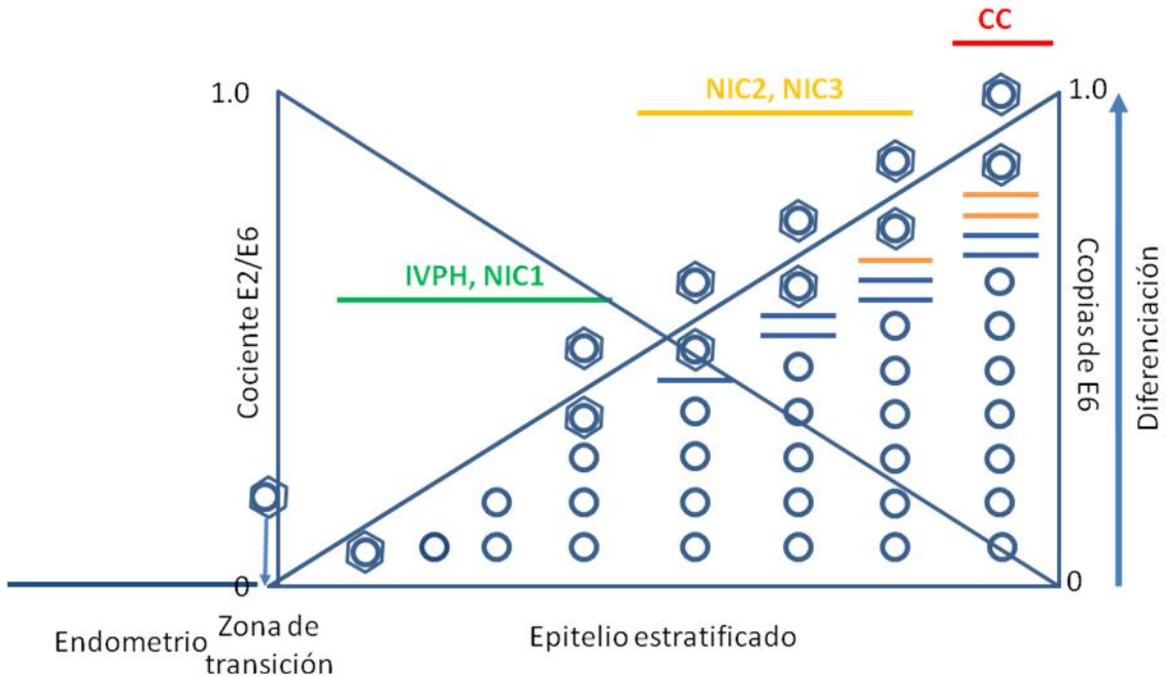
<sup>a</sup> Desviación estándar no especificada.

NE, no especificado.



**Figura. 19. Distribución de los valores del log ( $E2/E6$ ) en todas las muestras de raspados cervicales**

(A) Histograma de frecuencias de los valores del log ( $E2/E6$ ); los datos ( $n = 35$ ) corresponden a una distribución gaussiana. (B) Gráfica boxplot con los valores máximo y mínimo (líneas horizontales en los extremos), rango intercuartil (caja gris), mediana (línea interna en la caja) y probables outliers (puntos 18 y 32). (C) Gráfica Q-Q plot para el análisis de la distribución de los valores del log ( $E2/E6$ ) indicados por círculos vacíos vs. la distribución normal teórica (línea recta).



**Figura. 20. Modelo de Cricca et al. (2007) para la replicación e integración del genoma de VPH16 en lesiones neoplásicas cervicales de grado creciente**

El diagrama representa la replicación viral, iniciada con la adsorción de los viriones a las células en la zona de transición (localizada entre el endometrio y el epitelio escamoso del cérvix). La replicación y encapsidación del genoma viral y la liberación de viriones de la progenie avanza a medida que se incrementa la diferenciación de las células epiteliales; la integración del genoma viral al genoma celular es proporcional a la progresión de las lesiones neoplásicas intraepiteliales. La carga viral, representada por el número de copias del oncogén *E6* aumenta a medida que progresa la diferenciación del epitelio cervical. La integración del genoma viral al genoma celular ocurre por eventos de recombinación concomitantes con la interrupción del gen *E2* que eliminan la secuencia codificante del represor y permiten la sobreexpresión de los oncogenes *E6* y *E7*. El valor del cociente  $E2/E6$  es  $\sim 1$  en el estado plasmídico puro y tiende a 0 (cero) a medida que aumenta la integración y progresan las lesiones neoplásicas del cérvix (desde NIC1, pasando por NIC2 y NIC3 hasta CC). La progresión neoplásica en este modelo es por tanto directamente proporcional a la carga viral e inversamente proporcional a la integración, determinada indirectamente mediante qPCR con el cociente  $E2/E6$ .

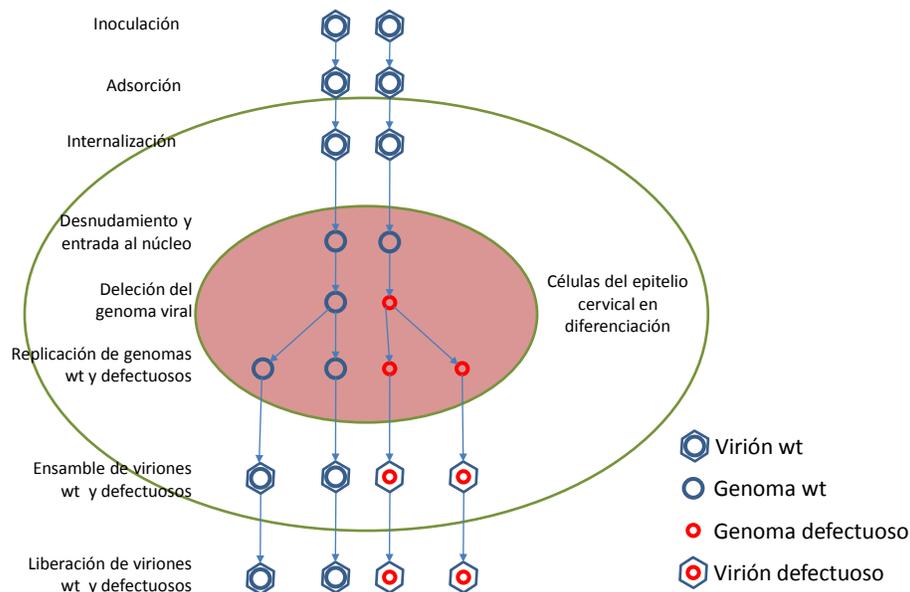
Los valores del log ( $E2/E6$ ) de las 35 muestras incluidas en este trabajo (cinco  $\leq 1.0$ ; 24 entre 1 y 10; seis  $\geq 10$ ) se ajustaron a la distribución gaussiana, la cual es consistente con la ocurrencia de deleciones aleatorias de los genes  $E2$  y  $E6$  en los genomas circulares completos en estado plasmídico replicados o en proceso de replicación, pero no con la presencia de genomas virales integrados al DNA nuclear con deleciones preferentes del gen  $E2$ . Estos resultados sugieren que en las células infectadas hay genomas virales en estado plasmídico completos e incompletos en proporciones variables. La distribución de los valores del log ( $E2/E6$ ) implica que la proporción de deleciones del gen  $E2$  ( $E2/E6 < 1$ ) o del gen  $E6$  ( $E2/E6 > 1$ ) es característica en cada caso. Los casos con valores extremos son consistentes con la presencia de genomas virales defectuosos (i.e., deleciones de los genes virales  $E2$  o  $E6$ ) y con la posibilidad de que en la progenie de estas infecciones puedan generarse y llegar a predominar partículas virales defectuosas interferentes generadas como se indica en la Figura. 21.

Las partículas defectuosas interferentes (DIPs) descritas por Henle y Henle (1943) y von Magnus (1954), surgen espontáneamente durante la replicación de virus de RNA y de DNA (Huang y Baltimore 1970, Cole et al. 1971, Lazzarini et al. 1981) y son incapaces de causar infecciones productivas debido a las deleciones de sus genomas (Holland y Doyle 1973, Kristen et al. 2009). Las DIPs y los genomas virales completos coinfectan las mismas células y por lo tanto compiten por los recursos de replicación y encapsidación dado que las DIPs son amplificadas a expensas de las partículas virales completas. La infección de células BHK con VSV es uno de los mejores sistemas para el estudio de la generación e interacción de las partículas virales defectuosas (Kristen et al. 2009). Ciertas deleciones del virus de la estomatitis vesicular (VSV) generan genomas defectuosos que interfieren con los mecanismos de replicación viral (Perrault y Semler 1979). Las DIPs carecen del complemento completo de los genes necesarios para llevar a cabo todo el ciclo de replicación viral y requieren que otro virus o la maquinaria del hospedero provea las funciones faltantes. Algunos retrovirus han captado secuencias de la célula hospedera pero han perdido algunas funciones y por ello requieren de un virus auxiliar (helper) que retenga tales funciones. El virus de la hepatitis delta (con genoma de RNA) es considerado defectuoso porque no codifica sus propias proteínas estructurales y utiliza las del virus de la hepatitis B (con genoma de DNA). En los casos de hepatitis B crónica se ha demostrado que la presencia del agente delta está asociada a mayor inflamación, necrosis parenquimatosa y displasia que en los casos sin agente delta, lo cual indica que en pacientes con hepatitis B crónica la presencia de ambos virus aumenta el daño hepático y acelera la progresión de la enfermedad (Kanel et al. 1984).

Aunque se desconoce el papel de las partículas virales defectuosas en las infecciones naturales (Kristen et al. 2009), la presencia de ciertas partículas

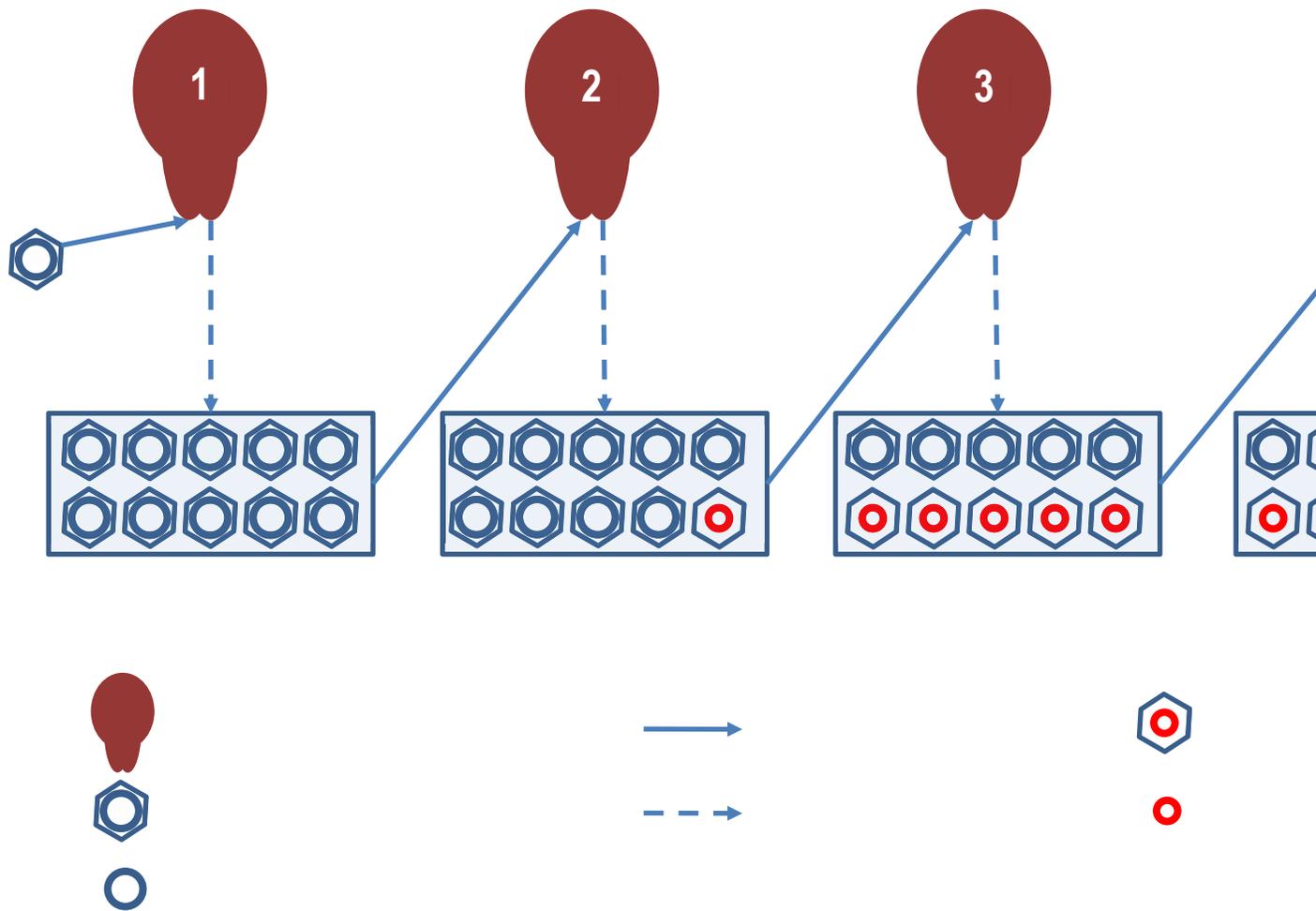
defectuosas del virus de la hepatitis B (deleción de 183 pb) interfiere con la infección, replicación y liberación de las partículas virales en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (Cabrerizo et al. 2002). La propagación de las partículas defectuosas es favorecida cuando se utiliza como inóculo infectante una suspensión con alta multiplicidad de infección que implica un exceso de partículas virales en relación con el número de células infectadas (Rowe y Bau 1965).

Los resultados de este trabajo sugieren por tanto que durante la infección natural del cérvix por VPH16 ocurren deleciones aleatorias no solamente del gen *E2* sino también del gen *E6*, las cuales a su vez podrían generar viriones defectuosos cuya proporción podría aumentar en las infecciones subsiguientes (Figura. 22). Igual que en infecciones por toros virus, en las infecciones del cérvix por VPH16 podrían ser generadas partículas defectuosas que afecten la replicación y la patogenicidad viral y por tanto la progresión neoplásica y la inmunidad contra la infección.



**Figura. 21. Modelo propuesto para la generación de delecciones del genoma viral y partículas defectuosas de VPH16**

El diagrama representa el ciclo viral de VPH16, iniciado con la inoculación de viriones con el genoma completo (silvestre, wt) en las células basales del epitelio cervical. A la inoculación sigue la adsorción de los viriones a la superficie celular, su transporte en vesículas endocíticas, el desnudamiento de los viriones, la replicación y la encapsidación del genoma viral y finalmente la liberación de los viriones de la progenie por las células más diferenciadas en las que se completa el ciclo de replicación viral. Si los viriones con el genoma completo infectan con baja multiplicidad a las células basales del epitelio cervical, al diferenciarse y completar el ciclo de replicación viral éstas solamente liberan la progenie de partículas virales con el genoma completo. Durante la replicación del genoma viral pueden producirse delecciones y los genomas defectuosos, capaces de replicarse sólo en presencia de genomas completos coinfectantes, son encapsidados y liberados junto con viriones completos para provocar infecciones sucesivas que en función de la multiplicidad de infección pueden aumentar la proporción de viriones defectuosos.



**Figura. 22. Modelo propuesto para la generación de deleciones del genoma de VPH y la distribución de partículas defectuosas en infecciones cervicales sucesivas**

Los viriones con el genoma completo (silvestre, wt) provocan la primera infección en las células basales del epitelio cervical y liberan solamente progenie con el genoma completo. Los viriones completos liberados en la primera infección provocan la segunda infección; las células infectadas con genomas completos generan genomas defectuosos que forman una pequeña proporción de la progenie mixta. En la tercera infección sucesiva, iniciada por coinfección de partículas virales completas e incompletas aumenta la proporción de partículas defectuosas en la progenie viral. En infecciones sucesivas iniciadas con proporciones crecientes de partículas defectuosas, éstas llegan a ser las predominantes en la progenie.

## REFERENCIAS

- Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B (2005) Type distribution, viral load and integration status of high-risk Human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *B J Cancer* 92:2195-2200.
- Arrossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM (2003) Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex* 45 Suppl 3:S306-314.
- Asato T, Nakajima Y, Nagamine M, Nakashima Y, Takei H, Maehama T, Yamashiro T, Higashi M, Nakayama M, Kanazawa K. (1994) Correlation between the progression of cervical dysplasia and the prevalence of human papillomavirus. *J Infect Dis* 169:940-941.
- Band V, Zajchowski D, Kulesa V, Sager R (1990) Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:463-467.
- Bastien N, McBride AA (2000) Interaction of the papillomavirus *E2* protein with mitotic chromosomes. *Virology* 270:124-134.
- Bergeron Christine(2003) The 2001 Bethesda System. *Salud Publica Mex* 45 supl 3:S340-S344.
- Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, Garcia-Carranca A (1994) Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of *E1/E2* genes. *Int J Cancer* 56:640-645.
- Bosch FX (2003) Epidemiology of human papillomavirus infections: new options for cervical cancer prevention. *Salud Publica Mex* 45 (Suppl 3):S326-339.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV (2002) The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244-265.
- Brody JR, Kern SE (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36:214-216.
- Buckley CH, Butler EB, Fox H (1982) Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 35:1-13.
- Cabrerizo M, Bartolome J, Carreño V (2002) In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by a defective hepatitis B virus with a deletion in the PreS1 region of the viral genome. *J Viral Hepat* 9:265-271.
- Calculator for determining the number of copies of a template [<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>].
- Chen CM, Shyu MP, Au LC, Chu HW, Cheng WT, Choo KB (1994) Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *J Med Virol* 44:206-211.
- Choo KB, Pan CC, Han SH (1987) Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the *E2* gene and invariable retention of the long control region and the *E6/E7* open reading frames. *Virology* 161:259-61.
- Cole CN, Smoler D, Wimmer E, Baltimore D (1971) Defective interfering particles of poliovirus, isolation and physical properties. *J Virol* 7:478-485.
- Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, Costa S, Musiani M, Zerbini M (2007) Viral DNA load, physical status and *E2/E6* ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol* 106:549-557.
- Crovella S, Pirulli D, De Santo D, De Seta F, Boniotto M, Braidà L, Boaretto F, Guaschino S, Amoroso A (2002) Quantitative in situ detection of high-risk human papillomavirus in cytological specimens by SYBRGreen I fluorescent labeling. *Clin Exp Med* 2:1-6.
- CSchlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL (2003) Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 95:1336-43.

- Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, Kantelip B, Schaal JP, Mouglin C (2003) Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 106:396-403.
- Doyle M, Holland JJ (1973) Prophylaxis and immunization in mice by use of virus-free defective T particles to protect against intracerebral infection by vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:2105-2108.
- el Awady MK, Kaplan JB, O'Brien SJ, Burk RD (1987) Molecular analysis of integrated human papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology* 159:389-398.
- Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM (2009) Principles of Virology. Tercera edición. Capítulo 7: Transformation and Oncogenesis, pp 201-248. ASM press, Washington.
- Friedl F, Kimura I, Osato T, Ito Y (1970) Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. *Proc Soc Exp Biol Med* 135:543-545.
- Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K (1991) Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 72 (Pt 5):1039-1044.
- Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti MC, Rodriguez AC, Helzlsouer KJ, Schiffman M (2003) A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:477-484.
- Gutiérrez-Xicoténcatl L, Plett-Torres T, Madrid-González CL, Madrid-Marina V (2009) Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. *Salud Publica Mex* 51:S479-S488.
- 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.
- Hernández-Arteaga S, López-Revilla R (2010) Ultrasensitive quantitation of human papillomavirus type 16 *E6* oncogene sequences by nested real time PCR. *Infect Agents Cancer* 5:9.
- Hernández-Arteaga S, Sánchez-Garza M, López-Revilla R (2007) Nuevo método de PCR anidada en tiempo real con EvaGreen para determinar la carga de papilomavirus. *RESPYN* 7:43.
- Hidalgo-Martínez AC (2006). El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el por qué no funciona el programa de detección oportuna. *Rev Biomedicina* 17:81-84.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026-1030.
- Huang AS, Baltimore D (1970). Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* 226:325-327.
- Hubbard RA (2003) Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 127:940-945.
- Ihrig J, Lill R, Muhlenhoff U (2006) Application of the DNA-specific dye EvaGreen for the routine quantification of DNA in microplates. *Anal Biochem* 359:265-267.
- Jenkins D (2007) Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Disease Markers* 23 199-212.
- Kalantari M, Bernard H-U (2006) Capítulo 4: Gene expression of papillomavirus, pp 42-48. En: Saveria Campo M (ed), Papillomavirus Research. From Natural History to Vaccines and Beyond. Caister Academic Press, Norfolk.
- Kalantari M, Blennow E, Hagmar B (2001) Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 10:46-54.
- Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G (1998) Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol* 17:146-153.
- Kanel GC, Govindarajan S, Peters RL (1984) Chronic delta infection and liver biopsy changes in chronic active hepatitis B. *Ann Intern Med* 101:51-54.

- Kirkwood TB and Bangham CR (1994). Cycles, chaos, and evolution in virus cultures: a model of defective interfering particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8685-8689.
- Kosel S, Burggraf S, Engelhardt W, Olgemoller B (2007) Increased levels of HPV16 *E6* \*I transcripts in high-grade cervical cytology and histology (CIN II+) detected by rapid real-time RT-PCR amplification. *Cytopathology* 18:290-299.
- Kraus I, Molden T, Holm R, Lie AK, Karlsen F, Kristensen GB, Skomedal H (2006) Presence of *E6* and *E7* mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 44:1310-1317.
- Kristen A, Thompson S, Rempala GA, Yin J (2009) Multiple-hit inhibition of infection by defective interfering particles. *J Gen Virol* 90:888–899.
- Kulmala SM, Shabalova IP, Petrovitchev N, Syrjanen KJ, Gyllensten UB, Syrjanen SM (2007) Prevalence of the most common high-risk HPV genotypes among women in three new independent states of the former Soviet Union. *J Med Virol* 79:771-781.
- Lazcano Ponce E, Rascon R, Lozano R, Velasco E (1996) Mortality from cervical carcinoma in Mexico: Impact of screening, 1980-1990. *Act Cytol* 7:205-213.
- Lazzarini RA, Keene JD, Schubert M (1981) The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses. *Cell* 26:145–154.
- Lekanne Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, Moorman AF (2002) Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBRGreen I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem* 307:63-69.
- López J, Aristizábal FA (2006) Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Rev Col Cienc Quim Farm* 35:5-32.
- Lopez-Martinez M, Anzola M, Cuevas N, Aguirre JM, De-Pancorbo M (2002) Clinical applications of the diagnosis of p53 alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Med Oral* 7:108-20.
- López-Revilla R, Martínez-Contreras LA, Sánchez-Garza M (2008) Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infect Agents Cancer* 28:3:3.
- Mao F, Leung WY, Xin X (2007) Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol* 7:76.
- Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlee F, Franco EL (2007) Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 357:1579-1588.
- McPherson RA (1995) Evolution of polymerase chain reaction to a quantitative laboratory tool. *Clin Chem* 41(8 Pt 1):1065-1067.
- Mendonça VG, Guimarães MJ, Lima Filho JL, Mendonça CG, Martins DB, Crovella S, Alencar LC. (2010) Human papillomavirus cervical infection: viral genotyping and risk factors for high-grade squamous intraepithelial lesion and cervix cancer. *Rev Bras Ginecol Obstet* 32:476-485.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518-527.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Vergara A, del Moral A, Munoz MT, Tafur L, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P (1993) Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2:423-431.
- Muñoz N, Bosch XF (1996) Relación causal entre el virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino y consecuencias para la prevención. *Bol Oficina Sanit Panam* 121:550-566.
- Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, Meijer C, Muñoz A (2004) Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis* 190:2077-87.

- Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, Hongo A, Kodama J, Itoh S, Kudo T (2002) Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40:863–867.
- Noda T, Sasagawa T, Dong Y, Fuse H, Namiki M, Inoue M (1998) Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in archival specimens of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer using a highly sensitive nested PCR method. *Urol Res*, 26:165-169.
- NOM 014-SSA2-1994. Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico uterino.  
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m014ssa24.html> (consultada el 6 de febrero de 2011).
- Perrault J, Semler BL (1979) Internal genome deletions in two distinct classes of defective interfering particles of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:6191-6195.
- Reischl U, Kochanowski B (1995) Quantitative PCR. A survey of the present technology. *Mol Biotechnol* 3:55-71.
- Richart (1973) Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu* 8:301-328.
- Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Le Doussal V, Orth G (1990) Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet* 335:1171-1174.
- Rowe WP, Bau SG (1965) Studies of adenovirus SV40 hybrid viruses. II. Defectiveness of the hybrid particles. *J Exp Med* 122:955-966.
- Sang F, Ren J (2006) Capillary electrophoresis of double-stranded DNA fragments using a new fluorescence intercalating dye EvaGreen. *J Sep Sci* 29:1275-1280.
- Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, Kantelip B, Schwarz E, Mougín C, Prétet JL (2008) Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol* 46:3678–3685.
- Saveria Campo M. Papillomavirus Research from Natural History to Vaccines and Beyond. Calster Academic Press UK, 2006.
- Schneider-Maunoury S, Croissant O, Orth G (1987) Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol* 61:3295-3298.
- Schneider-Maunoury S, Croissant O, Orth G. Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol* 61:3295-3298, 1987.
- Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowekamp WG (1985) Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 145:181-185.
- Sistema Nacional de Información en Salud, [www.sinais.salud.gob.mx](http://www.sinais.salud.gob.mx) (consultada el 6 de febrero de 2011).
- Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ (2006) HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* 208:152-164.
- Sosa-Rubí SG, Walker D, Serván E (2009) Práctica de mastografías y pruebas de Papanicolaou entre mujeres de áreas rurales de México. *Salud Publica Mex* 51:S236-S245.
- Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D (2004) Detection and typing of human papillomavirus by *E6* nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42:3176-3184.
- Thorland EC, Myers SL, Persing DH, Sarkar G, McGovern RM, Gostout BS, Smith DI (2000) Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res* 60:5916-21.

- Tidy J, Vousden KH, Mason P, Farrell PJ (1989) A novel deletion within the upstream regulatory region of episomal human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 70:999-1004.
- Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, Zinovich JB, Galuppo J, Alonio LV, Teyssie AR (2001) Physical status of the *E2* human papillomavirus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol* 21:129-134.
- Valdéz-Morales E, Hernández-Arteaga S, Sánchez-Garza M, López-Revilla R (2007) Determinación del estado físico del genoma de papilomavirus tipo 16 mediante PCR anidada en tiempo real. *RESPYN* 7:104
- van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, van den Brule AJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ (2002) Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* 98:590-595.
- Vernon SD, Unger ER, Miller DL, Lee DR, Reeves WC (1997) Association of human papillomavirus type 16 integration in the *E2* gene with poor disease-free survival from cervical cancer. *Int J Cancer* 74:50-56.
- von Magnus P (1954) Incomplete forms of influenza virus. *Adv Virus Res* 2:59-79.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19.
- Wang W, Chen K, Xu C (2006) DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument. *Anal Biochem* 356:303-305.
- Weinberg RA (1992) The integration of molecular genetics into cancer management. *Cancer* 70 (Suppl):1653-1658.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Muñoz N, Bosch FX, Wheeler CM (1997) Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 71:2463-2472.
- Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA (1995) Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the *E6*, *L2*, and *L1* coding segments. *J Virol* 69:7743-7753.
- Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Sakurai S, Fukuda T, Nakajima T (2008) Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer* 18:121-127.
- Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljov F, Einenkel J, Hoeckel M, von Knebel Doeberitz M (2003) A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene* 22:3977-3984.
- zur Hausen H (1988) Papillomavirus in human cancers. *Mol Carcinog* 1:147-150.
- zur Hausen H (1977) Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol* 78:1-8.

## ARTÍCULOS PUBLICADOS

- 1, Hernández-Arteaga S, López-Revilla R (2010) Ultrasensitive quantitation of human papillomavirus type 16 *E6* oncogene sequences by nested real time PCR. *Infect Agents Cancer* 5:9.
2. 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.
3. Hernández-Arteaga S, Sánchez-Garza M, López-Revilla R (2007) Nuevo método de PCR anidada en tiempo real con EvaGreen para determinar la carga de papilomavirus. *RESPYN* 7:43.
4. Valdéz-Morales E, Hernández-Arteaga S, Sánchez-Garza M, López-Revilla R (2007) Determinación del estado físico del genoma de papilomavirus tipo 16 mediante PCR anidada en tiempo real. *RESPYN* 7:104.

1. Hernández-Arteaga S, López-Revilla R (2010)  
<http://www.infectagentscancer.com/content/5/1/9>

Hernández-Arteaga and López-Revilla *Infectious Agents and Cancer* 2010, **5**:9  
<http://www.infectagentscancer.com/content/5/1/9>



**METHODOLOGY**

**Open Access**

# Ultrasensitive quantitation of human papillomavirus type 16 E6 oncogene sequences by nested real time PCR

Socorro Hernández-Arteaga and Rubén López-Revilla\*

## Abstract

**Background:** We have developed an ultrasensitive method based on conventional PCR preamplification followed by nested amplification through real time PCR (qPCR) in the presence of the DNA intercalating agent EvaGreen.

**Results:** Amplification mixtures calibrated with a known number of pHV101 copies carrying a 645 base pair (bp)-long insert of the human papillomavirus type 16 (HPV16) E6 oncogene were used to generate the E6-1 amplicon of 645 bp by conventional PCR and then the E6-2 amplicon of 237 bp by nested qPCR. Direct and nested qPCR mixtures for E6-2 amplification corresponding to  $2.5 \times 10^2$ - $2.5 \times 10^6$  initial pHV101 copies had threshold cycle (Ct) values in the ranges of 18.7-29.0 and 10.0-25.0, respectively. The Ct of qPCR mixtures prepared with 1/50 volumes of preamplified mixtures containing 50 ng of DNA of the SiHa cell line (derived from an invasive cervical cancer with one HPV16 genome per cell) was 19.9. Thermal fluorescence extinction profiles of E6-2 amplicons generated from pHV101 and SiHa DNA were identical, with a peak at 85.5°C.

**Conclusions:** Our method based on conventional preamplification for 15 cycles increased 10,750 times the sensitivity of nested qPCR for the quantitation of the E6 viral oncogene and confirmed that the SiHa cell line contains one E6-HPV16 copy per cell.

## Background

Invasive cervical cancer develops in women with persistent infection by high-risk human papillomavirus (HR-HPV), among which HPV16 and HPV18 are the most frequent types [1]. HPV16 being the most prevalent and associated with nearly half of the invasive cervical cancer cases in the world [2,3].

Molecular methods to quantify the number of HPV16 genome copies serve to determine the viral load and the progression of HPV16 neoplastic lesions. Hybrid capture [4] or "nested" PCR [5] are used for molecular diagnosis of HPV infection, whereas qPCR is used to assess viral load and integration to the cellular genome [6,7].

Conventional nested PCR is more sensitive than conventional "direct" PCR to detect HPV16 E6 oncogene sequences [8,9] whose quantitation is reproducible, spe-

cific and more sensitive in qPCR mixtures containing the DNA intercalating agent EvaGreen [10].

In this work we developed an ultrasensitive method to quantify E6-HPV16 oncogene sequences in two steps: 1) preamplification of the E6-1 (645 bp) sequence through 15 cycles of direct conventional PCR, and 2) amplification of the E6-2 (237 bp) sequence through nested qPCR in the presence of EvaGreen. Preamplification significantly increased the sensitivity and the method confirmed that the SiHa cell line contains only one copy of the HPV16 genome per cell.

## Results

### E6-2 amplification by direct qPCR

E6-2 amplification from pHV101 in direct qPCR mixtures containing the pU1M/pU2R primer pair and  $2.5 \times 10^2$  to  $2.5 \times 10^6$  pHV101 copies in the presence of EvaGreen yielded a consistent family of type curves with Ct values between 18.70 and 29.00,  $\Delta$ Ct values in the 3.1-3.8 range, and lack of fluorescence increase in mixtures devoid of DNA. These experiments indicated that at least

\* Correspondence: [rlopez@picyt.edu.mx](mailto:rlopez@picyt.edu.mx)

<sup>1</sup> División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino de la Presa San José 2055, 78216 San Luis Potosí S.L.P., México

Full list of author information is available at the end of the article



© 2010 Hernández-Arteaga and López-Revilla; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2,500 copies of the E6 oncogene can be quantified by direct qPCR (Fig. 1A).

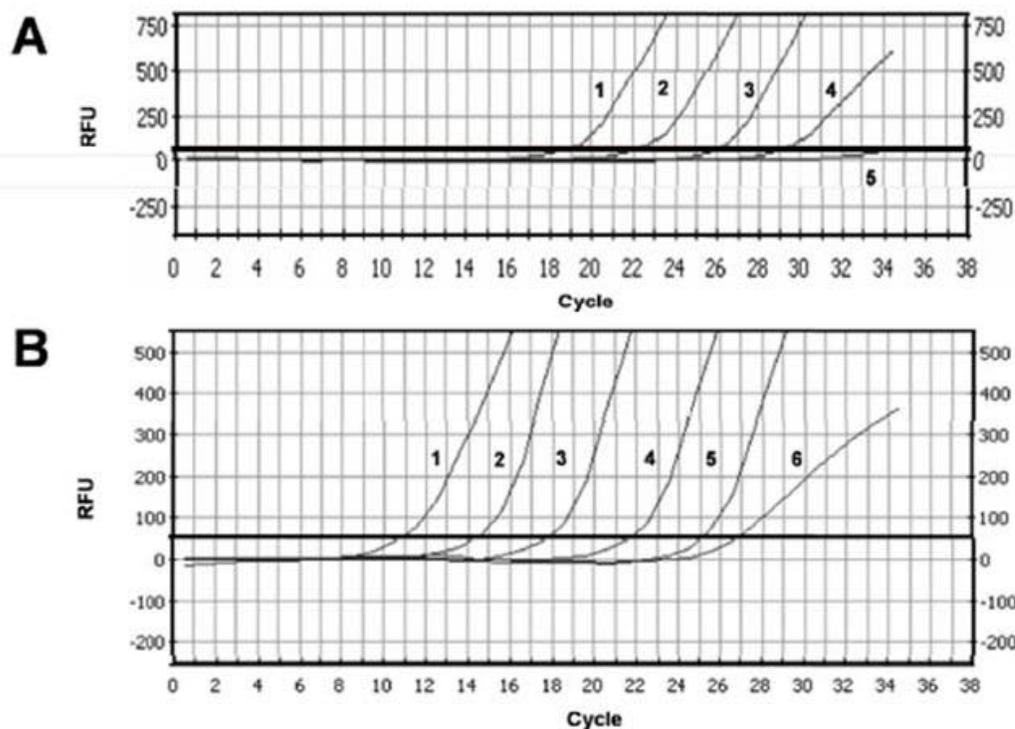
#### Pre-amplification and nested qPCR

To increase qPCR sensitivity E6-1 was first "pre-amplified" in conventional PCR mixtures and E6-2 was then "amplified" in nested qPCR mixtures containing EvaGreen, the LCRS/E7AS primer pair, and 1/50 volume of the corresponding pre-amplified mixtures.

The families of type curves required to calibrate the number of E6 copies and to quantify them in problem samples could be generated from nested qPCR mixtures derived from two types of pre-amplification mixtures: a) "complete" mixtures, prepared with serial logarithmic dilutions of the pHV101 template molecules before pre-amplification, and b) "minimum" mixtures, prepared with serial logarithmic dilutions from a single pre-amplified mixture containing the maximum number of template molecules used in complete mixtures.

Since labor, time and the amount of reagents are significantly reduced using minimum mixtures, we compared the results from nested qPCR mixtures prepared with 1/50 volume samples from pre-amplified mixtures which contained pHV101 molecules in the range of  $2.5 \times 10^2$ -to  $2.5 \times 10^6$  copies with those prepared using serial logarithmic dilutions from a single mixture containing  $2.5 \times 10^6$  pHV101 molecules that had been pre-amplified. We also added 50 ng of "carrier" normal human blood DNA to both complete and minimum positive pre-amplification mixtures (same amount as SiHa DNA in problem mixtures) and found that all of them generate equivalent nested qPCR amplification results.

Typical Ct values of nested qPCR: 10.80 for  $2.5 \times 10^6$ , 14.35 for  $2.5 \times 10^5$ , 17.71 for  $2.5 \times 10^4$ , 21.62 for  $2.5 \times 10^3$  and 25.02 for  $2.5 \times 10^2$  initial pHV101 copies in the pre-amplification mixtures (Table 1) were consistent ( $\Delta Ct$  range: 3.3-3.9) and reproducible ( $R^2 = 1.000$ ), whereas the negative control mixture devoid of template DNA had a Ct = 27 (Fig. 1B).



**Figure 1** Family of E6-2 amplification curves obtained by direct and nested qPCR. RFU, relative fluorescence units. Threshold (thick horizontal line): 50 RFU. (A) Family of curves obtained in direct qPCR mixtures with pHV101 dilutions and primers for E6-2. Curve 1,  $2.5 \times 10^6$  pHV101 copies. Curve 2,  $2.5 \times 10^5$  copies. Curve 3,  $2.5 \times 10^4$  copies. Curve 4,  $2.5 \times 10^3$  copies. Curve 5, Blank (without DNA). (B) Family of curves obtained by nested qPCR with E6-2 primers and 1/50 volume of mixtures pre-amplified 15 cycles with pHV101 and E6-1 primers. Curve 1,  $2.5 \times 10^6$  pHV101 copies. Curve 2,  $2.5 \times 10^5$  copies. Curve 3,  $2.5 \times 10^4$  copies. Curve 4,  $2.5 \times 10^3$  copies. Curve 5,  $2.5 \times 10^2$  copies. Curve 6, blank (without DNA).

**Table 1: Ct values in direct and nested qPCR E6-2 amplicon mixtures with a variable number of pHV101 copies**

pHV101 copies	Ct		$\Delta$ Ct
	Direct qPCR	Nested qPCR	
$2.5 \times 10^2$	---	25.02	---
$2.5 \times 10^3$	29.00	21.62	7.40
$2.5 \times 10^4$	25.90	17.71	8.10
$2.5 \times 10^5$	22.10	14.35	7.75
$2.5 \times 10^6$	18.70	10.80	7.90

The average decrease in Ct values of nested qPCR resulting from preamplification for 15 cycles was 7.78 (Table 1), corresponding to a 215-fold sensitivity increase. Multiplying this factor by the 50-fold dilution factor of preamplified samples in nested reactions implies that under the conditions used the overall sensitivity of nested qPCR increased 10,750 times.

#### E6 copies per SiHa cell

The sensitivity and reliability of the nested qPCR method was tested by determining the HPV16 genome load through quantitation of E6 sequences present in the SiHa line, known to contain only one copy of the HPV16 genome per cell [11].

The following PCR mixtures containing the LCRS/E7AS primer pair and the DNA templates indicated were incubated for 15 cycles under conditions to generate ("preamplify") the E6-1 amplicon: a) positive controls with  $2.5 \times 10^6$ - $2.5 \times 10^2$  copies of pHV101 and 50 ng of "carrier" normal human blood DNA; b) negative controls with 50 ng of "carrier" DNA; c) problem samples with 50 ng of SiHa DNA; and d) blanks, without DNA. Nested qPCR mixtures containing EvaGreen, the pU1M/pU2R primer pair and 1/50 volume from each preamplified mixture were incubated for 35 cycles.

In nested qPCR mixtures for E6-2 containing 1/50 volumes of serial logarithmic dilutions from preamplified mixtures with  $2.5 \times 10^6$  to  $2.5 \times 10^2$  pHV101 molecules the Ct values ranged from 10.8 to 25.0 cycles ( $R^2 = 1.000$ ; slope = -3.57), and the  $\Delta$ Ct values were consistent (range: 3.3-3.9). The Ct values of nested qPCR mixtures prepared without preamplified samples were 27.0 and 28.0, whereas the basal fluorescence decreased slightly in pre-amplification mixtures containing SiHa DNA with the pU1M primer only (Fig. 2A).

The family of type curves obtained from nested qPCR mixtures for E6-2 amplification was consistent with the

initial pHV101 copy number. On the other hand, the Ct value (19.9) and E6 copy number obtained from a typical preamplification mixture containing 50 ng of SiHa cell DNA (equivalent to  $6.05 \times 10^3$  HPV16 genome copies) had the magnitudes expected (i.e., one E6 copy per 7.1 pg of DNA, equivalent to the genomic mass of a human diploid cell) (Fig. 2A).

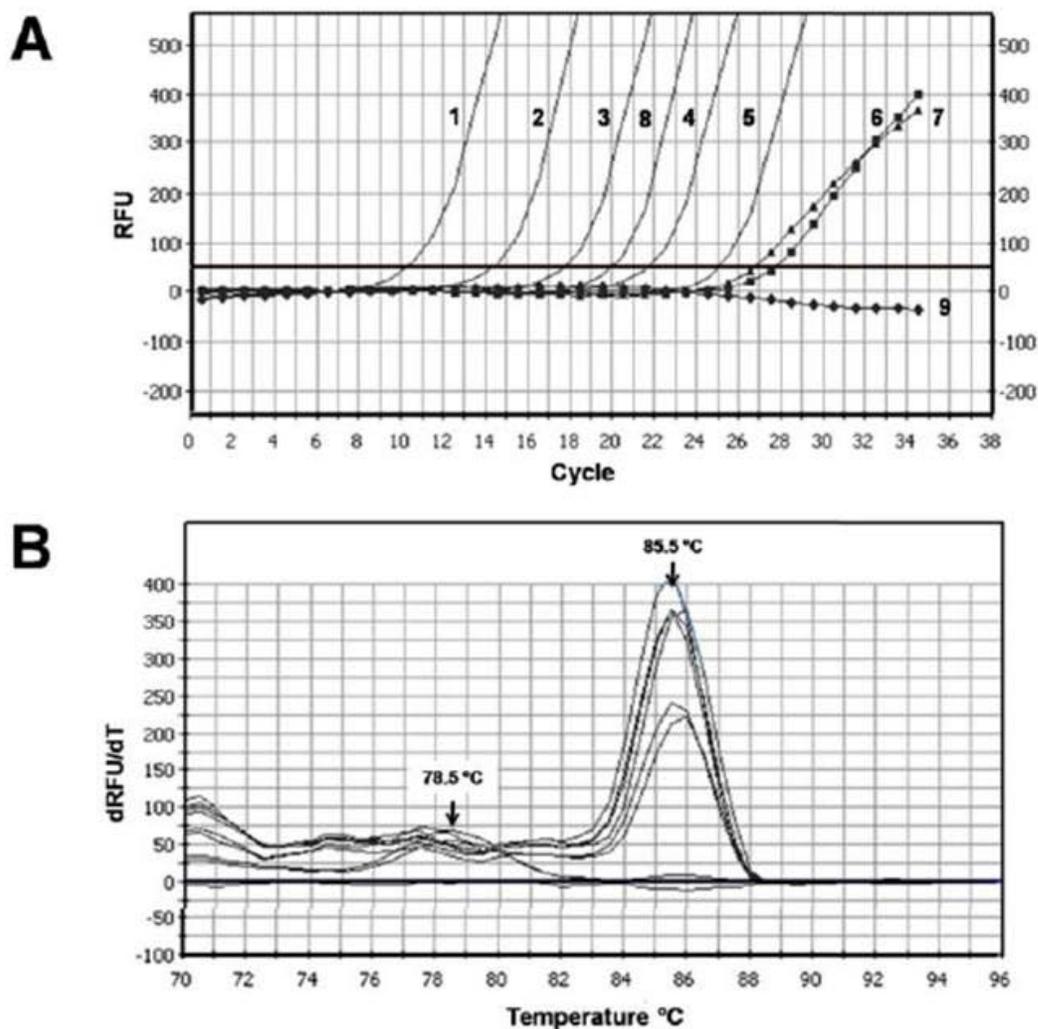
The thermal denaturation ("fluorescence extinction") profiles of nested qPCR products generated from pHV101 and SiHa DNA were identical, with a major peak around 85.5°C whose magnitude was proportional to the initial number of pHV101 copies, and clearly different from the secondary peak at 78.5°C which appeared in the negative controls containing just the forward primer of the second pair (Fig. 2B).

#### Discussion

Our group has already confirmed that detection of HPV infection is more sensitive by nested conventional PCR through the successive synthesis of the E6-1 and E6-2 amplicons used in this work [9], and that quantitation of E6 oncogene sequences by qPCR in the presence of EvaGreen is reproducible and specific [10].

The PCR mixtures required to calibrate and quantify the number of E6 copies present in problem samples were prepared using serial logarithmic dilutions of pHV101, a pGEM construct containing a 645 bp-insert whose sequence corresponds to the E6-HPV16 ORF [10].

To increase amplification sensitivity, E6-1 was "pre-amplified" for 15 conventional PCR cycles and then E6-2 was "amplified" by 35 "nested" qPCR cycles in the presence of normal human DNA using, as source of template, 1/50 volume of either preamplified mixtures prepared with serial logarithmic dilutions of pHV101 or with serial logarithmic dilutions of a single preamplified mixture prepared with the highest number of pHV101 copies. Direct



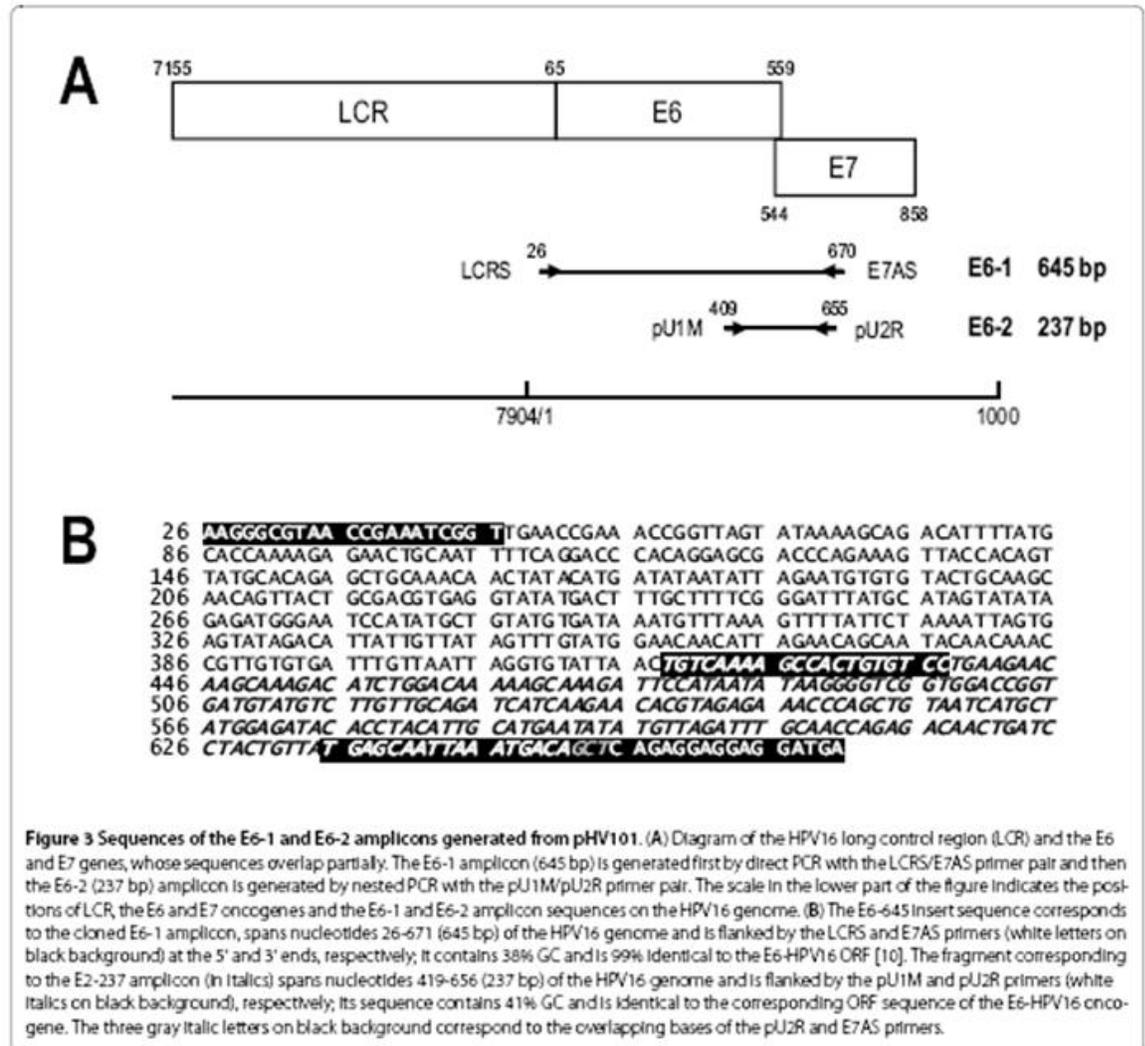
**Figure 2** Thermal denaturation (fluorescence extinction) profiles of the E6-2 amplicons generated from pHV101 and SiHa DNA. RFU, relative fluorescence units. (A) Family of curves obtained with serially diluted pHV101 or 50 ng of SiHa DNA. Threshold (thick horizontal line): 50 RFU. Curve 1,  $2.5 \times 10^6$  pHV101 copies. Curve 2,  $2.5 \times 10^5$  pHV101 copies. Curve 3,  $2.5 \times 10^4$  pHV101 copies. Curve 4,  $2.5 \times 10^3$  pHV101 copies. Curve 5,  $2.5 \times 10^2$  pHV101 copies. Curve 6, Blank (without DNA). Curve 7, normal human blood DNA. Curve 8, 50 ng of SiHa cell DNA with the pU1M/pU1R primer pair. Curve 9, 50 ng of SiHa cell DNA with the pU1M forward primer only. (B) Thermal fluorescence extinction profiles of nested qPCR products. Profiles of pHV101 and SiHa DNA mixtures with both primers (peaks at 85.5°C), mixtures without DNA or with normal human blood DNA with both primers (peaks at 78.5°C), and SiHa DNA with the pU1M primer only (nearly horizontal line close to the baseline).

PCR could quantify as little as 2,500 E6-HPV16 molecules, whereas nested qPCR was around 11,000 times more sensitive, a value close to that expected for 15 pre-amplification cycles which would increase the initial number of E6 template copies by a factor of  $2^{15} = 8,192$ .

Non-specific fluorescence appears to depend on the interaction of the two E6-2 primers because it increased

after cycle 27 in qPCR mixtures prepared with samples from preamplified mixtures containing normal human DNA or HPV16 DNA, but not from those containing SiHa DNA and the E6-2 forward primer only.

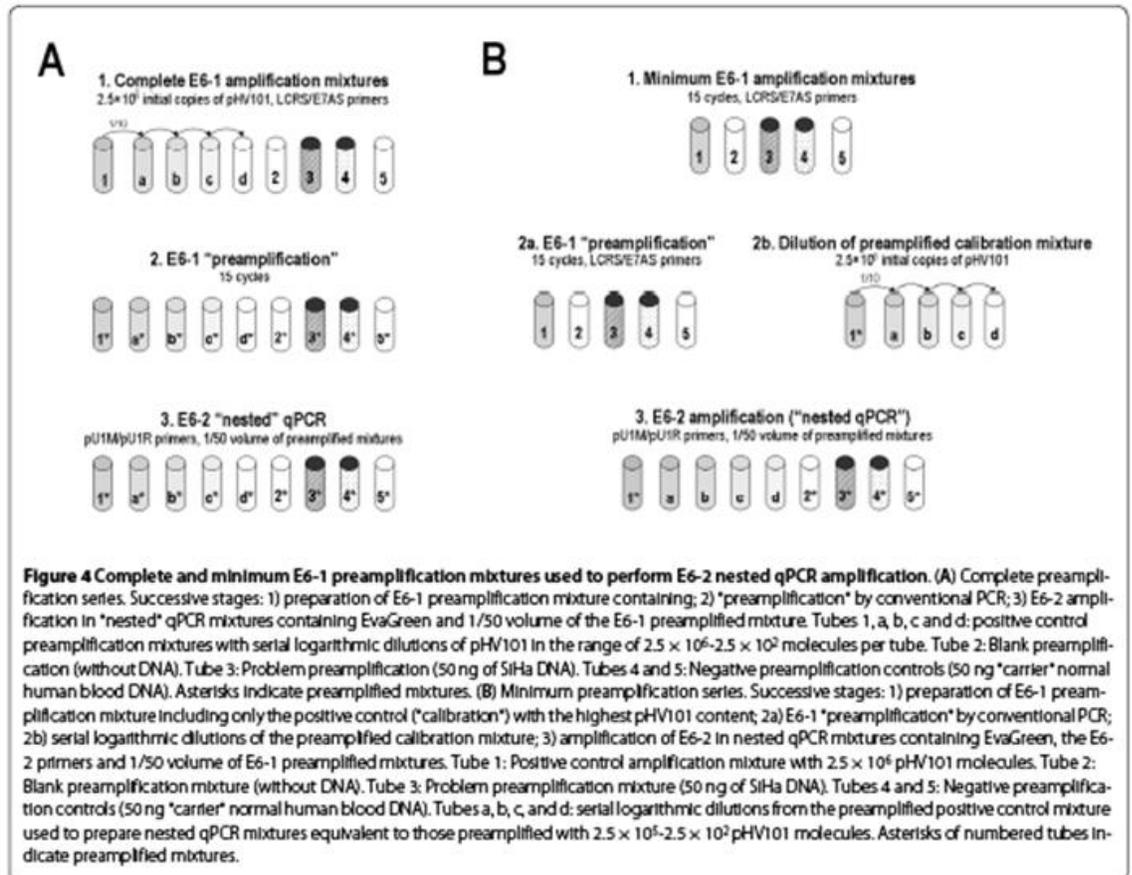
Use of the SiHa cell line, originally isolated from an invasive cervical cancer caused by HPV16 and known to contain only one viral genome per cell [11], confirmed



**Figure 3 Sequences of the E6-1 and E6-2 amplicons generated from pHV101.** (A) Diagram of the HPV16 long control region (LCR) and the E6 and E7 genes, whose sequences overlap partially. The E6-1 amplicon (645 bp) is generated first by direct PCR with the LCRS/E7AS primer pair and then the E6-2 (237 bp) amplicon is generated by nested PCR with the pU1M/pU2R primer pair. The scale in the lower part of the figure indicates the positions of LCR, the E6 and E7 oncogenes and the E6-1 and E6-2 amplicon sequences on the HPV16 genome. (B) The E6-645 insert sequence corresponds to the cloned E6-1 amplicon, spans nucleotides 26-671 (645 bp) of the HPV16 genome and is flanked by the LCRS and E7AS primers (white letters on black background) at the 5' and 3' ends, respectively; it contains 38% GC and is 99% identical to the E6-HPV16 ORF [10]. The fragment corresponding to the E2-237 amplicon (in italics) spans nucleotides 419-656 (237 bp) of the HPV16 genome and is flanked by the pU1M and pU2R primers (white italics on black background), respectively; its sequence contains 41% GC and is identical to the corresponding ORF sequence of the E6-HPV16 oncogene. The three gray italic letters on black background correspond to the overlapping bases of the pU2R and E7AS primers.

**Table 2: Oligonucleotide primers**

Pair	Primer	Sequence (5'T 3')	Amplicon
1	LCRS (Forward)	AAGGGAGTAACCGAAAACGGT	E6-1 (645 bp)
	E7AS (Reverse)	TCATCCTCCTCCTGAG	
2	pU1M (Forward)	TGTCAAAAACGGTTGTGTC	E6-2 (237 bp)
	pU2R (Reverse)	GAGCTGTCGCTTAATTGCTC	



the sensitivity and reliability of our nested qPCR method, since preamplified mixtures containing 50 ng of SiHa DNA generated Ct values corresponding to one copy of the E6-HPV16 oncogene per human diploid genome.

The nested qPCR method may also be used in the future to quantify viral load as well as viral and cellular transcripts with high sensitivity and reliability.

### Conclusions

Our method, based on conventional PCR preamplification for 15 cycles increased 10,750 times the sensitivity of nested qPCR for quantitation of the E6 oncogene, and confirmed that the SiHa cell line contains only one E6-HPV16 copy per cell.

### Methods

#### Amplification conditions

E-645, the pHV101 insert sequence spanning the E6-HPV16 open reading frame (ORF), was used as the initial template to generate the E6-1 (645 bp) amplicon through

conventional direct PCR and then the E6-2 (237 bp) amplicon through conventional nested PCR (Fig. 3) [10].

E6-1 and E6-2 amplification was maximized in 50  $\mu$ L conventional PCR mixtures containing  $2.5 \times 10^6$  pHV101 copies under the following conditions: 3 mM  $MgCl_2$ , 0.05 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.15  $\mu$ M of each of the forward and reverse primers (Table 2), 30 U/ml *Taq* polymerase (Invitrogen), and annealing temperature of 57°C.

PCR products were analyzed by electrophoresis in sodium borate-1.5% agarose gels [12] for 2 h at 90 V, followed by ethidium bromide staining; they were visualized by ultraviolet light transillumination and their digital images recorded in a ChemiDoc EQ photodocumenter (BioRad, Hercules, CA) using the Quantity One (BioRad) software.

#### Preamplification and calibration of nested qPCR

Calculation of the number of E6-HPV16 copies is based on the size of pHV101 (3,645 bp) and the average molecular weight of a deoxynucleotide pair (650 Da). We esti-

mated that 1 ng of pHV101 contains  $2.5 \times 10^8$  molecules with the formula of Staroscik [13]: number of copies = ((amount in ng) \*  $6.022 \times 10^{23}$ )/((length in bp) \*  $10^6$  \* 650).

The E6-1 positive control mixtures required to generate the family type curves contained the LCRS/E7AS primer pair, 50 ng of "carrier" normal human DNA and serial logarithmic dilutions of pHV101; they were preamplified for 15 cycles (denaturation at 94°C for 15 sec, annealing at 57°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min). Problem preamplification mixtures contained 50 ng of SiHa cell DNA. Negative controls were a blank (i.e., without DNA) and another one with 50 ng of carrier normal human blood DNA.

Positive control preamplification mixtures were prepared either a) as five "complete" PCR mixtures containing serial logarithmic dilutions of pHV101 to attain  $2.5 \times 10^6$ - $2.5 \times 10^2$  pHV101 copies/mixture (Fig. 4A), or b) as a single "minimum" PCR mixture containing  $2.5 \times 10^6$  pHV101 copies (Fig. 4B); 1/50 volumes from both types of mixtures were added to prepare nested qPCR amplification mixtures.

qPCR mixtures optimized to amplify E6-2 with the pU1M/pU2R primer pair in the presence of EvaGreen (Biotium, Hayward, CA) were incubated with the same thermocycler program. To control nested amplification and to determine the number of E6 copies in problem samples, additional mixtures containing 1/50 volume of preamplified positive, negative and problem mixtures were prepared; in these experiments an additional negative control mixture was used which contained preamplified SiHa DNA and the forward (pU1M) but not the reverse (pU1R) primer (Fig. 4).

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

RLR conceived the study and obtained the funds to carry it out. SHA performed the bioinformatics analyses and the molecular studies. Both authors drafted the manuscript.

#### Acknowledgements

This work was partially supported by the Fondo Mixto CONACYT-SLP (grant FMSLP-C01-2006-62319) and a scholarship to SHA (No. 176112) from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico).

#### Author Details

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino de la Presa San José 2055, 78216 San Luis Potosí S.L.P., México

Received: 1 September 2009 Accepted: 14 May 2010

Published: 14 May 2010

#### References

1. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ: **Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.** *N Engl J Med* 2003, **348**(6):518-527.

2. Bosch FX: **Epidemiology of human papillomavirus infections: new options for cervical cancer prevention.** *Salud Publica Mex* 2003, **45**(Suppl 3):S326-339.
3. 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* 1999, **189**(1):12-19.
4. Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti MC, Rodriguez AC, Heldsouer KJ, Schiffman M: **A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003, **12**(6):477-484.
5. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, et al: **Detection and typing of human papillomavirus by six nested multiplex PCR.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(7):3176-3184.
6. Hubbard RA: **Human papillomavirus testing methods.** *Arch Pathol Lab Med* 2003, **127**(8):940-945.
7. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlee F, Franco EL: **Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer.** *N Engl J Med* 2007, **357**(16):1579-1588.
8. Noda T, Sasagawa T, Dong Y, Fuse H, Namiki M, Inoue M: **Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in archival specimens of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer using a highly sensitive nested PCR method.** *Urol Res* 1998, **26**(3):165-169.
9. Lopez-Revilla R, Martinez-Contreras LA, Sanchez-Garza M: **Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intra-epithelial neoplasia and invasive carcinoma.** *Infect Agent Cancer* 2008, **3**:3.
10. Hernandez-Arteaga S, Lopez-Revilla R: **Quantitation of human papillomavirus type 16 E6 oncogene sequences by real-time or quantitative PCR with EvaGreen.** *Anal Biochem* 2008, **380**(1):131-133.
11. Friedl F, Kimura I, Osato T, Ito Y: **Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1970, **135**(2):543-545.
12. Brody JR, Kern SE: **Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis.** *Biotechniques* 2004, **36**(2):214-216.
13. Calculator for determining the number of copies of a template <http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>

doi: 10.1186/1750-9378-5-9

**Cite this article as:** Hernández-Arteaga and López-Revilla: Ultrasensitive quantitation of human papillomavirus type 16 E6 oncogene sequences by nested real time PCR *Infectious Agents and Cancer* 2010, **5**:9

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## 2. Hernández-Arteaga S, López-Revilla R (2008)

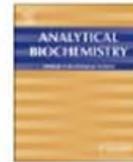
Analytical Biochemistry 380 (2008) 131–133



Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yabio](http://www.elsevier.com/locate/yabio)



### Notes & Tips

## Quantitation of human papillomavirus type 16 E6 oncogene sequences by real-time or quantitative PCR with EvaGreen

Socorro Hernández-Arteaga, Rubén López-Revilla\*

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, 78216 San Luis Potosí, México

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 15 February 2008  
Available online 17 May 2008

### ABSTRACT

Quantitation of E6 oncogene sequences of the human papillomavirus type 16 by real-time or quantitative PCR (qPCR) is used to determine the viral load, which correlates with the degree of the cervical neoplastic lesions. In the presence of EvaGreen, a new DNA intercalating fluorochrome, we obtained consistent and reproducible qPCR amplification curves and thermal denaturation profiles identical to those of the authentic E6-HPV16 (human papillomavirus 16) genome from the amplification products derived from a construct carrying the E6-HPV16 oncogene. E6-HPV16 quantitation in the presence of EvaGreen, therefore, is reproducible and specific and may be used to determine HPV16 viral load.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Persistent infection with high-risk human papillomavirus (HPV)<sup>1</sup> types is necessary for cervical cancer (CC) development [1–3], and HPV16 is the most frequent viral type associated with invasive CC [4]. Real-time or quantitative PCR (qPCR), originally described by Higuchi and coworkers [5], is based on the monitoring of fluorescence to quantify the amount of amplification products in each cycle. SYBR Green is the intercalating agent most frequently employed [6] and has been used in qPCR to determine HPV16 infection [7,8] and prevalence [9] and to correlate viral load with the progression of precancerous and cancerous cervical lesions [8,10]. EvaGreen, a new intercalating fluorochrome that is less expensive than SYBR Green, has been used to quantify DNA in microplates [11], electrophoresis capillaries [12], tubes [13], and qPCR [14]. In this work, we performed qPCR in the presence of EvaGreen to quantify sequences amplified in mixtures containing serial logarithmic dilutions of a construct carrying the E6-HPV16 open reading frame (ORF).

The E6-645 product (nt 26–670 of the E-P HPV16 genome) that includes the complete E6 ORF (nt 83–559) of the HPV16 European prototype [15], was amplified from pHV16 and cloned in pGEM-T to calibrate the number of target sequence copies in qPCR mixtures. E6-645/pGEM-T ligation mixtures were used to electroporate *Escherichia coli* TOP10 cells from which ampicillin-resistant Lac<sup>-</sup> (white) and Lac<sup>+</sup> (blue) colonies were isolated. The pHV101 construct containing the E6-645 insert from the SL104 Lac<sup>-</sup> transformant clone and the empty pHV103 construct from the SL105

Lac<sup>+</sup> transformant clone were isolated. Sizes of pHV101 and pHV103 linearized with *Pst*I were approximately 3700 and 3000 bp, respectively. Simultaneous digestion of pHV101 with *Pst*I and *Nco*I generated an approximately 3000-bp fragment (migrating as linearized pHV103) and an approximately 645-bp insert (Fig. 1A). The insert appeared to be complete because conventional PCR mixtures with pHV101 and the LCRS (5'AAGGAGTAACCGAAAACGGT3') and E7AS (5'TCATCCTCCTCCTCTGAG3') primer pair [16] generated the E6-645 band. These results confirmed that pHV101 has the expected unique *Pst*I and *Nco*I restriction sites flanking the complete E6-645 insert and may be used to calibrate the number of the ORF E6-HPV16 template copies in qPCR mixtures.

Sense and antisense DNA chain products were amplified from pHV101 with the LCRS/E7AS oligonucleotide pair, and the consensus sequences were determined with the terminator dye-based sequencing method. The insert consensus sequence included the E6-HPV16 ORF (nt 26–503) identical to the prototype sequence (GenBank accession number NC\_001526) except for the insertion of an additional thymine at position 106 (Fig. 1B) (identity = 99.8%). This finding confirmed that pHV101 contains the complete E6-645 insert and may be used to calibrate the number of copies of the target sequence in qPCR mixtures.

qPCR mixtures with SYBR Green contained 23.25  $\mu$ l of water, 0.75  $\mu$ l of the forward and reverse oligonucleotide mixture (0.15  $\mu$ M each), and 25  $\mu$ l of 2  $\times$  SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). To optimize E6-645 amplification, conventional PCR mixtures containing pHV101 and the LCR/E7AS oligonucleotide pair were tested by varying the concentrations of four components and the annealing temperature. Optimal conditions for the EvaGreen PCR mixtures were 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 mM each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 0.15  $\mu$ M each oligonucleotide, 600 U/ml *Taq* DNA polymerase, and annealing at 57 °C; reaction mixtures contained 38.20  $\mu$ l of water, 0.75  $\mu$ l of the

\* Corresponding author. Fax: +52 444 834 2010.

E-mail address: [rllopez@picyt.edu.mx](mailto:rllopez@picyt.edu.mx) (R. López-Revilla).

<sup>1</sup> Abbreviations used: HPV, human papillomavirus; CC, cervical cancer; qPCR, real-time or quantitative PCR; ORF, open reading frame; E6, early HPV gene encoding the E6 oncoprotein; E6-645, amplification product including the complete E6 ORF sequence; dNTP, deoxynucleotide triphosphate; Ct, threshold cycle.

3. Hernández-Arteaga S, Sánchez-Garza M, López-Revilla R. (2007)  
<http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>

2º Congreso Nacional de Química Médica

Hernández-Arteaga y col.



## NUEVO MÉTODO DE PCR ANIDADA EN TIEMPO REAL CON EVAGREEN PARA DETERMINAR LA CARGA DE PAPILOMAVIRUS

Socorro Hernández-Arteaga, Mireya Sánchez-Garza, Rubén López-Revilla División de Biología Molecular, IPICYT, 78216 San Luis Potosí, SLP. Correo electrónico: lhernandez@ipicyt.edu.mx

### RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres mexicanas. Su desarrollo requiere infección por virus del papiloma humano (VPH). Los virus asociados al CaCu son 'de alto riesgo', como los tipos 16 y 18. La amplificación de DNA viral mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR) permite diagnosticar la infección por VPH y tiene valor predictivo del riesgo de desarrollar CaCu. La PCR en tiempo real (PCR-TR) permite determinar la carga viral (i.e., cuantificar el número de copias de los genes blanco). La PCR-TR con SYBRGreen es la técnica más usada para la investigación y el diagnóstico rutinario. El propósito de este trabajo fue desarrollar un método de PCR-TR más sensible para determinar la carga viral de VPH16 empleando EvaGreen como fluorocromo. SiHa, línea celular derivada de un CaCu invasor, contiene una copia del genoma de VPH16 por célula, pone a prueba la sensibilidad de los métodos de detección. Para aumentar la sensibilidad desarrollamos un método de PCR anidada en el cual preamplificamos un producto de la región E6/E7 de VPH16 de 645 pb por PCR convencional y en la segunda reacción 'anidada' (en tiempo real) amplificamos un producto de 249 pb empleando EvaGreen. Cuantificamos la carga viral de muestras problema por interpolación con los valores del ciclo umbral (Ct) de mezclas con  $2.5 \times 10^3$ - $2.5 \times 10^6$  copias de pHV101 (plásmido con un inserto E6/E7-VPH16 de 645 pb). Detectamos las dos copias esperadas de VPH16 por célula SiHa y determinamos el número de copias en las muestras cervicales con grado conocido de displasia. Nuestro método, más sensible y barato que el de SYBRGreen, disminuiría los costos para determinar la carga viral y contribuiría al estudio de la epidemiología molecular de la infección del cérvix por VPH.

**Palabras clave:** Cáncer cervicouterino, PCR en tiempo real, Virus del papiloma humano

## INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres de todo el mundo y la primera en los países en desarrollo incluyendo a México. La falta de acceso oportuno al diagnóstico y tratamiento es la razón de su alta prevalencia principalmente en mujeres pobres, de baja escolaridad, que habitan en las áreas rurales y en las zonas marginadas de las ciudades. En México hubo alrededor de 13,400 muertes por cáncer cervicouterino en el año 2002 por lo cual cada hora y media murió una mujer mexicana por este mal.

El desarrollo de las lesiones precancerosas y cancerosas está asociado a la infección por virus del papiloma humano (VPH), transmitidos a las mujeres por contacto sexual genital con hombres infectados. Algunos virus causan verrugas o condilomas (lesiones benígnas que no progresan al cáncer, usualmente causadas por los tipos 6 y 11), mientras que otros provocan la transformación neoplásica de las células del epitelio del cuello uterino y por eso son llamados oncogénicos o 'de alto riesgo'. Se ha demostrado la presencia de genes de VPH de alto riesgo en el 99.7% de los casos de CaCu invasor, por lo cual se acepta que los VPH de alto riesgo son el principal factor necesario para el desarrollo del CaCu. Los virus de alto riesgo más frecuentes son los tipos 16, 18 y 31.

El diagnóstico citológico de la infección por papilomavirus se realiza con el método de Papanicolaou, que puede tener fallas por deficiencias en la calidad de las muestras, baja sensibilidad (44-88%), y una alta proporción de falsos negativos (10-54%). Actualmente hay diversos métodos moleculares más sensibles y específicos que complementan al Papanicolaou para diagnosticar la infección por papilomavirus. La PCR en tiempo real (PCR-TR) permite la cuantificación de secuencias nucleotídicas definidas. La intensidad creciente de la fluorescencia del producto de amplificación en función del número de ciclos de polimerización permite extrapolar el valor del ciclo umbral (Ct), el cual es inversamente proporcional al número de las secuencias blanco presentes en las muestras control (i.e., con un número conocido de copias de la secuencia blanco) y problema.

La PCR-TR que emplea al SYBRGreen como fluorocromo es la técnica más empleada actualmente para la investigación y el diagnóstico rutinario. En este trabajo hemos desarrollado un método alternativo de PCR-TR más sensible y barato para la cuantificación de la carga viral de VPH16 en muestras de raspados cervicales con un nuevo fluorocromo llamado EvaGreen.

## RESULTADOS

*Sensibilidad.* En mezclas para la amplificación de E6/E7 645 pb con  $2.5 \times 10^4$ - $2.5 \times 10^7$  copias iniciales de pHV101 obtuvimos dos familias de curvas consistentes y proporcionales con EvaGreen y SYBRGreen. Para la curva con  $2.5 \times 10^7$  copias iniciales, el valor de Ct (ciclo umbral) con EvaGreen fue 11.95 mientras que para SYBRGreen fue 16.00. Para mezclas con  $2.5 \times 10^4$  copias la curva no permitió obtener el valor de Ct con SYBRGreen mientras que con EvaGreen el valor de Ct fue 22.50 y fue conservada la proporcionalidad y la consistencia con el resto de los los valores de la familia de curvas (Tabla1).

Copias de pHV101	Valores de Ct	
	SYBRGreen	EvaGreen
$2.5 \times 10^7$	16.00	11.95
$2.5 \times 10^6$	19.20	15.36
$2.5 \times 10^5$	22.2	19.18
$2.5 \times 10^4$	Amplificación nula	22.50

Tabla 1. EvaGreen es 10 veces más sensible que SYBRGreen

*PCR anidada en tiempo real con EvaGreen.* Los valores de Ct y  $\Delta Ct$  (diferencia entre los valores de Ct vecinos que para diluciones logarítmicas teóricamente debe ser 3.3) obtenidos en tiempo real fueron consistentes en cada una de las curvas obtenidas con diferente número de copias iniciales de pHV101 y de muestras problema. El coeficiente de correlación lineal obtenido con los valores del logaritmo del número de copias vs el valor de Ct fue de 0.998 y el valor de la pendiente de la recta construida con los valores de Ct de la familia de curvas de pHV101 fue -3.7. La interpolación de los valores de Ct obtenidos con el control positivo con DNA de células SiHa permitió detectar 1 copia de genoma viral por célula; en este experimento también calculamos por interpolación la carga viral de las muestras problema.

*Especificidad.* Para analizar la especificidad de los productos de amplificación analizamos la extinción térmica de la fluorescencia en las mezclas con diferentes números de copias de pHV101 y de cada muestra problema. Encontramos patrón con un pico con extinción máxima de la fluorescencia a 85.5°C en todas las muestras con pHV101, en el control positivo con DNA de SiHa y en todas las muestras problema, pero no en la

muestra con un solo oligonucleótido (Fig. 1).

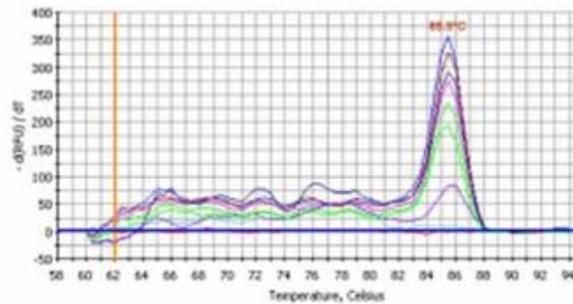


Fig. 1. El patrón de extinción de fluorescencia coincide para el producto principal de pHV101, SiHa y las muestras problema. Valor máximo de extinción = 85.5°C.

*Correlación de la carga viral con el grado de displasia.* Hicimos un análisis preliminar de 10 muestras con infección única por VPH16 tipificadas previamente en nuestro laboratorio que mostró una correlación directa de la carga viral con el grado de displasia (Fig. 2).

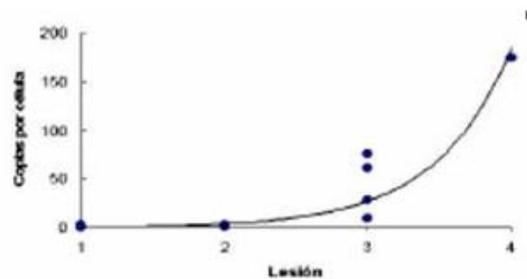


Figura 2. Correlación de la carga viral con el grado de displasia del cérvix. Clave de las muestras con lesiones displásicas: 1, NIC1; 2, NIC2; 3, NIC3; 4, CaCu invasor.

## CONCLUSIONES

1. El uso de EvaGreen hace a nuestro método de PCR en tiempo real más sensible y barato e igualmente específico y reproducible que el de SYBRGreen.
2. Hasta donde sabemos, nuestro método de PCR anidada en tiempo real con EvaGreen es el primero que se ha desarrollado.
3. Con este método logramos detectar una copia del genoma de VPH16 por célula y confirmamos que la carga viral correlaciona con el grado de displasia cervical.

## REFERENCIAS

1. Fujinaga Y, Shimada M, Okasawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 72:1039-1044, 1991.
2. Lewis, MJ. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud. Washington. 2004.
3. Muñoz N, Bosch X, De Sanjosé S, Vergara A, del Moral A, Muñoz MT, Tafur L, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P. Risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade III/ carcinoma *in situ* in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2:423-431, 1993.
4. Walboomers J, Jacobs M, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19, 1999.
5. Zur Hausen H. Papillomavirus in human cancers. *Mol Carcinog* 1:147-150, 1

4. Valdez-Morales E, Hernández-Arteaga S, Sánchez-Garza M, López-Revilla R. (2007)

<http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>



## DETERMINACIÓN DEL ESTADO FÍSICO DEL GENOMA DE PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 MEDIANTE PCR ANIDADA EN TIEMPO REAL

Eduardo Valdez-Morales, Socorro Hernández-Arteaga, Mireya Sánchez-Garza, Rubén López-Revilla. División de Biología Molecular, IPICYT, 78216 San Luis Potosí, SLP. E-mail: evaldez@ipicyt.edu.mx

### RESUMEN

La transformación maligna de las células del epitelio cervicouterino por virus del papilomavirus humano (VPH) de alto riesgo es iniciada por las oncoproteínas virales E6 y E7, que bloquean las proteínas supresoras de tumores Rb y P53 y está asociada a la integración del genoma viral al DNA nuclear. El gen viral E2 codifica un represor transcripcional de los oncogenes virales y usualmente se interrumpe durante la integración del genoma viral, con la consecuente pérdida de actividad que da como resultado la sobreexpresión de los oncogenes virales. La integración del genoma viral es más frecuente en lesiones de alto grado y está asociada al aumento de velocidad de progresión hacia el cáncer invasor. La PCR en tiempo real (PCR-TR) con SYBRGreen es actualmente el método más sensible para determinar el estado físico del genoma de VPH (i.e., si se encuentra como episoma, integrado al genoma o mixto) y se considera un marcador del riesgo y la progresión al cáncer cervicouterino. El propósito de este trabajo fue adaptar el método de PCR anidada en tiempo real que recién desarrollado en nuestro laboratorio – empleando EvaGreen como fluorocromo más sensible y barato que SYBRGreen– para determinar el estado físico del genoma de VPH16 mediante la cuantificación de las copias de los genes E6 y E2 en el DNA de raspados cervicales de mujeres con displasia. Los cocientes E2/E6 esperados en los diferentes estados físicos serían: episomal = 1 > mixto > integrado = 0. Hasta ahora hemos establecido las condiciones óptimas de amplificación de los genes E2 y E6 de VPH16 y estamos analizando muestras cervicales de mujeres con displasia por VPH16.

**Palabras clave:** Papilomavirus humano tipo 16; Integración; PCR anidada en tiempo real.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres del mundo y la primera en países en desarrollo, inclusive México (Muñoz et al. 1993). En el año 2000 hubo 6,650 muertes registradas y la tasa de mortalidad para 100,000 habitantes ajustada por la edad por cáncer cervical fue de 17.1 (Arrosi et al. 2003).

Los virus del papiloma humano (VPH) son los agentes de transmisión sexual más comunes y el principal factor de riesgo del CaCu. Hay más de 100 tipos de VPH; los de alto riesgo son los que se encuentran asociados a la mayoría de los casos de cáncer cervical en el mundo y el más frecuente es el VPH16. (Muñoz et al. 2003)

La proliferación descontrolada de las células del epitelio cervical resulta de la sobreexpresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 que bloquean a las proteínas supresoras de tumores Rb y P53. Tres procesos alternativos pueden incrementar la expresión de las oncoproteínas virales: 1) alto número de copias del genoma de VPH (el DNA de VPH16 aumenta en órdenes de magnitud al aumentar el grado de enfermedad cervical), 2) mutaciones que afectan los motivos YY1 de la región larga de control del genoma de VPH y 3) integración del DNA de VPH al genoma celular (el ORF E2, cuyo producto reprime al promotor P97 para los genes E6 y E7 es interrumpido o destruido preferentemente durante la integración). La integración del genoma viral es más frecuente en lesiones de alto grado y parece aumentar la velocidad de progresión hacia cáncer microinvasor e invasor (Nagao et al. 2002).

Hay un método de PCR-TR con SYBRGreen para determinar el estado físico del genoma de VPH16 que distingue de manera confiable la forma episomal pura de las formas mixtas cuando el 40% o más del DNA viral está integrado con ausencia de E2 (Nagao et al. 2002). Por otra parte, nuestro grupo acaba de desarrollar un método de PCR-TR anidada con EvaGreen para determinar la carga de papilomavirus que podría adaptarse para determinar el estado físico del genoma de VPH16. El uso de EvaGreen como fluorocromo hace al método más barato, 10 veces más sensible e igualmente específico y reproducible que el método con SYBRGreen (Hernández-Arteaga et al. 2006)

El propósito de este trabajo fue adaptar el método de PCR-TR anidada de nuestro laboratorio –empleando EvaGreen como fluorocromo–, para determinar el estado físico del genoma de VPH16 mediante la cuantificación de los genes E6 y E2 en el DNA de raspados cervicales de mujeres con displasia.

## MÉTODOS

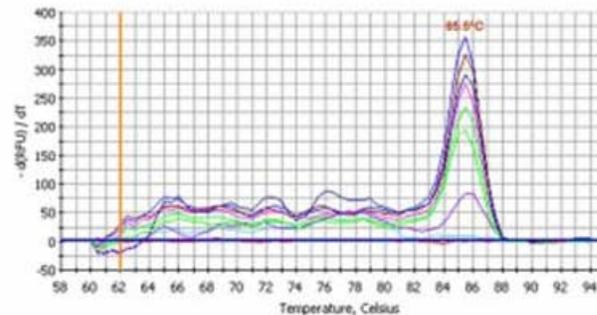
*Construcciones control.* Amplificamos los segmentos E6-VPH16 649 pb (nt 26-671) y E2-VPH16 1026 pb (nt 2810-3836) a partir de un plásmido con el genoma completo de VPH16 (donado por el Dr. Alejandro García-Carrancá) y los clonamos en pGEM (Invitrogen). De esta manera obtuvimos las construcciones pHV101 (inserto: E6-VPH 649 pb) y pEV201 (inserto: E2-VPH16 1026 pb). En las minipreparaciones obtenidas de cada construcción purificada calculamos el número de copias por unidad de volumen y preparamos estándares con  $2.5 \times 10^3$ - $2.5 \times 10^7$  copias de pHV101 y pEV201.

*Amplificación de la región E6/E:* 1. Preamplificación por PCR convencional directa. Mediante PCR convencional preamplificamos el producto E6-VPH16 649 pb con la pareja de oligonucleótidos LCRS/E7AS. Las mezclas de 50  $\mu$ l fueron preparadas con el kit de Invitrogen (Cat. No. 11615-010). Concentraciones finales:  $MgCl_2$  3 mM; oligonucleótidos 0.15  $\mu$ M; dNTPs 0.05 mM; Taq DNA polimerasa 30  $\mu$ U/ $\mu$ l, 1  $\mu$ l de DNA molde con  $2.5 \times 10^9$  copias de pHV101 con el fragmento E6-VPH16 649 pb. Programa de preamplificación de 10 ciclos: desnaturalización a 95°C por 15 seg; annealing a 58°C por 1 min; extensión a 72°C por 1 min (Fujinaga et al. 1991). 2. PCR anidada. Mezclas para PCR-TR anidada con la pareja pU1M/pU2R para generar el producto E6-VPH16 249 pb con la misma composición que las de preamplificación, excepto porque 1) contenían 1  $\mu$ l de mezcla preamplificada con  $2.5 \times 10^3$ - $2.5 \times 10^6$  copias de pHV101, 2) EvaGreen 1 $\times$  y 3) se llevaron a cabo por 50 ciclos (Hernández-Arteaga et al. 2006).

*Amplificación de E2:* 1. Preamplificación por PCR convencional directa. Con la pareja de oligonucleótidos E2-VPH16 F/R para generar el producto E2-VPH16 1026 pb. Mezclas de PCR de 50  $\mu$ l con el kit de Invitrogen. Concentraciones finales:  $MgCl_2$  1 mM; oligonucleótidos 0.1  $\mu$ M; dNTPs 0.01 mM; Taq DNA polimerasa 12.5  $\mu$ U/ $\mu$ l, 1  $\mu$ l de DNA molde con  $2.5 \times 10^9$  copias de pEV201. Programa de preamplificación de 10 ciclos: desnaturalización a 95°C por 15 seg; annealing a 45°C por 1 min; extensión a 72°C por 1 min (Nagao et al. 2002). 2. PCR-TR anidada. Mezclas con la pareja E2-VPH16 177 F/R para generar el producto E2-VPH16 177 pb. Concentraciones finales:  $MgCl_2$  1 mM; oligonucleótidos 0.6  $\mu$ M; dNTPs 0.3 mM; TaqDNA polimerasa 12.5  $\mu$ U/ $\mu$ l, EvaGreen 1 $\times$ , 1  $\mu$ l de mezcla preamplificada como molde con  $2.1 \times 10^4$ - $2.1 \times 10^7$  copias de pEV201 (Hernández-Arteaga et al. 2006).

## RESULTADOS

En nuestro laboratorio acabamos de desarrollar un método de PCR-TR anidada con EvaGreen para amplificar el producto E6-VPH16 249 pb (Hernández-Arteaga et al. 2006). La especificidad del producto amplificado se infiere del patrón único de extinción de la fluorescencia con la temperatura cuyo valor máximo ocurre a 85.5°C (Fig. 1).



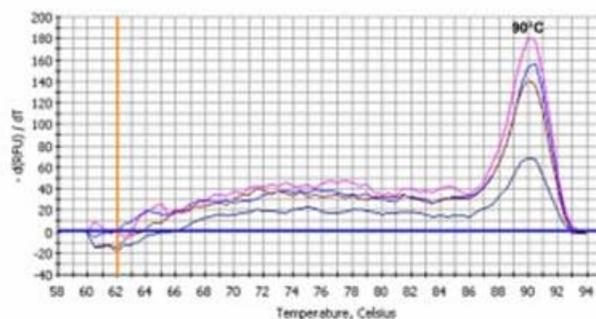
**Figura 1.** Patrón de extinción de la fluorescencia coincidente para el producto principal de pHV101 y DNA de células SiHa (transformadas por VPH16). Valor máximo = 85.5°C.

Hemos montado la PCR-TR anidada con EvaGreen para el producto E2-VPH16 177 pb en mezclas con  $2.1 \times 10^4$ - $2.1 \times 10^7$  copias de pEV201. Observamos una correlación lineal entre el número de copias y la fluorescencia (Fig. 2) y un patrón único de extinción de la fluorescencia del producto de células SiHa y los plásmidos control con un máximo a 90.5°C, el cual implica que el producto amplificado es específico (Fig. 3).

Actualmente estamos cuantificando los genes E6 y E2 en un sistema modelo con relaciones conocidas de los plásmidos pHV101 y pEV201 para controlar la determinación del estado físico de VPH16 en muestras problema de mujeres con displasia y CaCu invasor.



**Figura 2.** Curva estándar de diluciones logarítmicas seriadas con  $2.1 \times 10^5$ - $2.1 \times 10^7$  copias de pEV201.



**Figura 3.** Patrón de extinción de la fluorescencia coincidente para el producto principal de pEV201 y del DNA de células SiHa (transformadas por VPH16). Valor máximo = 90°C.

## CONCLUSIÓN

Hemos determinado las condiciones óptimas para adaptar nuestro método de PCR-TR anidado con EvaGreen para amplificar los oncogenes E2 y E6 y así poder determinar el estado físico del genoma de VPH16 (episomal, integrado, mixto) en mujeres con displasia cervical.

## REFERENCIAS

1. Arrosi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex* 45 (supl 3):S306-S314, 2003.
2. Fujinaga Y, Shimada M, Okasawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 72:1039-1044, 1991.
3. Hernández-Arteaga S, Sánchez-Garza M, López-Revilla R. Nuevo método de PCR anidada en tiempo real con EvaGreen para determinar la carga de papilomavirus. *Memorias del II Congreso de Química Médica (Querétaro 2006)*.
4. Muñoz N, Bosch X, De San José S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518-527, 2003.
5. Muñoz N, Bosch X, De Sanjosé S, Vergara A, del Moral A, Munoz MT, Tafur L, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P. Risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade III/ carcinoma in situ in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2:423-431, 1993.
6. Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, Hongo A, Kodama J, Iton S, Kudo T. Rapid and sensitive detection for physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40:863-867, 2002.